

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**MİKOTOKSİN TAYİNİ İÇİN APTAMER TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

NETİCE KÜÇÜK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSTAFA OĞUZHAN ÇAĞLAYAN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SAMET ŞAHİN

BİLECİK, 2025

10655254

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**MİKOTOKSİN TAYİNİ İÇİN APTAMER TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

NETİCE KÜÇÜK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSTAFA OĞUZHAN ÇAĞLAYAN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SAMET ŞAHİN

BİLECİK, 2025

10655254

BEYAN

“Mikotoksin Tayini İçin Aptamer Temelli Biyosensörlerin Geliştirilmesi” adlı doktora tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.	
DESTEK ALINMIŞTIR	DESTEK ALINMAMIŞTIR
Destek alındı ise;	
Destekleyen kurum;	
Desteğin Türü	Proje Numarası
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	2021-02.BŞEÜ.01-01
2- TÜBİTAK	121Z592
Diğer;.....	123Z032
ETİK KURUL onayı var ise;	
ETİK KURUL karar tarih/sayı:	

NETİCE KÜÇÜK

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

Doktora tez çalışmalarım boyunca bilgi, birikim, tecrübe ve yüksek motivasyon gücünden yararlandığım hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam; Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN'a, her daim bir telefon uzağımda olan ve yine bilgi, birikim ve tecrübelerinden yararlandığım ikinci danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Samet ŞAHİN'e,

Yönlendirmeleri, destekleri, önerileri ve katkılarından dolayı kıymetli jüri üyelerim Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ, Prof. Dr. Cihan DARCAN ve Prof. Dr. Lokman UZUN'a kazandırdıkları her şey için saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini ve tecrübelerini esirgemeyen kıymetli çalışma ve yol arkadaşım Sayın Şevval KAYA' ya katkılarından dolayı minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her daim desteği ile yanımda olan kıymetli eşim Özkan KÜÇÜK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmaların tamamlanması için 121Z592 numaralı "1002-A Hızlı Destek" projesi ve 123Z032 "1002 - B Acil Destek Modülü" ile finansal destek sağlayan TÜBİTAK'a ve "2021-02.BŞEÜ.01-01" numaralı Doktora Tez Projesi desteği için Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

ÖZET

MİKOTOKSİN TAYİNİ İÇİN APTAMER TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında, gıda güvenliğinde ciddi risk oluşturan mikotoksinlerden patulin (PAT)'in güvenilir, hızlı ve seçici tayini amacıyla aptamer temelli elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Mikotoksinler, özellikle meyve ve meyve ürünlerinde sıklıkla rastlanan, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden toksik bileşiklerdir. PAT'ın, başta elma ve elma suyu olmak üzere çeşitli gıda maddelerinde sınır değerin üzerinde bulunması, yeni ve etkili analiz yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu bağlamda, aptamerler gibi sentetik biyo-tanım elemanlarının kullanıldığı biyosensörler hem özgüllük hem de hassasiyet bakımından geleneksel analiz yöntemlerine önemli avantajlar sunmaktadır.

Çalışma kapsamında, biri yapısal anahtarlama mekanizmasına sahip ve metilen mavisi ile işaretli aptamer kullanılan kare dalga voltametrisi (SWV) temelli, diğeri ise tiyol ile fonksiyonelleştirilmiş aptamerin kullanıldığı impedimetrik (EIS) temelli olmak üzere iki farklı sensör platformu tasarlanmış ve optimize edilmiştir. Elektrot yüzeyleri, altın kaplama ve uygun kimyasal modifikasyonlarla fonksiyonelleştirilerek aptamerlerin yüksek verimle immobilizasyonu sağlanmıştır. Optimal immobilizasyon parametreleri, Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM) ile istatistiksel olarak belirlenmiştir.

Her iki sensörün analitik performansı, tampon çözeltilerde ve elma suyu gibi gerçek gıda örneklerinde kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. SWV tabanlı yapısal anahtarlama sensöründe, 0,5–5 ng/mL doğrusal aralıkta çalışılmış, kalibrasyon doğrusu $y=0,783x+1,649$ ($R^2=0,99$) olarak bulunmuştur. Bu platformda LOD (Tespit Sınırı) 0,33 ng/mL, LOQ (Kantitatif Sınır) ise 1,0 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Duyarlılık 0,783 k Ω /(ng/mL) olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değerler, mevcut literatürde rapor edilen birçok aptasensörden daha üstün veya karşılaştırılabilir düzeydedir. İmpedimetrik sensörde ise 0,5–10 ng/mL doğrusal aralıkta çalışılmış, LOD 0,45 ng/mL, LOQ ise 1,35 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu sensörde elde edilen kalibrasyon doğrusu yüksek lineerlik göstermiştir ($R^2>0,98$).

Seçicilik testlerinde hem SWV hem de EIS tabanlı platformlarda PAT ile yapısal olarak benzer mikotoksinler olan zearalenon (ZEA) ve okratoksin A (OTA-A)'nın varlığında sensör çıkışlarında belirli oranlarda artış gözlenmiştir. EIS platformunda ZEA için $26,7 \pm 11,7$ %, OTA için $16,1 \pm 6,9$ % oranında pozitif sinyal kayması saptanırken, SWV tabanlı platformda bu girişim oranları daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, özellikle aptamer dizilimi ve uç

modifikasyonunun, mikotoksinler arası çapraz etkileşim üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermektedir. Geliştirilen sensörlerin elma suyu gibi gerçek örneklerde uygulanabilirliği de test edilmiş ve yüksek geri kazanım (%91–104) ile düşük bağıl standart sapma ($RSD < \%8$) değerleri elde edilmiştir. Her iki sensör de depolama süresince (raf ömrü testi) iki haftalık periyotta %90'ın üzerinde performans sergilemiştir.

Çalışmanın en önemli çıktılarından biri, farklı elektrokimyasal yöntemlerin (SWV ve EIS) ve aptamer modifikasyonlarının (MB ve SH) hem sinyal amplifikasyonu hem de seçicilik üzerinde farklı avantaj ve sınırlılıklar getirdiğinin ortaya konmasıdır. Metilen mavisi etiketli yapısal anahtarlama sensörü, daha yüksek sinyal amplifikasyonu ve düşük LOD değerleri sunarken, impedimetrik sensör, yüksek seçiciliği ve stabilitesiyle öne çıkmaktadır. Ayrıca her iki platform, gıda güvenliğinde sahada hızlı ve düşük maliyetli analiz yapma potansiyeli göstermektedir.

Gelecekte, sensör platformlarının çoklu mikotoksin tespitine uyarlanması, yeni nesil nanomateriyallerle modifikasyon ve aptamer diziliminde *in silico* optimizasyon ile daha yüksek performanslı biyosensörlerin geliştirilmesi mümkündür. Bu çalışma hem temel hem de uygulamalı analizlerde aptamer temelli biyosensörlerin özgün katkısını ve inovatif yönlerini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mikotoksin, Patulin, Aptasensör, Elektrokimyasal Biyosensör, Gıda Güvenliği

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF APTAMER-BASED BIOSENSORS FOR MYCOTOXIN DETERMINATION

In this thesis, the development of aptamer-based electrochemical biosensors for the rapid, reliable, and selective detection of patulin (PAT), a mycotoxin that poses a significant risk to food safety, was investigated. Mycotoxins, especially those found in fruit and fruit-based products, threaten both human and animal health. The frequent detection of PAT above regulatory limits in apple juice and similar foods highlights the need for novel and effective analytical tools. In this context, biosensors utilizing synthetic biorecognition elements such as aptamers offer clear advantages in specificity and sensitivity over conventional analytical techniques.

The study presents two distinct biosensor platforms: a structural-switching, methylene blue-labeled aptamer-based sensor using square wave voltammetry (SWV), and an impedimetric sensor based on thiol-modified aptamers (EIS). Gold-coated electrode surfaces were functionalized and optimized for aptamer immobilization, with experimental parameters statistically designed via response surface methodology (RSM).

Analytical performance of both sensors was rigorously evaluated in buffer and real samples such as apple juice. The SWV-based structural-switching sensor exhibited a linear range of 0.5–5 ng/mL with a calibration equation of $i = 0.783x + 1.649$ ($R^2 = 0.99$). The limit of detection (LOD) was calculated as 0.33 ng/mL and the limit of quantification (LOQ) as 1.0 ng/mL, with a sensitivity of 0.783 k Ω /(ng/mL). These results are comparable to, or exceed, many previously reported aptasensors. For the impedimetric sensor, a linear range of 0.5–10 ng/mL was achieved, with an LOD of 0.45 ng/mL and an LOQ of 1.35 ng/mL, maintaining a high degree of linearity ($R^2 > 0.98$).

Selectivity tests revealed cross-reactivity with structurally similar mycotoxins, notably zearalenone (ZEA) and ochratoxin A (OTA-A). On the EIS platform, positive signal shifts of $26.7\% \pm 11.7$ for ZEA and $16.1\% \pm 6.9$ for OTA were observed, while SWV-based sensors displayed lower cross-reactivity. These findings underscore the impact of aptamer sequence and terminal modification on the degree of interference among different mycotoxins. Application in real samples resulted in high recoveries (91–104%) and low relative standard deviations ($RSD < 8\%$), with both sensors maintaining over 90% performance after two weeks of storage (shelf-life testing).

A key outcome of this research is the demonstration that different electrochemical techniques (SWV vs. EIS) and aptamer modifications (MB vs. SH) impart unique advantages and limitations in terms of signal amplification and selectivity. The methylene blue-labeled structural-switching sensor offered superior signal enhancement and lower LODs, while the impedimetric platform was distinguished by its high selectivity and stability. Both approaches provide rapid, low-cost alternatives suitable for field analysis in food safety applications.

Future directions may include multiplexed detection platforms, advanced nanomaterial modifications, and *in silico* aptamer sequence optimization for even higher performance. Overall, this study highlights both the innovative and practical aspects of aptamer-based biosensors in mycotoxin detection, contributing valuable insights to both fundamental and applied analytical sciences.

Keywords: Mycotoxin, Patulin, Aptasensor, Electrochemical Biosensor, Food Safety

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikotoksinler	3
2.2. PAT	4
2.3. Biyosensörler	6
2.4. Elektrokimyasal Karakterizasyon Yöntemleri	8
2.5. Aptamerler	9
2.6. Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM)	11
3. LİTERATÜR ÖZETİ	12
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
4.1. Materyal	26
4.1.1. Kullanılan cihaz ve kimyasallar	26
4.1.2. Kullanılan çözeltiler.....	26
4.2. Yöntem.....	27
4.2.1. Au elektrobiriktirme.....	27
4.2.2. PAT Tespiti İçin Yapısal Anahtarlama Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Sensör Geliştirilmesi.....	28
4.2.2.1. Aptamer immobilizasyonu	28

4.2.2.2. PAT Tespiti.....	29
4.2.2.3. En uygun Aptamer, MCH ve PAT inkübasyon sürelerinin belirlenmesi	30
4.2.2.4. Analitik Performansın Belirlenmesi.....	32
4.2.2.5. Girişim, Gerçek Numune ve Raf Ömrü Testleri	33
4.2.3. PAT Tespiti İçin İmpedimetrik Aptasensör Geliştirilmesi	33
4.2.3.1. Aptamer ile immobilize edilmiş SPE'lerin hazırlanması	34
4.2.3.2. En Uygun Aptamer Konsantrasyonu ve Aptamer immobilizasyon ve PAT İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesi.....	36
4.2.3.3. Analitik Performansın Belirlenmesi.....	37
4.2.3.4. Girişim ve Raf Ömrü Testleri.....	37
5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	38
5.1. PAT Tespiti İçin Yapısal Anahtarlama Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Sensör.....	38
5.1.1. Analitik performansın belirlenmesi	40
5.2. PAT Tespiti İçin İmpedimetrik Aptasensör.....	47
5.2.1. PAT Tespitinde İmpedimetrik Aptasensörün Performansı.....	47
5.2.2. Girişim, Gerçek Numune ve Raf Ömrü Test Sonuçları	51
5.3 TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKÇA	64

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Mikotoksinler, üreten mantar türleri, en yaygın görüldüğü gıdalar, sağlık üzerine etkileri.....	3
Tablo 2.2. Aptamerler ve antikorlar	10
Tablo 3.1. Scopus veri tabanında Mayıs 2025 tarihli anahtar kelime tarama sonuçları.....	12
Tablo 3.2. Literatürde karşılaşılan PAT tespit yöntemleri	13
Tablo 4.1. Aptamerin dizisi ve sekonder yapısı	27
Tablo 4.2. İmmobilizasyon parametrelerine göre RSM deney planı.....	31
Tablo 5.1. Design Expert programı tarafından belirlenen deneyler ve elde edilen sonuçlar ..	39
Tablo 5.2. Aptasensör için analitik parametreler.....	43
Tablo 5.3. Girişimciler için ZEA ve OTA ile PAT için hesaplanan fizikokimyasal özellikler, 1-4 van der Waals faktörü ve Wiener endeksi	45
Tablo 5.4. İmpedimetrik aptasensöre ait analitik parametreler	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. PAT' ın moleküler yapısı.....	5
Şekil 2.2. Biyosensörlerin genel gösterimi.	6
Şekil 2.3. SELEX işleminin şematik gösterimi.....	9
Şekil 3.1. Aptamer-fonksiyonel kılcal monolitik kolonun hazırlanması.	20
Şekil 3.2. PAT tespiti için immobilize edilmiş GCE sensörünün hazırlanmasına ilişkin şematik çizim.....	21
Şekil 3.3. GO-SELEX prosedürü ve PAT tespiti için bir kolorimetrik aptasensör kullanılarak PAT'a karşı aptamer seçiminin şematik gösterimi.	22
Şekil 3.4. PAT tespiti için oranlı metrik floresan aptasensörünün işlevini gösteren şematik diyagram.....	23
Şekil 3.5. PAT'ın fosforesans tespiti için bir nanosensör olarak MIP-QD'lerin sentez şeması. Kaynak: (Zhang vd., 2017).	25
Şekil 4.1. PAT tespiti için yapısal anahtarlama aptasensör platformunun prensibinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.2. PAT tespiti için yapısal anahtarlama elektrokimyasal aptasensörünün üretim adımlarının şematik gösterimi.....	32
Şekil 4.3. (a) Anodik pik (E_{PA}) ve katodik pik (E_{PK}) arasındaki potansiyel farkı ΔE_p , E_0 formal potansiyel olarak etiketlenir (b) Elektrokimyasal sistemin Randles eşdeğer devre modeli. (Fischer vd., 2009).	35
Şekil 4.4. PAT tespiti için aptasensör şematik gösterimi.....	36
Şekil 5.1. A) 15 döngü boyunca 50 mV'da 0,1 M KCl'de 1 mM $[AuCl_4]^-$ elektroliz için CV'ler (B) Aptasensörün PAT'a karşı sinyal açma-kapama sinyal tepkisi.....	38
Şekil 5.2. Au kaplı SPE elektrotlarının üretimi ve analizi için optimizasyon değerleri.	40
Şekil 5.3. Farklı PAT konsantrasyonlarında elde edilen tepe akım yoğunluğu değerleri.....	41
Şekil 5.4. Yapısal Anahtarlama Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Sensör için kalibrasyon eğrisi.....	42

Şekil 5.5. Girişim yapan maddelerin aptasensörün tepkisi üzerindeki etkisi. Girişim yapan maddenin 5 ng/mL ve 25 ng/mL konsantrasyonundaki tepkisi. Hata çubukları, bağımsız olarak hazırlanmış dört elektrottan türetilen numunelerin standart sapmalarını temsil eder. ..	44
Şekil 5.6. İmpidimetrik aptasensöre ait kalibrasyon eğrisi.	49
Şekil 5.7. Girişim yapan maddelerin 5 ng/mL derişimdeki aptasensör yanıtı.	51
Şekil 6.1. Girişim deneylerinde SWV ve EIS yöntemlerinin kıyaslanması. (A) PAT, (B) OTA-A, (C) ZEA	59
Şekil 6.2. Girişim deneylerinde (A) PAT,(B) OTA-A, (C) ZEA, için tespit edilen oransal farklar.	60



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

SPE	:Perde Baskılı Elektrot
AuNP	:Altın Nanoparçacık
CV	:Dönüşümlü voltametri
EIS	:Elektrokimyasal impedans
DPV	:Diferansiyel puls voltametrisi
SWV	:Kare dalga voltametrisi
LSV	:Lineer tarama voltametrisi
K₃Fe(CN)₆	:Potasyum ferrisiyanür
K₄Fe(CN)₆	:Potasyum ferrosiyanür
SELEX	:Ligandların üstel zenginleştirme yoluyla sistematik evrimi
RSM	:Yanıt Yüzey Metodolojisi
LOD	:Tespit sınırı
LOQ	:Kantitatif tayin sınırı
MWCNT	:Çok duvarlı karbon nanotüpler
GCE	:Camsı karbon elektrot
MCH	:6-merkapt-1-heksanol
PAT	:Patulin
ZEA	:Zearalenon
OTA	:Okratoksin
UPW	:Ultra Saf Su
R_{ct}	:Yük aktarım direnci
R_s	:Devre çözelti direnci
CPE	:Sabit faz elemanı
W	:Warburg impedansı

PBS	:Fosfat tampon çözeltisi
MB	:Metilen Mavisi
SD	:Standard Sapma
Ω	:Ohm
σ	:Sigma



1.GİRİŞ

Gıda güvenliği, küresel, sağlık ve ekonomi açısından kritik bir konudur. Bu bağlamda, mikotoksinler özellikle dikkate alınması gereken zararlı bileşenlerdir.

Mikotoksinler, bir dizi mantar türü tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Gıda ve tarım endüstrisinde önemli bir sorun teşkil etmektedirler. Bu mantarlar, hasat veya depolama sırasında mahsuller üzerinde koloniler oluşturur. Mikotoksinler, gıdalarda maddi kayıplara, tüketicilerde ise önemli sağlık risklerine yol açmaktadır (Çağlayan, 2016). Yiyecek ve yemlerde yaygın biçimde bulunmaları, insan ve hayvan sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu tehdit, ya tarımsal ürünlerin doğrudan kontaminasyonundan ya da mikotoksin ve metabolitlerinin kontamine yemlerle beslenen hayvanların dokularına, sütüne ve yumurtalarına geçişinden kaynaklanmaktadır (Köppen vd., 2010). Küresel ısınma, mikotoksinlerin oluşumunu ve yayılımını artıran önemli bir faktördür. Ayrıca, bu mikotoksinler ısıya, fiziksel ve kimyasal işlemlere karşı dirençli olduklarından, gıda işleme yöntemleriyle kolayca yok edilemezler (Evtugyn vd., 2017).

Tarım üretiminin geniş ölçekli olması ve üretici sayısının fazla olması, mikotoksinler ile bunların metabolitlerinin genel olarak izlenmesini gerekli kılmaktadır. Özellikle birçok üreticinin teknik altyapı ve mali kaynak yetersizliği nedeniyle, üretim kalitesini yüksek düzeyde tutması ve kontaminasyonu önlemesi zorlaşmaktadır. Bu durum, etkili ve kapsamlı bir kontrol-denetim sisteminin gerekliliğini daha da ön plana çıkarmaktadır (Evtugyn ve Hianik, 2019).

Mikotoksinlerin tayininde kullanılan enstrümantal yöntemler, pahalı ekipmanlara ve nitelikli kullanım becerilerine dayanmaktadır. Modern kromatografik ve spektrometrik cihazlar gıda kontaminantlarını tespit edebilse de, sahada kullanıma uygun, düşük maliyetli, hızlı ve yüksek doğruluklu sensörlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, disiplinler arası çalışmalar sonucu geliştirilen biyosensörler ve aptamerler gibi sentetik biyotanıma elemanları, hızlı ve doğru alternatif analiz yöntemleri olarak öne çıkmaktadır. Son yıllarda gıda güvenliği ve kalitesi ile ilgili yasal düzenlemelerin getirdiği kısıtlamalar ve artan güncel kaygılar, yenilikçi ve ileri teknolojiye dayalı, çoğunlukla saha uygulamaları için tasarlanmış hızlı ve güvenilir taşınabilir cihazların geliştirilmesini teşvik etmektedir (Evtugyn ve Hianik, 2019). Ayrıca, gıda numunelerinde mikotoksinler gibi tehlikeli bileşenlerin tespiti için hızlı, hassas ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesinde, mikotoksinlere yüksek özgüllük gösteren yeni reseptörlerin tasarlanması büyük önem taşımaktadır (Duan vd., 2016).

Geleneksel analitik cihazlarla rekabet edebilmek için, minimum numune hazırlığı gerektiren ve az sayıda reaktifle çalışan biyosensörler, saha koşullarında hızlı ve güvenilir tespit imkânı sunmaktadır. Bu bağlamda, biyo-tanıma elemanı olarak aptamerlerin kullanımı giderek daha fazla önem kazanmaktadır ve etkili bir alternatif analiz yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmanın amacı, farklı elektrokimyasal yöntemler kullanarak yüksek afinite ve seçiciliğe sahip mikotoksine özgü aptamer temelli biyosensör geliştirmektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium spp.* gibi çeşitli tarım ürünlerinde yetişen mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Tahıllarda ve tahıl bazlı gıdalarda, meyvelerde, şarapta, sütte, kahve ve kakao çekirdeklerinde ve et ürünlerinde birikebilmektedir (Evtugyn ve Hianik, 2019).

Küçük molekül ağırlıklarıyla (yaklaşık 700 Da) karakterize edilen mikotoksinler, teratojenik, mutajenik, kanserojenik ve bağışıklık baskılayıcı özellikleriyle bilinir ve besin zincirine girdiklerinde düşük konsantrasyonlarda bile kronik toksisiteye yol açarlar (Evtugyn ve Hianik, 2019). Mikotoksinlerle zehirlenme genellikle kronik nitelikte olurken, bazı durumlarda akut nitelikte de olabilmekte ve çok ciddi sonuçlarla karşılaşılabilir (Oruç, 2014). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), mikotoksinlerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde yüksek toksikolojik etkisini doğrulamıştır. Bu nedenle, geniş bir yelpazede gıda maddelerinde kalıntı limitleri mevzuat ile sıkı bir şekilde sınırlandırılmıştır (Evtugyn ve Hianik, 2019).

100'den fazla mantar türü tarafından üretilen, yaklaşık 400 potansiyel toksik mikotoksin tespit edilmiştir. Tarım, hayvancılık ve halk sağlığı için; trikotesenler, okratoksinler (OTA), aflatoksinler (AFB), zearalenon (ZEA), fumonisinler (FB), patulin (PAT) ve sitrinin en toksik olduğu düşünülmektedir (Janik vd., 2020). Bu mikotoksinler, onları üreten mantar türleri, en yaygın görüldüğü gıdalar ve sağlık üzerine etkileri Tablo 2.1' de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Mikotoksinler, onları üreten mantar türleri, en yaygın görüldüğü gıdalar ve sağlık üzerine etkileri.

Mikotoksinler	Üreten Mantar Türü	En Yaygın Görüldüğü Gıdalar	Sağlık Üzerine Etkileri	Referans
AFB	<i>Aspergillus flavus</i> ve <i>Aspergillus parasiticus</i>	Tahıl, baharatlar, yem, patates, yağlı tohumlar ve çeşitli süt ürünlerinde	En güçlü kanserojen madde, aspergilloz ve aflatoksikozis	(Al-Jaal vd., 2019; Shabeer vd., 2022; Sharma vd., 2025; Wei vd., 2020), (Sharma vd., 2025; Wei vd., 2020)

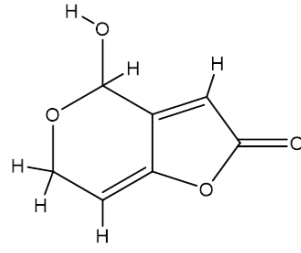
Tablo 2.

Mikotoksinler	Üreten Mantar Türü	En Yaygın Görüldüğü Gıdalar	Sağlık Üzerine Etkileri	Referans
OTA	Özellikle OTA- A, <i>Aspergillus</i> (özellikle <i>Aspergillus ochraceus</i>) ve <i>Penicillium</i> (<i>Penicillium verrucosum</i>)	Tahıl ve tahıl bazlı gıdalarda, kurutulmuş meyvelerde, kahvede, alkollü içeceklerde ve baharatlarda	İnsanlarda öncelikli olarak böbreği hedef alır nefropati gelişimi ve üst idrar yolu kanseri ile ilişkilendirilir. Hayvanlarda genotoksisite, teratojenite, nörotoksisite ve immünotoksisite Kronik maruziyette karaciğer ve böbrek tümörleri gözlenir. FB1 insanlarda kanserojen olan bir grup 2B kanserojen olarak sınıflandırılmıştır.	(Pinhão vd., 2020)
Fumonisinler	<i>Fusarium verticillioides</i> ve <i>Fusarium proliferatum</i>	Mısır ve tahıllar	hepatotoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite ve immünotoksisite Hepatotoksisite, embriyotoksisite, teratojenite, genotoksisite, kardiyotoksisite ve kanserojen	(Chen. vd., 2023; Wei vd., 2020; Yli-Mattila ve Sundheim, 2022)
ZEA	<i>Fusarium graminearum</i> ve <i>Fusarium culmorum</i>	Tahıl (mısır, buğday), yem		(Rong vd., 2023)
PAT	<i>Penicillium expansum</i> ve bazı <i>Aspergillus</i> ve <i>Byssoschlamys</i>	Yaygın olarak elma ve elma ürünlerinde, armut, üzüm, tatlı biber ve havuçta		(Pan vd., 2025; Wei vd., 2020)

2.2. PAT

PAT, ilk olarak 1943 yılında antibiyotik özelliklere sahip yeni bir mantar türü olarak kabul görmesine karşın kısa sürede toksisitesi keşfedilmiş bir mikotoksindir (Puel vd., 2010). Temel olarak *Penicillium expansum* (mavi küf) tarafından üretilir. Belirsiz bozunma mekanizmaları ve bozunma sonrası oluşan metabolitlerin zararları hakkındaki sınırlı bilgi PAT kontrolünü zorlaştırmaktadır (Zhong vd., 2018).

PAT, dünya çapında görülen, 60'dan fazla mantar türü tarafından üretilen bir mikotoksindir. Meyveler (elma, domates, armut vb.), sert kabuklu yemişler (badem, fındık, yer fıstığı) ve bunların ürünleri dâhil olmak üzere insan gıda maddelerinde görülen yaygın bir kirleticidir (Wu vd., 2016). PAT'ın, molekül ağırlığı 154,12 g/mol olup, moleküler yapısı Şekil 2.1' de verilmiştir (Vidal vd., 2019).



Şekil 2.1. PAT' ın moleküler yapısı.

Özellikle elma ve elma temelli gıda ürünlerinde maddi kayıplara ve sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Portekiz, Belçika gibi Avrupa ülkelerinde ve Çin'in bazı bölgelerindeki ürünler PAT kontaminasyonu açısından incelenmiş ve pek azının izin verilen sınırlar altında olduğu tespit edilmiştir (Tang vd., 2019). PAT' ın giderilmesi için uygulanan fiziksel yöntemler (UV ışınlama), kimyasal katkıları (ozon) ve uygulanan biyolojik ajanlar önemli besin değeri kayıplarına ve yeni safsızlıklara sebep olmuştur (Tang vd., 2019). Ayrıca bu uygulamalar oluşumun engellenmesi noktasında yetersiz kalmış ve maliyetli olmuştur (Şahin vd., 2011).

Yapılan çeşitli çalışmalar, akut PAT zehirlenmesinin ateşli havalelere, ajitasyona, ülser, ödem, bağırsak iltihabı ve kusmaya yol açtığını ve beyin, karaciğer ve böbreklerde DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir (Vidal vd., 2019). PAT toksisitesinin şiddeti, alınan miktara bağlıdır. Bu nedenle özellikle bebek ve çocuklarda kontamine olmuş ürünlerin tüketim miktarı önem arz etmektedir (Şahin vd., 2011). FAO'ya göre PAT' ın kanserojen olduğuna dair kesin bir kanıt olmamasına rağmen, hayvanlarda immünotoksik ve nörotoksik etkileri olduğu belirtilmiştir. Bu türde kronik etkilerin sınırlanması amacıyla tolere edilebilir maksimum günlük alımın 0,4 µg/kg vücut ağırlığı olduğu ifade edilmektedir (http://www.fao.org/input/download/standards/405/CXP_050e.pdf). Gıda numunelerinde izin verilen maksimum PAT seviyesi 50 ng/g'dır (veya ~320 nM; http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFAC/ccfac34/fa02_19e.pdf).

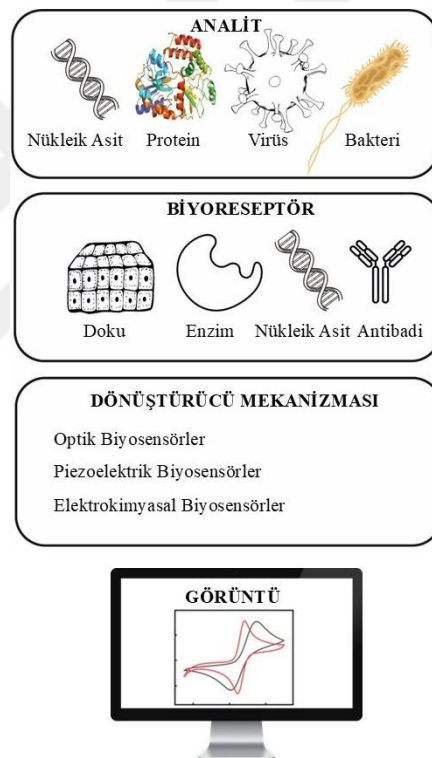
Gıda güvenliğinin sağlık alanında küresel bir hedef olduğu günümüzde (Duan vd., 2016) toksinlerin belirlenen değerlerde tutulması için üreticilerin hızlı ve güvenli testler ile kontrolü teşvik edilmelidir (Ngolong vd., 2020). Böylece PAT'ın hızlı tespiti, gıdaların kirlenmesini önleyerek tüketicilerin ve işletmelerin ciddi sağlık ve ekonomik kayıplara maruz kalmasının önüne geçebilir (Duan vd., 2016). Biyoteknolojik yöntemler ile PAT'ın kontrol edilmesi ve ortadan kaldırılması için yeni, daha etkili ve daha çevreci yöntemlerin geliştirildiği bildirilmiştir. Bu yöntemlerde geliştirilen ve kullanılan sensörler, aptamer, enzim ve antikor temelli biyosensörlerdir. Ayrıca PAT' ı meydana getiren bakterilerin tespiti içinde

bazı dezavantajlarına rağmen biyoteknolojik uygulamalardan faydalanılabileceği bildirilmiştir (Ngolong vd., 2020).

2.3. Biyosensörler

Biyosensörler, geleneksel analiz yöntemlerine kıyasla daha hızlı sonuç veren, hedef analiti yüksek hassasiyet ve biyoseçicilikle tanıyabilen, yerinde ve gerçek zamanlı tespit yapabilen, kullanımı kolay, ekonomik ve çevre dostu cihazlardır (Gavrilaş vd., 2022).

Biyosensörler; genel olarak tespit edilecek olan analit, bu analiti spesifik olarak tanıyan biyobileşenler (enzim, nükleik asitler, bakteri, doku, hücre), biyo-tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir dönüştürücü (transdüser), bu dönüştürülen sinyali işleyen ve görüntüleme için hazırlayan algılayıcılardan oluşmaktadır (Bhalla vd., 2016).



Şekil 2.2. Biyosensörlerin genel gösterimi.

Biyosensörler, içerdiği biyolojik tanıyıcıya göre üç temel grupta incelenebilir; enzim kullanan biyokatalitik sensörler, mikroorganizma temelli mikrobiyal sensörler ve biyolojik özgüllüğe dayalı immünosensörler, aptasensörler ve genosensörler. Öte yandan, dönüştürücü bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre biyosensörler; elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, impedimetrik, kondüktometrik), optik (fiber optik, yüzey plazmon rezonansı (SPR), Raman ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR)

tabanlı) ve kütleye duyarlı sistemler (manyetoelektrik veya piezoelektrik) olarak sınıflandırılabilir (Gavrilas vd., 2022).

Tez çalışmasında, erken tanı, yerinde tespit, kompakt analiz platformu oluşturabilme, daha düşük numune ihtiyacı, uygun fiyat, karmaşık numunelerde tespit kolaylığı ve birçok analitin hızlı analizi gibi sayısız avantajı nedeniyle daha güvenilir ve doğru bir yöntem olduğu kanıtlanmış olan (Paimard vd., 2023) elektrokimyasal biyosensörler kullanılmıştır. Elektrokimyasal sensörler, diğer algılama mekanizmalarına dayanan sensörlere kıyasla hızlı tepki, uygun maliyet, kolay kullanım ve oldukça düşük algılama limitleri gibi çoklu avantajlar sergiler (Ren vd., 2017).

Elektrokimyasal biyosensörler mikotoksinlerin tespiti, küçük biyolojik moleküllerin tespiti (dopamin gibi) ve çevresel izlemelerde değerli araçlar haline gelme noktasında umut vadetmektedir (Economou vd., 2023; Shan vd., 2020; Yuan vd., 2023).

Elektrokimyasal biyosensörlerin ana bileşeni, iletken elektrotlardır. Elektrotların özellikleri, elektrokimyasal sensörlerin duyarlılığını, seçiciliğini ve performansını etkiler. Bu durum da sensörün duyarlılığına ve genel performansına yansır. Elektrot malzemeleri ve sensör tasarımındaki gelişmeler, tespit ve teşhis performansına katkı sağlar. Geliştirilen bu elektrotların kullanımı düşük maliyet amacına hizmet eden biyosensörler için uygundur. Serigrafi baskı elektrotları (SPE), küçük boyutları, yüksek üretim kapasiteleri, esneklikleri, basitlikleri, çok yönlülükleri, düşük maliyetleri ve kullanım kolaylıkları ile avantajlıdır (Suleman vd., 2024).

Optik litografi ile fiziksel buhar biriktirme yöntemlerinin birlikte kullanılmasıyla üretilen SPE'ler, yüzey düzgünlüğü yüksek, kimyasal ve mekanik olarak dayanıklı yapılar elde edilmesini sağlar. Bu özellikleri sayesinde, elektrokimyasal biyosensör uygulamalarında sıkça tercih edilmektedir (Pedersen vd., 2025).

Elektrot yüzeylerinin analizinde, elektrokimyasal karakterizasyon yöntemleri yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu elektroanalitik teknikler, kimyasal türlerin hem nitel hem de nicel olarak belirlenmesine imkân tanır. Fizikokimya, biyokimya ve anorganik kimya gibi alanlarda, yüzeyde meydana gelen adsorpsiyon olaylarının, redoks (yükseltgenme–indirgenme) tepkimelerinin ve çözeltideki maddelerin kararlılığının incelenmesinde önemli rol oynarlar. Ayrıca, modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron transfer süreçlerinin anlaşılması açısından da oldukça değerlidirler (Aşık, 2020).

2.4. Elektrokimyasal Karakterizasyon Yöntemleri

Tez çalışmasında yüzey özelliklerinin elektrokimyasal olarak incelenmesinde, dönüşümlü voltametri (CV), doğrusal tarama voltametri (LSV), kare dalga voltametrisi (SWV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) tamamlayıcı karakterizasyon teknikleri olarak kullanılmıştır.

Elektrokimyasal biyosensörler hakkında yapılan çoğu çalışmada CV, diğer yöntemlerle birlikte kullanılır (Pedersen vd., 2025). CV, elektrot yüzeyinde oluşan elektrokimyasal türleri incelemek için potansiyeli ileri ve geri yönlerde tarama yapar. Hem nitel hem nicel bilgi sağlar ve hızlı, güvenilir bir karakterizasyon aracı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Dempsey vd., 2024).

CV tekniğinin temel avantajlarından biri, belirli bir potansiyel aralığında farklı tarama hızları kullanılarak elektroaktif maddenin tepkime mekanizmasının ayrıntılı şekilde analiz edilebilmesidir. Pik akımları ve potansiyel farkları incelenerek, elektrot yüzeyindeki adsorpsiyon, difüzyon süreçleri ve elektron transfer dinamikleri hakkında bilgi edinilebilir. Ayrıca, maddenin katodik ya da anodik yönlerdeki davranışı, tepkimenin tersinirlik durumu ve kinetik parametreler de bu yöntemle değerlendirilebilir (Erkal, 2024).

LSV uygulamalarında, elektroaktif tür içeren hareketsiz bir çözeltide, referans ve çalışma elektrotları arasında zamanla doğrusal olarak artan bir potansiyel uygulanır. Bu sırada çalışma ve karşıt elektrotlar arasında oluşan akım değerleri ölçülür. Elde edilen potansiyel-akım ilişkisini gösteren grafiksel çıktı, doğrusal voltamogram olarak adlandırılır. Bu teknikte, uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi ve buna karşılık alınan akım tepkisi, sistemin elektrokimyasal özelliklerinin analizinde belirleyici rol oynar (Aşık, 2020).

SWV’de temel prensip, potansiyelin küçük adımlarla değiştirilmesi ve akım ölçümlerinin bu adımlardan yaklaşık 50 ms sonra yapılmasıdır. Bu gecikmeli ölçüm sayesinde, çift tabaka kapasitörünün yüklenmesinden kaynaklanan Faradayik olmayan akımlar büyük ölçüde azaltılır. Ayrıca bu teknikte, akım hem ileri hem geri puls sonrasında iki kez ölçülür. Ana amaç, analizle ilgili Faradayik akımı yükseltirken, şarj akımlarını minimize etmek ve böylece daha hassas ölçümler yapmaktır (Pedersen vd., 2025).

EIS, elektrot yüzey analizinde ve biyosensör geliştirmede, yüksek hassasiyetle çok yönlü kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte, Faradayik (redoks) ve Faradayik olmayan (kapasitif) akımlar ayrıştırılabilir. Çift tabaka, yük transferi, difüzyon, adsorpsiyon gibi

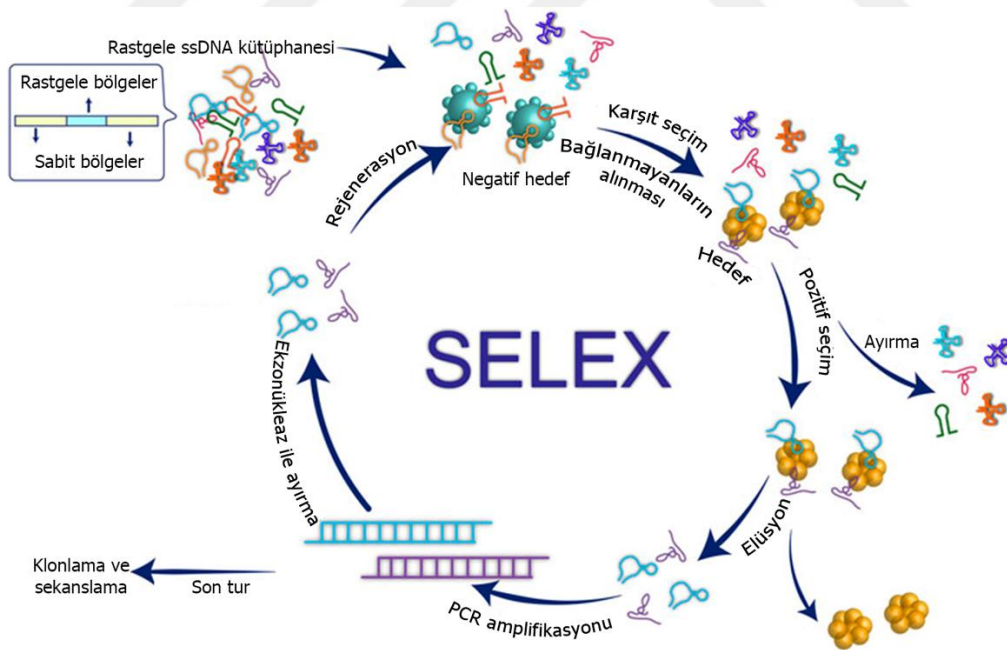
fiziksel süreçler devre elemanlarıyla temsil edilir. CV ile birlikte, elektrot yüzey modifikasyonlarını karakterize etmek için rutin bir yöntemdir (Pedersen vd., 2025).

2.5. Aptamerler

Aptamerler, ilk olarak Tuerk ve Gold tarafından tanımlanan, bir hedef moleküle yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanma kapasitesine sahip DNA (deoksiribonükleik asit) veya RNA (ribonükleik asit) dizileridir (Schmidt vd., 2022; Tuerk ve Gold, 1990).

Aptamerler, küçük moleküllerden (peptitler, proteinler, karbohidratlar, metal iyonları), hücrelere, virüslere ve bakterilere kadar çeşitli hedefleri tespit için kullanılmaktadır. Aptamerler pek çok avantajının yanında, biyoyumlu olmaları sayesinde biyosensör çalışmalarını desteklemektedir. Yeni nanomalzemelerin sentezlenmesi yenilikçi aptasensörlerin geliştirilmesi için önemlidir (Gavrilaş vd., 2022).

Aptamerler; çeşitli analitleri yüksek afinite ve özgüllükle bağlamak için, üstel zenginleştirme (SELEX, Şekil 2.3.) ile ligandların sistematik evrimi yoluyla *in vitro* olarak seçilen tek sarmallı oligonükleotidlerdir (Duan vd., 2016).



Şekil 2.3. SELEX işleminin şematik gösterimi.

Aptamerlerin termal stabiliteleri sayesinde, tekrar işlenebilir ve dönüşümlü denatürasyona uğrayabilir olması, kimyasal yolla kolayca sentezlenmesi, enzimatik direncinin yüksek olması, çeşitli yüzeylere immobilize edilebilmeleri ve bir biyotanı elemanı olarak

kullanılabilmesi sayesinde küçük moleküllü organik ve inorganik bileşiklerin tespitinde aptasensörlerin kullanılabileceği kanıtlanmıştır (Ku vd., 2015). Aptamerler nM (hatta pM ve altı) mertebesinde ayrışma sabitine (K_d) sahiptir. Kolay denatüre olan ve üretimi zor olan antibadiler yerine kullanılır ve hatta “sentetik antibadiler” olarak adlandırılır (Çağlayan, 2016).

Aptamerler, uygun analitlere kovalent olmayan, seçici bağlanma yeteneği nedeniyle genellikle antikorlara bir alternatif olarak kabul edilir. Bu nedenle, aptamerle reaksiyon bir analitin kimyasal doğasını etkilemez ve geri dönüşümlüdür. Ayrıca aptamerler hidrolize karşı antikorlardan daha karardır ve biyosensör birleşiminde uygulanmak üzere oldukça kolay modifiye edilirler. Aptamer üretiminde hayvanlara ihtiyaç duyulmadığından biyoetik gereklilikleri karşılamaktadır (Evtugyn ve Hianik, 2019).

Aptamerler ve antikorlar arasındaki karşılaştırma Tablo 2.2.’de sunulmuştur.

Tablo 2.2. Aptamerler ve antikorlar

Ölçüt	Aptamerler	Antikorlar
Boyut	Moleküler ağırlık aralığı: 6–30 kDa (20–100 nükleotid) 2 nm boyutunda	150–180 kDa, yüksek moleküler ağırlık 15 nm veya civarı
Tekrar kullanılabilirlik	Partiler arası yüksek tekrar kullanılabilirlik	Partiler arası büyük farklılıklar
Fiziksel ve Termal kararlılık	Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. Tersinir olarak denatüre edilebilir. Tekrar kullanılabilir	Sıcaklığa duyarlıdır. Kalıcı denatürasyona karşı hassastır. Tek kullanımlıktır.
Kimyasal Modifikasyon	Sentez sırasında veya seçimden önce kolaylıkla gerçekleştirilebilen çok sayıda bölgeye özgü kimyasal değişiklik	Sınırlı, spesifik olmayan ve tutarsız kimyasal değişimler.
Üretim	<i>In vitro</i> SELEX	Canlı organizmada biyolojik sistem
Hedefler	Organik moleküller, iyonlar, nükleik asitler, karbonhidratlar, amino asitler, peptitler, hücreler, toksinler, organik bileşikler ve antibiyotikler gibi çok çeşitli maddeler	Sadece bağışıklık uyarıcı maddeler, düşük toksinler
Taşıma, Depolama	Liyofilize edilebilen, kolayca taşınabilen ve oda sıcaklığında saklanabilen kalıcı kalite ve dayanıklılık	Kısa raf ömrü, kararsızlık. Soğuk zincir ile

Kaynak: (Sheraz vd., 2024).

2.6. Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM)

RSM, birden fazla bağımsız değişken ile bir veya daha fazla bağımlı tepki değişkeni arasındaki ilişkileri inceleyerek süreçleri ve ürün formülasyonlarını optimize etmek için yaygın olarak kullanılan bir istatistiksel deney tasarım yöntemidir. Bu yöntem, deneysel tasarımları optimize etmek amacıyla, bir dizi deneyi ampirik bir modele uyacak şekilde kurar ve ilgi alanındaki maksimum veya minimum tepkiyi elde etmek için modeldeki giriş değişkenlerinin optimum koşullarını belirlemek için matematiksel teknikler kullanır.

RSM tamamen incelenen süreci veya ürünü iyileştirmek, geliştirmek ve optimizasyonu sağlamak amacıyla iyi bilinen regresyon ve varyans analizi prensiplerine dayanmaktadır. Bu onu çeşitli endüstri dallarında üretkenliği ve kaliteyi artırmada kullanılan bir yöntem haline getirir.

RSM'nin önemi, analiz için kapsamlı veri toplamak üzere faktör seviyelerinin kombinasyonlarını stratejik olarak seçmeyi içeren deneysel tasarıma yönelik sistematik yaklaşımında yatmaktadır. RSM'de kullanılan Merkezi Bileşik Tasarım (CCD) ve Kutu-Behnken Tasarımı (BBD) gibi yaygın deneysel tasarımlar, faktör alanının verimli bir şekilde keşfedilmesini kolaylaştırır ve böylece temel etkileşimleri ve etkileri yakalar. Metodoloji genellikle, altta yatan kalıpları açıklamak ve test edilmemiş koşullar altında tepkileri tahmin etmek için deneysel verilere matematiksel modeller yerleştirildiği regresyon analizini içerir (Bell, 2009; Meega ve Rupak, 2023).

3. LİTERATÜR ÖZETİ

Son zamanlarda aptamer esaslı biyosensörler, patojenik bakterilerin, mikotoksinlerin ve ağır metallerin tespitinde gıda güvenliğini sağlamak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Wu vd., 2016). Ancak PAT kontaminasyonunun görüldüğü gıdaların, yaygın bir kullanım alanına sahip olmasına ve maddi açıdan değerli besin maddelerinde görülmesine rağmen, PAT ile ilgili genel ve aptamer temelli çalışma sayısının azlığı dikkat çekmektedir. Tablo 3.1.'de Scopus veri tabanında bazı anahtar kelimeler ile bunlara ait arama sonuçları listelenmiştir. Arama kelimeleri başlık, özet ve anahtar kelimeler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların bir kısmı PAT'ın immünosensör ile tespit edilmesi ile ilgilidir ve sinyal artırma çabaları olmaksızın 10 pg/mL tespit sınırı (LOD) rapor edilmiştir (Riberi vd., 2020).

Moleküler baskılanmış polimer (MIP)/elektrokimyasal (Hatamluyi, Behnaz vd., 2020; Huang vd., 2019b), Froster rezonans enerji transferi (FRET) floresan sensör (Khan vd., 2020; Ma vd., 2018; Wu. vd., 2018), agregasyon ile etkilenmiş emisyon (AIE) floresan (Zhang vd., 2020), MIP/ yüzeyde güçlendirilmiş SERS (Wu vd., 2019; Zhu vd., 2020), immünolipozom esaslı floresan (Song vd., 2019), 4-merkaptobenzoik asit/Au nanopiramit ile SERS (Kang vd., 2019) çalışmalar bulunmaktadır.

ZnO nanoçubuklar (He ve Dong 2018), ZnO nano-çiçek ve poröz Zr-metal organik iskele/metilen mavisi (MB) (He ve Dong, 2019), siyah fosfor nanotabakaları (Xu vd., 2019b) ile ilgili çalışmalar mevcuttur.

Tablo 3.

Anahtar Kelime	Makale	İnceleme Makalesi
PAT	1954	305
PAT+ Electrochemicial	40	8
PAT+ Electrochemicial+Aptamer	16	4

Tablo 3.

Yöntem	Numune	Aralık	LOD	Açıklama*	Referans
Elektrokimyasal	Tampon	0,5 - 50000 pg/mL	0,27 pg/mL	Aptasensör, Au elektrot, ZnO nanoçubuklar (ZnO-NRs) ve kitosan, A1*	(He ve Dong, , 2018)
Elektrokimyasal	Sulu çözelti	0,1 nM - 10,0 µM	4,62 pg/mL	Aptasensör, GCE, siyah fosfor nanolevhalar, A1*	(Xu vd., 2019b)
Elektrokimyasal	Elma suyu	0,01 - 10 ng/mL	9,8 pg/mL	İmmünoensör – elektrokimyasal – İmpedimetrik – GC elektrot	(Riberi vd., 2020)
Elektrokimyasal	Elma suyu	0,001-70 ng/mL	0,7 pg/mL	MIP- Au@Cu-MOF/N-GQDs GC elektrot – CV	(Hatamluyi vd., 2020)
Elektrokimyasal	Tampon	5-200 ng/mL	5 ng/mL	GC elektrot, immunosensor, rGO	(Song vd., 2021)
Elektrokimyasal	Elma suyu Elma şarabı	5x10 ⁻⁵ – 0,5 ng/mL	0,04 pg/mL	DNA walker, Pt@AuNRs/Fe-MOFs/PEI-rGO elektrokimyasal, CV, A1*	(He ve Dong, 2021)
Elektrokimyasal	Elma suyu	5x10 ⁻⁸ -0,5 µg/mL	30 fg/mL	Aptasensör, Tetrahedral DNA nanoyapı, tiyonin etiketlenmiş Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklar/ rGO elektrokimyasal, A1*	(He ve Lu, 2020)
Elektrokimyasal	Elma suyu	5x10 ⁻⁸ -0,5 µg/mL	0,015 pg/mL	Aptasensör, Hiyeşik poröz Zr-metal organik iskele, MB, kitosan/ ZnO nano-çiçek ve AgNP elektrokimyasal sensör, aptamer, A1*	(He ve Dong, X., 2019)
Elektrokimyasal	Elma suyu Üzüm suyu	0,002-2 ng/mL	0,001 ng/mL	Poli(tiyonin) MIP, PtNP ve azot doplanmış grafen, elektrokimyasal	(Huang vd., 2019b)
Elektrokimyasal	Elma suyu	1-25 ng/L	2,8 ng/L	Aptasensör, Karboksi-amin polietilen glikol spacer üzerinden dizeonyum tuzu ile karbon SPE üzerine immobilize elektrot, EIS, A1*	(Khan vd., 2019)

Tablo 3.2. Tablonun Devamı

Yöntem	Numune	Aralık	LOD	Açıklama*	Referans
Floresans	Elma suyu Üzüm suyu	0,5- 30 ng/mL	0,28 ng/mL	Aptasensör, manyetik NP ve rGO, DNase I, A1*	(Ma vd., 2018)
Floresan	Tampon çözelti	0,01 - 100 ng/mL	3 pg/mL	Aptasensör, FRET, ekzonükleaz katalizlenmiş hedef dönüşüm stratejisi, A1*	(Wu vd., 2018)
Floresan	Sulu çözelti	15- 35000 pg/mL	6 pg/mL	Aptasensör, FRET, DNA dupleks yapının skülmesi ve hedef bağlanması ile aktive olan flüoresan etiketli DNA sekans salımı, A1*	(Ahmadi vd., 2019)
Floresan	Tampon çözelti	5-350 ng/mL	0,13 ng/mL	Aptasensör, carboxyfluorescein boya ve –COOH fonksiyonelleştirilmiş MWCNT nano-sönümleyici, A1 ve farklı aptamer*	(Khan vd., 2020)
Floresan	Elma suyu Üzüm suyu	0,001-100 ng/mL	0,042 pg/mL	DNA G-kuadrupleks agregasyon etkili emisyon, Floresan, A1*	(Dong vd., 2020)
Floresan	Elma suyu	0-150 ng/mL	8 ng/mL	İmmünolipozomlar ve immünomanyetik nanoparçacıklar, Floresan	(Song vd., 2019)
Kolorimetri	Elma suyu	50-2500 pg/mL	48 pg/mL	Aptasensör, enzim-kromajenik kolorimetrik analiz	(Wu vd., 2016)
LC	Elma suyu Armut suyu	2–40 ng/mL	0,5 ng/mL	MIP-SPE-HPLC	(Yang vd., 2016)
LC	Elma suyu	50–5000 ng/mL	6 ng/mL	MISPE-HPLC	(Lhotská vd., 2017)
LC	Elma suyu	1–400 ng/mL	0,15 ng/mL	Benzofuran -2- karboksilik asit yüklü manyetik nanokompozit MSPE-HPLC	(Yu ve Fan, 2017)

Tablo 3.2. Tablonun Devamı

Yöntem	Numune	Aralık	LOD	Açıklama*	Referans
LC	Elma suyu	2 - 2000 ng/mL	0,5 ng/mL	HPLC	(Li vd., 2018)
LC	Elma suyu	0,008-8 nM	2,17 pM	UHPLC-MS/MS, aptamer fonksiyonelleştirilmiş monolitik kapiler kolon, A1*	(Zhang vd., 2021)
QCM	Elma suyu Armut suyu	7,5 - 60 ng/mL	3,1 ng/mL	MIP-sensor QCM	(Fang vd., 2016)
SERS	Tampon çözelti	7-5000 pM	0,83 pg/mL	MIP-SERS, AuNPs	(Wu vd., 2019)
SERS	Portakal suyu	0,5 pM – 1 µM	0,85 pM	Au/poli dimetilsiloksan/ anodik alümina membran, MIP, SERS	(Zhu vd., 2020)
SERS	Elma suyu	10-3000 ng/mL	6 ng/mL	4-merkaptobenzoik asit, Au-nanopiramit, SERS	(Kang vd., 2019)

A1: Aptamer 1 (Wu vd., 2016)	QCM: Kuvars kristal mikroterazisi
A2: Aptamer 2 (Tomita vd., 2016)	HPLC: Yüksek performans sıvı kromatografisi
SPE: Katı faz ekstraksiyonu	NP: Nanoparçacık
MIPSPE: Moleküler olarak baskılanmış katı faz ekstraksiyonu	MSPE: Manyetik katı faz ekstraksiyonu
UHPLC: Ultra yüksek performans sıvı kromatografisi	FRET: Förster rezonans enerji transferi
MWCNT: Çok duvarlı karbon nanotüp	GC: Camsı karbon
rGO: İndirgenmiş grafen oksit	GCE: Camsı karbon elektrot
MB: Metilen mavisi	MS/MS: İkili kütle spektrometrisi
MOF: Metal organik ağ	PEI: Polietilenimin
	GQDs: Grafen kuantum noktacıklar

PAT için bir saptama yöntemi geliştirmek üzere yapılan çeşitli çalışmalar Tablo 3.2.'de özetlenmiştir. Genel olarak PAT tespitinde kullanılan teknikler, PAT için belirlenen sınır değerini (50 ng/g) karşılamaktadır.

Literatürde sıklıkla kullanılan PAT aptameri, üssel zenginleştirme yöntemi (SELEX) ile 15 tur pozitif ve negatif seçimin ardından geliştirilmiş olan sekiz aptamer adayından seçilmiştir (Wu vd., 2016). Bu PAT-11 dizisinin, $21,83 \pm 5,022$ nM'lik bir ayrılma sabiti ile yüksek afinite ve mükemmel seçicilik ile PAT'a bağlandığı rapor edilmiştir. Seçilen aptamer, PAT-11, daha sonra, bir enzim-kromojenik substrat sistemine dayalı olarak PAT için bir saptama yöntemi geliştirmek üzere bir tanıma elemanı olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Kolorimetrik aptasensörün 50 ila 2500 pg/mL arasında doğrusal bir aralık sergilediği ifade edilmiştir (Wu vd., 2016).

Aptamer tabanlı floresan sensörde önceden rapor edilen iki aptamer (Tomita vd., 2016; Wu vd., 2016) ve araştırmacılar tarafından önerilen bir diğer aptamer kullanılmıştır. Sönümleyici olarak $-\text{COOH}$ ile işlevselleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler) uygulanırken, floresan boya olarak karboksifloresein (CFL) kullanılmıştır. LOD ve nicelleştirme sınırı (LOQ) sırasıyla 0,13 $\mu\text{g/L}$ ve 0,41 $\mu\text{g/L}$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, gıdalarda yaygın olarak bulunan mikotoksinler de aptasensörün seçiciliğini doğrulamak için test edilmiştir. Geliştirilen aptasensör elma suyu numunesine uygulanmış ve %96 ila %98 arasında değişen toksin geri kazanımları gözlenmiştir (Khan vd., 2020). FRET stratejisine dayalı bir diğer çalışmada eksonükleazla katalize edilen hedef geri dönüşüm stratejisi kullanılmıştır. 0,01 ng/mL- 100 ng/mL arasında doğrusal sonuç veren bu çalışmada LOD 0,003 ng/mL olarak hesaplanmıştır (Wu vd., 2018). Fotoindüklenmiş enerji transferi kullanılan bir çalışmada ise moleküler olarak baskılanmış polimerde kuantum noktacıklar ile PAT tespit edilmiştir (Zhang vd., 2017).

Elektrokimyasal sensör tarafında ise, GCE siyah fosfor nano-tabakalar (BP NS'ler) ile modifiye edilmiş ve PAT aptamer kullanılan bir impedans yöntemi rapor edilmiştir. PAT için LOD 0,3 nM ve 1,0 nM-1,0 μM tespit aralığı rapor edilmiştir (Xu vd., 2019a). Altın elektrot, ZnO nanoçubuklar ve kitosan modifikasyonlarının kullanıldığı bir elektrokimyasal çalışmada ise 50 ng/mL ila 0,5 pg/mL PAT konsantrasyon aralığında ve 0,27 pg/mL LOD elde edilmiştir (He ve Dong, 2018). Aptamerin konformasyonel değişim sağlaması ile direncin artması temelinde impedans spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise 1 ile 25 ng arasında iyi bir doğrusal aralık elde edilmiştir. LOD ve LOQ sırasıyla 2,8 ng/L ve 4,0 ng/L olduğu rapor edilmiştir (Khan, 2019).

Ancak PAT kontaminasyonunun görüldüğü gıdalar yaygın bir kullanım alanına sahip olmasına ve maddi açıdan değerli besin maddelerinde de görülmesine rağmen, PAT tespiti ile ilgili genel ve aptamer temelli çalışma sayısının azlığı dikkat çekmektedir. 2021 yılı hariç, özellikle PAT sensörleri ve PAT aptasensörleri üzerinde yapılan çalışmaların artış trendi izlediği görülmektedir.

PAT tespiti için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen, kromatografik yöntemler referans yöntem olarak kabul edilir. PAT kontaminasyonunun tespiti için ilk rapor edilen yöntem, ters fazlı HPLC yöntemidir. PAT'ın numunelerden etil asetat ile ekstraksiyonunun ardından sodyum karbonat çözeltisi ile muamelesi ve su, su-tetrahidrofur ve su-asetonitril mobil faz olarak kullanıldığı yöntemde tespit 254 ya da 276 nm'de gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin tespit sınırı 10 ng/mL civarında olmuştur (Brause vd., 2020).

PAT tespiti için kromatografik yöntemlerin en büyük sorunu, özellikle bazik ortamda saflaştırma veya analiz öncesi türevlendirme basamaklarında ortaya çıkan toksin stabilitesi olmaktadır (Rovira vd., 1993).

Bu nedenle kromatografik yöntemlerde çeşitli enstrümental yaklaşımlar ve numune hazırlama teknikleri üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Böylece numunelerde PAT kaybı olmaksızın ng/mL mertebesinde daha düşük tespit sınırında ve güvenilir kromatografik yöntemler rapor edilmiştir. Çoğu kromatografik yöntem, izin verilen maksimum PAT kontaminasyon sınırı olan 50 ng/mL değerinin altında tespit sınırına sahiptir (Llovera vd., 1999).

PAT tespitinde kullanılan kromatografik yöntemler ile ilgili ayrıntılı bir inceleme makalesi mevcuttur (Notardonato vd., 2021).

Bununla birlikte kromatografik yöntemler ile ilgili kısa bir literatür incelemesi uygun olacaktır. Böylece PAT tespiti ve piyasada bulunan ürünlerde PAT kontaminasyonu hakkında genel bir bilgi de edinilebilir.

PAT kontaminasyonunun incelendiği bir çalışmada, PAT, 100 adet elma suyu örneğinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ayrıldıktan sonra misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) ile belirlenmiştir. Örneklerin %66'sında 0,7 ng/mL olan LOD değeri üzerinde PAT kalıntısı tespit edilmiştir. Ortalama PAT seviyesinin 0,7- 118,7 ng/mL aralığında ve numunelerin %11'inde PAT kalıntı seviyesi 50 ng/mL 'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada; İspanya'da, 15 yıl önce yayınlanan verilere göre önemli bir değişiklik gözlenmediği

vurgulanmıştır (Murillo-Arbizu vd., 2009). Bir diğer çalışmada, Suudi Arabistan'da ticari olarak temin edilen 120 elma suyu numunesinde PAT kalıntısı mevzuata uygun yöntemle XDB C18 kolonunda ters faz HPLC ile tespit edilmiştir ve numunelerde kalıntı miktarının 57 - 104 ng/mL olduğu bulunmuştur (Gashlan, 2009). Elma suyunda PAT tespiti ve kontrolü için temel özellikler, PAT oluşumu, toksikolojik önemi ve PAT tespit yöntemleri hakkında bir inceleme makalesi bulunmaktadır (Welke vd., 2009).

Morales ve arkadaşları geleneksel teknolojilere kıyasla, biyolojik kontrol ajanlarının ve kontrollü atmosferin elma çürümesi ve PAT birikimi üzerindeki etkilerini incelemiştir (Morales vd., 2010). Aynı tarihlerde İran'ın güneybatısındaki bir fabrikadan alınan çeşitli ticari elma suyu örneklerinde HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen analizde PAT kalıntı seviyelerinin 26 –92 ng/mL olduğu bulunmuştur (Jalali vd., 2010).

Portekiz'de pazarlanan 68 elma suyu (32 açık ve 36 bulanık) ve 76 homojenize elma püresi dâhil olmak üzere 144 elma bazlı gıdanın analizinde (HPLC yöntemi), 33 örnekte 1,2 ng/mL -42 ng/mL aralığında PAT kalıntısı tespit edilmiştir (Barreira vd., 2010). Aynı çalışmada, PAT kalıntısı bebek içeceklerinde tespit edilmemiş, ancak, bebekler ve küçük çocuklar tarafından tüketilmek üzere etiketlenmiş beş homojenize edilmiş elma püresi örneğinde tespit edilmiştir. Bulanık meyve sularında (%67), berrak olanlara (%13) kıyasla yüksek pozitif PAT insidansı tespit edilmiştir. PAT tespitinin yanı sıra, PAT kontaminasyonunun azaltılmasına yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Yaklaşık 100 mJcm⁻² UV ışınına maruz bırakılan taze elma şarabında mevcut PAT kontaminasyonunun %9,4 -%43,4 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Dong vd., 2010). Ancak bu miktarın oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu çalışmalar, PAT kontamine gıda ürünlerinin görülme sıklığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Kontaminantların bir arada tespiti için de farklı HPLC metotları denenmiştir. Gıda ürünlerinde furfuraldehitlerin ve PAT'ın aynı anda belirlenmesi için geliştirilen yöntemde furfuraldehitler %6 ila %100 geri kazanımla tespit edilirken PAT kazanımının %90 olduğu rapor edilmiştir. Bu yöntem bal, beyaz ve demerara sofr şekerleri, beyaz ve kırmızı balzamik sirke, karamel, besin takviyesi, şeker ikamesi, elma suyu (berrak ve bulanık) ve ayrıca küfle enfekte bir elmayı içeren farklı ticari gıda matrislerine uygulanmıştır (Gaspar ve Lucena, 2009).

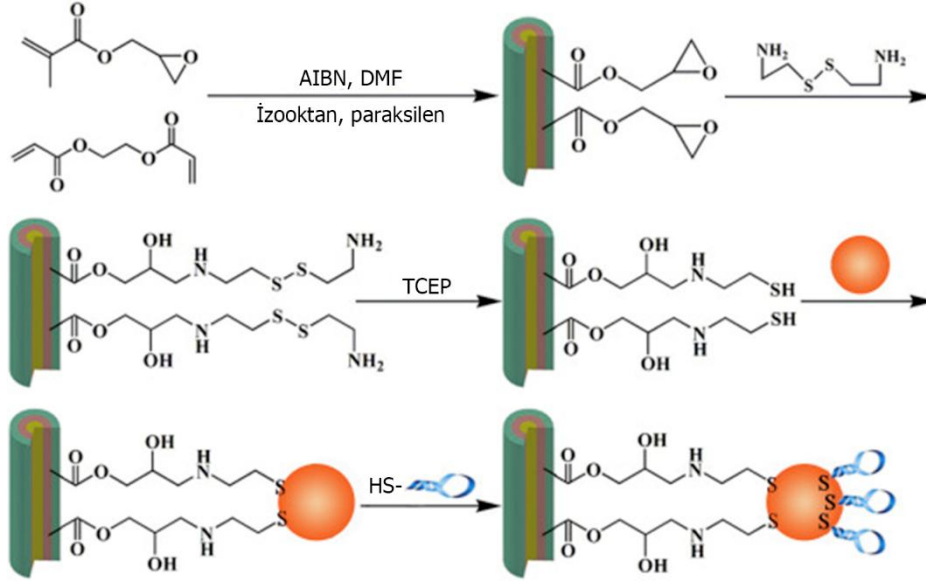
Bir diğer çalışmada ise Çin'in Shandong eyaletinden alınan buğday unu örneklerinde 86,7 ng/g'a varan mikotoksin kalıntısı tespit edilmiştir (Li vd., 2016).

Kromatografik yöntemlerde numuneden PAT ekstraksiyonu için de farklı yaklaşımlar önerilmiştir. Örneğin, Wang ve arkadaşları elma suyunda PAT'ın izolasyonu için grafen oksit (GO) bazlı bir manyetik nanokompozit geliştirmiştir. Bilinen HPLC yönteminin kullanıldığı bu çalışmada manyetik katkılı grafen oksitin (MGO) kullanıldığı yöntemde 2,3 ng/mg LOD elde edilmiştir. Bu çalışmada geri kazanım %68,7-83,6 arasında değişmiş ve bağıl standart sapma (RSD) %1,8 - %8,7 arasında olmuştur (Wang vd., 2017). Bu çalışmada elde edilen değerler, Brause ve arkadaşlarının yöntemine göre RSD cinsinden yaklaşık on kat daha tekrarlanabilir sonuç vermiştir (Brause vd., 2020).

MIP, bir analitin polimer üretilmesi sırasında yapıya yerleştirilmesi ve ardından sökülerek analite uygun boşlukların elde edilmesine dayalı bir sentetik ligandır. Lucci ve arkadaşları elma suyu, püre ve reçel örneklerinden PAT tespitinde numune deriştirme sürecinde sorbent olarak MIP (Affinisep SPE PAT) kullanmıştır. MIP kolonunun ön-deriştirme için kullanımında ilave bir kimyasal derivatasyon kullanılmamış ve ön deriştirme kolonunda toplanan PAT dietil eter ile ekstrakte edilerek analiz edilmiştir. Bu çalışmada %77'den büyük geri kazanım sağlanmış ve RSD değerinin %11'in altında olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem 2-100 ng/mL aralığında lineer cevap vermiştir (Lucci vd., 2017). Bir diğer MIP çalışmasında HPLC analizi sırasında veya analiz öncesi kullanılan analit izolasyon kolonu ile sırasıyla 6 ng/mL ve 15 ng/mL LOD elde edilmiştir. Geri kazanım değerleri ise sırasıyla %81,2-109,9 ve %68,3-123,5 olmuştur (Lhotská vd., 2017).

Bir diğer deriştirme yaklaşımında 16 fonksiyonel monomer, 4 çapraz bağlayıcı ve 4 farklı porojenik çözücünün kullanımına dayanan 256 üyeli bir kombinatoriyal polimer kitaplığından PAT için uygun katı faz ekstraksiyon kolonu geliştirilmiştir. Bu çalışmada en iyi geri kazanım $83 \pm 5,6$ iken gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sırasıyla $\pm 5,6$ ve $7,6$ bulunmuştur (Giovannoli vd., 2017).

Deriştirme sürecinde bir diğer önemli yaklaşım, ligand olarak aptamerin kullanılmasıdır. SPME ve ardından ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi-ikili kütle spektrometresi (UHPLC-MS/MS) kullanılan bir çalışmada aptamer ile işlevselleştirilmiş monolitik kapiler polimer hibrit kullanılmıştır. Kapiler monolitik kolon, Au-nanoparçacık-tiyonin -poli ((glisidil metakrilat)- ko-poli (etilen glikol) diakrilattan imal edilmiştir (Şekil 3.1.). Bu yöntemle elde edilen LOD 2,17 pM olmuştur ve 8 pM-8 nM arasında bir doğrusal ölçüm aralığı elde edilmiştir. Gerçek numunelerde 4 pg/mL PAT kontaminasyonun %85,4- %106 geri kazanım ve %4,1-7,3 RSD ile tespit edilebildiği rapor edilmiştir (Zhang vd., 2021).



Şekil 3.1. Aptamer-fonksiyonel kılcal monolitik kolonun hazırlanması

Kaynak: (Zhang vd., 2021).

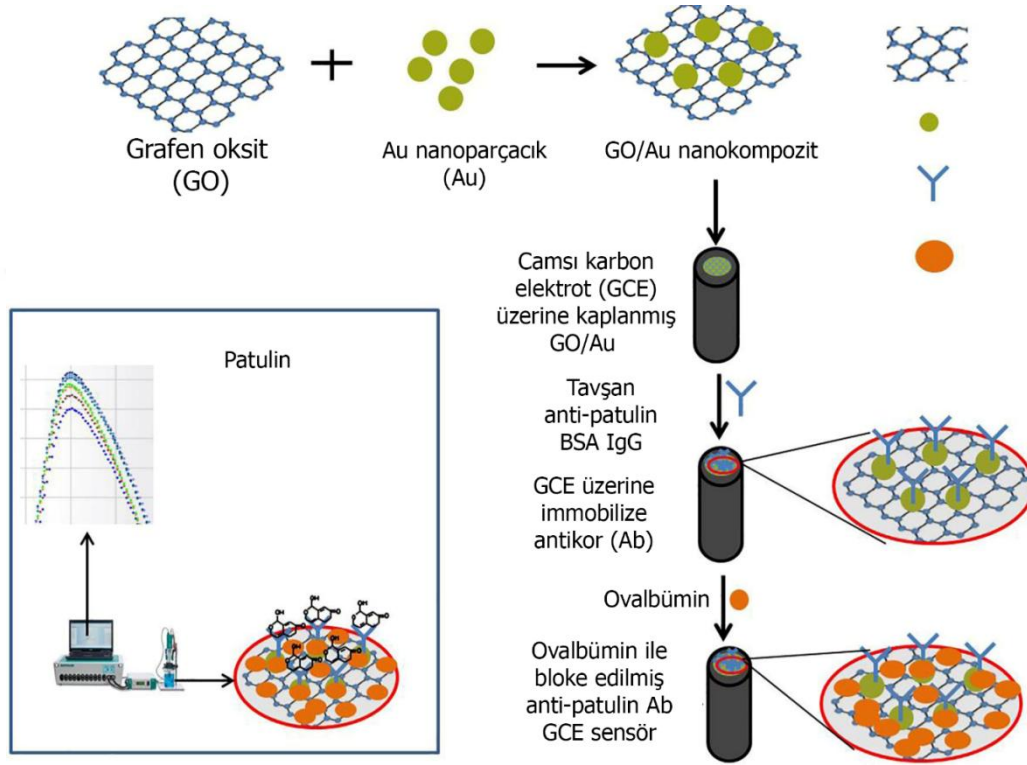
Genel durumun aksine, PAT'ın nispeten düşük moleküler kütleli bir toksin olması ve bu yaklaşımla tespitinde sınırlamalar nedeniyle PAT tespiti için sınırlı sayıda immünosensör yaklaşımı rapor edilmiştir (Riberi vd., 2020).

İmmünosensör PAT platformu için önerilen ilk çalışmalar flüoresan temelli yaklaşımları içermektedir. Pennacchio ve arkadaşları yaptıkları çalışmayla yakın kızılötesi floresan problemlerinin kullanımına dayanan yeni bir floresan polarizasyon immünoanaliz (FPIA) yaklaşımı sunmuştur. Yöntem, PAT ve floresan etiketli PAT türevi arasındaki yarışmalı bağlanma sonucu spesifik bir antikora bağlanmanın ardından floresan polarizasyon emisyonundaki artışı esas almıştır. Bu yöntemin LOD değerinin 0,06 ng/mL olduğu rapor edilmiştir (Pennacchio vd., 2015).

GCE üzerine GO konjuge poliklonal anti-PAT antikor kullanılarak elma suyundan PAT tespitinde EIS yöntemi kullanılmıştır. Sensörün 1×10^{-2} –10 ng/mL aralığında doğrusal cevap verdiği ve LOD değerinin 9,8 pg/mL olduğu belirlenmiştir. Sensör %86 geri kazanım ve %20 RSD ile yeterli analitik performans sağladığı rapor edilmiştir (Riberi vd., 2020).

GCE üzerinde PAT immünosensörde tavşan anti-PAT-BSA IgG'si GO /Au nanokompozit ile kaplanmış bir GCE üzerine immobilize edilerek tespit gerçekleştirilmiştir (Song vd., 2021). PAT tespiti 5 ng/mL –200 ng/mL arasında doğrusal sonuç veren immünosensör ile 5 ng/mL LOD elde edilmiştir.

Çoklu toksik mikotoksinlerin tespitine yönelik bir çalışmada AFB1, OTA- A ve ZEA için bir görüntülemeli RSM platformu rapor edilmiştir. Bu immünoanaliz için monoklonal mikotoksin antikorları, poli (oligo (etilen glikol) metakrilat-ko-glisidil metakrilat) moleküler fırça üzerine immobilize edilmiş ve sinyal artırmak için Au nanoparçacıklar (AuNP) kullanılmıştır. Bu çalışmada üç mikotoksin için, 8, 30 ve 15 pg/mL’lik LOD değerleri elde edilmiştir (Hu vd., 2014).



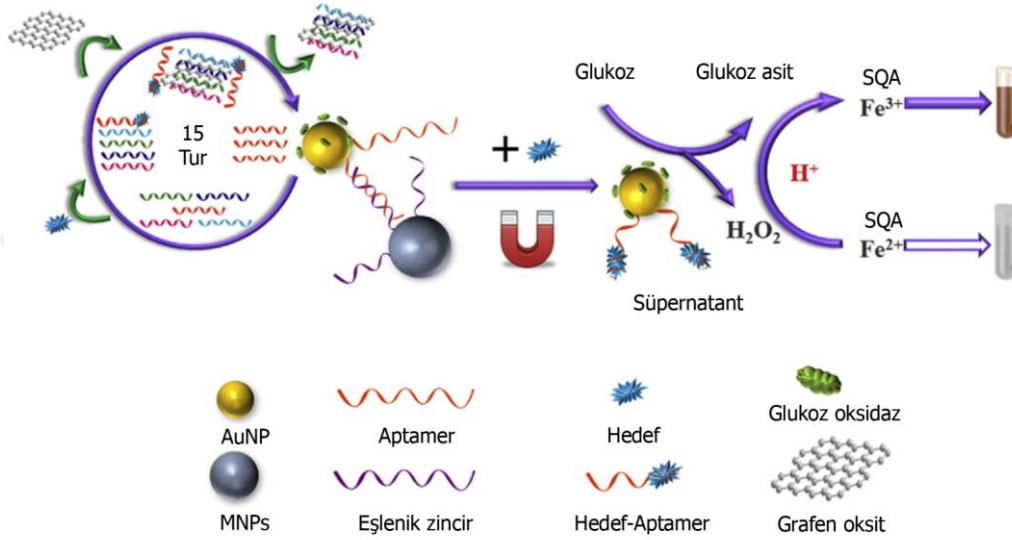
Şekil 3.2. PAT tespiti için immobilize edilmiş GCE sensörünün hazırlanmasına ilişkin şematik çizim

Kaynak: (Song vd., 2021).

Aptamerlerin sağladığı avantajlar nedeniyle seçici ve tekrarlanabilir sensör platformlarının oluşturulması sağlanmaktadır. Ancak, PAT için sınırlı sayıda aptasensör çalışması mevcuttur. Literatürde sıklıkla kullanılan PAT aptameri, SELEX ile 15 tur pozitif ve negatif seçimin ardından geliştirilmiş olan sekiz aptamer adayından seçilmiştir. Bu PAT-11 dizisi (3'-GGCC CGCC AACC CGCA TCAT CTAC ACTG ATAT TTTA CCTT- 5'), $21,83 \pm 5,022$ nM'lik bir ayrılma sabiti ile yüksek afinite ve mükemmel seçicilik ile PAT'a bağlandığı rapor edilmiştir (Şekil 3.2.). Seçilen aptamer, PAT-11, daha sonra, bir enzim-kromojenik substrat sistemine dayalı olarak PAT için bir saptama yöntemi geliştirmek üzere

bir tanı elemanı olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Kolorimetrik aptasensörün 50 ila 2500 pg/mL arasında doğrusal bir aralık sergilediği ifade edilmiştir.

Literatürde PAT için geliştirilen bir diğer aptamer ise 5' - GGGT AGGG CGGG TTGG GAGC TATT CCTG CGGG CGCT GTTC GCCT AGTC GGAA GGGA TCCC -3' dizilimindedir (Tomita vd., 2016).

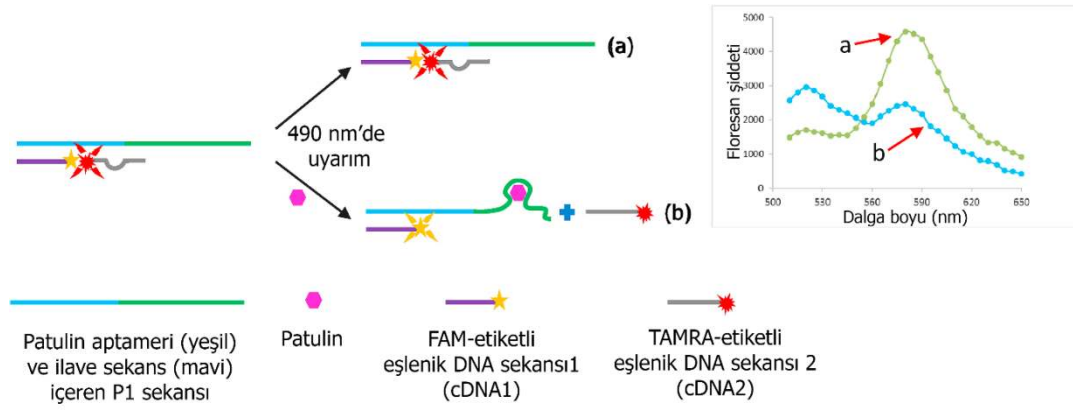


Şekil 3.3. GO-SELEX prosedürü ve PAT tespiti için bir kolorimetrik aptasensör kullanılarak PAT'a karşı aptamer seçiminin şematik gösterimi

Kaynak: (Wu vd., 2016).

Diğer bir çalışmada, manyetik nanoparçacık, rGO ve DNase I kullanımına dayalı bir florometrik PAT sensörü rapor edilmiştir. 6-karboksiflorescein ile etiketlenmiş PAT aptamerinin floresanı, FRET nedeniyle manyetik nanoparçacık konjuge rGO-Fe₃O₄ ile sönümlenmiştir. Bununla birlikte, PAT varlığında, etiketli aptamer rGO-Fe₃O₄'ten sıyrılır. rGO-Fe₃O₄ daha sonra manyetik olarak ayrılır, böylece serbest etiketli PAT aptamerinin floresanı eski haline getirilir. Bu yöntemle PAT için tespit limitinin 0,28 ng/mL olarak rapor edilmiştir (Ma vd., 2018).

FRET stratejisine dayalı bir diğer çalışmada eksonükleazla katalize edilen hedef geri dönüşüm stratejisi kullanılmıştır. Doğrusal aralığın 0,01 ng/mL 'den 100 ng/mL olduğu bu çalışmada ortalama geri kazanımlar %93,33 ile %105,21 arasında değişmiştir. Geliştirilen yöntem için toplam analiz süresi yaklaşık 50 dakikadır. Araştırmacılar, 0,003 ng/mL LOD rapor etmiştir (Wu vd., 2018).



Şekil 3.4. PAT tespiti için oranlı metrik floresan aptasensörünün işlevini gösteren şematik diyagram

Kaynak: (Ahmadi vd., 2019).

Oransal floresan ölçümü ve tek sarmal yer değiştirme stratejisi kullanılan yöntemde (Şekil 3.4.), PAT varlığında, DNA dubleks yapısının sökülmesi ve TAMRA etiketli eşlenik DNA dizisinin hedef aracılı salınımı nedeniyle sinyal azalması ile 15 pg/mL- 35 ng/mL arasında doğrusal aralık ve 6 pg/mL LOD elde edilmiştir (Ahmadi vd., 2019).

PAT için aptamer temelli biyosensör geliştirilmesinde daha sık kullanılan platform elektrokimyasal metodolojiler olmuştur. PAT spesifik aptamerlerin seçiminin yakın tarihte olması nedeniyle de aptamer temelli biyosensörler hakkında da sınırlı sayıda ve yakın tarihli çalışmalar yapılmıştır.

PAT için geliştirilen impedimetrik tabanlı aptasensörde, bir GCE siyah fosfor nano-tabakalar (BP NS'ler) ile modifiye edilmiş ve elektrostatik çekim ile PAT aptamer ile modifiye edilmiştir. Algılama basitçe, modifiye edilmiş elektrot yüzeyindeki elektron transfer direncinin artması ile sağlanmıştır. Bu aptasensör PAT'ı 0,3 nM LOD 1,0 nM'den 1,0 µM'ye kadar uzanan doğrusal bir aralıkta algılamıştır. Ardından aynı çalışmada, sensörün performansını artırmak için, BP-NS-GCE, AuNP ve ardından tiyollü PAT aptameri ile modifiye edilerek, bu elektrot 0,18 V (Ag/AgCl'ye kıyasla) uygulanan bir potansiyelde çalıştırılmış ve daha geniş bir doğrusal aralıkta (0,1 nM ila 10,0 µM), daha düşük bir algılama sınırı (0,03 nM) elde edilmiştir (Xu vd., 2019b).

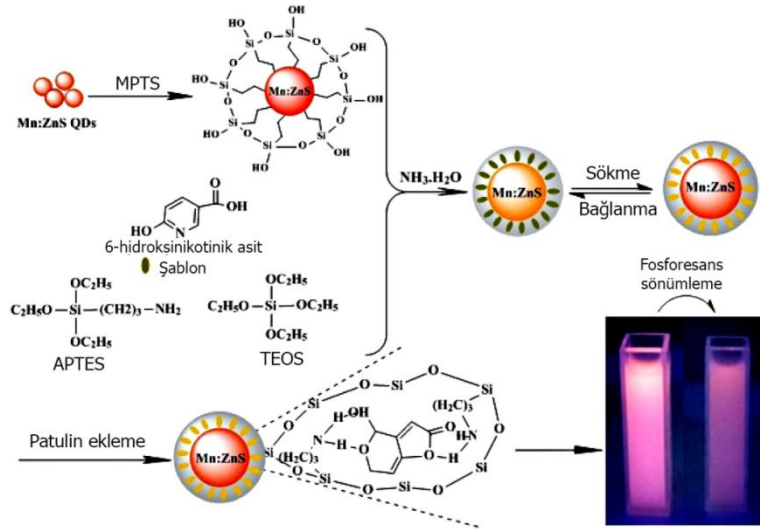
Sinyal amplifikasyon adımı bir diğer yaklaşım walker-DNA'yı (wDNA) ele almıştır. Bu yaklaşımda, wDNA ile bağlı PAT-spesifik aptamer, analit PAT ile etkileşimden sonra serbest bırakılmış ve daha sonra, wDNA, Nb.BbvCI endonükleaz ile birlikte, yüzeye immobilize edilmiştir. Zr-MOFs etiketli oligonükleotidler büyük miktarda metilen mavisi

(MB) yükleyerek sinyal amplifikasyonu sağlanmıştır. Bu çalışmada, altın-platin çekirdek@kabuk nanorodları/demir bazlı metal-organik iskele/poli(etilenimin) indirgenmiş grafen oksit kompozit elektrot modifikasyonu kullanılarak 40 fg/mL'lik bir tespit sınırı bildirilmiştir (He ve Dong, 2021).

Özellikle son yıllarda ligand olarak bir biyolojik kökenli bileşenin alternatifi olarak MIP da kullanılmaktadır. MIP yönteminde, analit olacak molekülün bir konak üzerine zayıf veya kuvvetli bağlar ile bağlanması ile oluşan bir şablon içeren bir polimer dökülmesi ve daha sonra bu şablon molekülün çıkarılması ile elde edilen kavitenin analit için kullanılması esastır (BelBruno, 2019). Prensip olarak "kilit ve anahtar" mekanizmasına benzediği için antikör-antijen biyoafinitesi çiftinin sentetik analogları olarak tanımlanır. Ana bileşen olarak polimer içerdiği için de maliyet, kararlılık ve sıcaklığa dayanıklılık gibi avantajlara sahiptir.

MIP yapılar herhangi bir kuantum noktacıları (QD) üzerine kaplanabildiği için, optik sensör yöntemlerinin ilk adaylardan biri olması kaçınılmazdır. Mn katkılı ZnS QD temelli bir MIP için şablon olarak 6-hidroksinikotinic asit, fonksiyonel monomer olarak 3-aminopropiltrioksilan ve baskı için çapraz bağlayıcı olarak tetraetoksilan kullanılarak sol-jel yöntemi kullanılmıştır. Foto-indüklü elektron transfer mekanizması ile sensörün baskılı boşlukları ile yüksek polariteli PAT bağlanması ile oluşan fosforesans söndürme ile analitik sonuç elde edilen bu çalışmada 0,43–6,50 μ M doğrusal aralık ve 0,32 μ M LOD elde edilmiştir. Elma suyu örneklerinde, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile iyi uyum gösteren, bağlı standart sapmaları <4,95 olan %102,9-127,2 oranında geri kazanımlar elde edilmiştir (HPLC) ($P > 0,05$) (Zhang vd., 2017).

Bir diğer çalışmada ise MIP, azot doplanmış grafen kuantum noktacılar ve AuNP fonksiyonelleştirilmiş bakır-metal organik iskele kullanılarak 7×10^{-5} ng/mL LOD elde edilmiştir (Hatamluyi vd., 2020). Platin nanoparçacık üzerine azot doplanmış grafen ve politiyonin MIP uygulanarak gerçekleştirilen bir elektrokimyasal çalışmada ise gerçek numunelerden 0,001 ng/mL LOD ile PAT tespit edilmiştir (Huang vd., 2019a).



Şekil 3.5. PAT'ın fosforesans tespiti için bir nanosensör olarak MIP-QD'lerin sentez şeması

Kaynak: (Zhang vd., 2017).

Literatürdeki bazı uygulamalar, farklı mikotoksinlerin tespitinde kullanılmış olsa da henüz PAT ile ilgili bu tür uygulamalar rapor edilmemiştir. Örneğin, AFB1 ve ZEA tespiti için *Escherichia coli* esaslı bir elektrokimyasal biyosensör önerilmiştir. Tanı elemanı olarak *E. coli* ve mediyatör olarak p-benzokinon kullanılan bu çalışmada 1 ng/mL LOD ve 0,01-0,3 µg/mL aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir. Bu yaklaşımda, *E. coli* için sitotoksosite esas alındığından farklı toksinlerin bir arada ve ayrı ayrı etkilerini belirlemek de mümkün olmuştur. Bu sensörün gerçek numunelerde uygulanması da güvenilir sonuçlar vermiştir (Chen vd., 2020).

Plazmonik biyosensör platformlarından SPR ise farklı mikotoksinlerin tespitinde kullanılmasına rağmen PAT için rapor edilmemiştir. AFB için geliştirilen bir SPR sensörde tanıyıcı eleman olarak aptamer kullanılmıştır. Optimizasyondan sonra SPR sensörün analitik performansı, tampon çözeltide, 1,5 ila 50 ng/mL doğrusal aralık ve 0,19 ng/mL LOD olmuştur. Elma şarabı örneklerinden analit geri kazanım % 96,3 ile 117,8 arasında değişmiştir (Wu vd., 2018). Çeşitli tespit yöntemleri arasında, kolorimetrik ve SERS teknikleri kapsamlı bir şekilde karşılaştırılmıştır. Örneğin, yakın zamanda yapılan bir çalışmada, LOD 1,5 pg/mL ile OTA-A'yı tespit edebilen bir kolorimetrik aptasensör bildirilmiş ve pirinç gibi gerçek numune analizlerinde verimliliğini göstermiştir (Zhang vd., 2024).

SERS tabanlı bir başka yöntemde tespit, 1,6 pg/mL'lik daha düşük bir LOD ile 0,0156 ila 31,2 ng/mL aralığındaki AFB1 konsantrasyonları için doğrusal bir yanıt elde edilmiştir (Evtugyn vd., 2021).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında, PAT tespitine yönelik olarak yapısal anahtarlama aptamer tabanlı elektrokimyasal sensör ile impedimetrik aptasensör tasarlanmış; her iki çalışmanın aşamaları ayrı başlıklar hâlinde düzenlenmiştir.

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan cihaz ve kimyasallar

Bu çalışma kapsamında tüm ölçümler, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirilirken Ivium potansiyostat (Ivium Technologies, B.V., Hollanda) ve Autolab marka Kompakt potansiyostat/galvanostat (Metrohm) cihazları kullanılmıştır. Deneyler, Dropsens markasının yerel distribütöründen temin edilen, çalışma elektrodu yüzey alanı $0,126\text{ cm}^2$ olan SPE (DRP-110) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan kimyasallar aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup, analitik derecededir. Sulu çözeltilerin hazırlanması ve durulama adımlarında $18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ direnç değerine sahip ultra saf su (UPW) kullanılmıştır. Literatürden (Zuker, 2003) seçilen PAT'ı tanımak için özel olarak tasarlanmış MB-modifiye PAT aptamer probu (MB-aptamer), Ella Biotech'ten (Almanya) temin edilmiştir. MB-aptamerin 23°C 'deki nükleotid dizilimi ve sekonder yapısı Tablo 4.1' de verilmiştir (Schmidt vd., 2022; Zuker, 2003). Liyofilize edilmiş aptamer, herhangi bir ek işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır.

İmpedimetrik aptasensör geliştirilmesi deneylerinde kullanılan PAT 'a özgü aptamer probu (SH-aptamer), Ella Biotech'ten (Almanya) firmasının yerel temsilcisinden temin edilmiştir. SH-aptamerin dizilimi 5'- SH- C6- GGCC CGCC AACC CGCA TCAT CTAC ACTG ATAT TTTA CCTT- 3'dür (Wu vd., 2016) (Tablo 4.1) ve liyofilize olarak gelen aptamer herhangi başka bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır.

4.1.2. Kullanılan çözeltiler

0,1 M PBS çözeltisinin hazırlanması:

Sodyum fosfatın monobazik ve dibazik tuzlarının 0,1 M'lık konsantrasyonundaki çözeltileri saf su içerisinde hazırlanmıştır. 0,1 M dibazik çözeltinin pH değeri pH metre ile ölçülmüştür. Daha sonra, pH değeri istenilen aralığa ulaşana kadar 0,1 M monobazik çözeltisinden uygun miktarda eklenerek pH kademeli olarak düşürülmüştür. Elde edilen tampon çözelti bir gün bekletilerek pH ölçümü yapılmış ve pH'ın kararlılığı sağlanmıştır. Bu tez kapsamında kullanılan PBS tampon çözeltisi pH 7,4'e ayarlanarak kullanılmıştır.

Tablo 4.

Sekans

5'- SH- (CH₂)₆- GGCCC GCCAA CCCGC
ATCAT CTACA CTGAT ATTTT ACCTT- 3'

Sekonder Yapı

Kaynak: (Wu vd., 2016; Zuker, 2003).

2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisinin hazırlanması:

0,1 M KCl çözeltisi içerisinde 4 mM potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$) ve 4 mM potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$) çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Hazırlanan iki çözelti hacimce 1:1 oranında birleştirilerek ferri/ferrosiyanür çözeltisi elde edilmiştir.

Bu redoks probu, EIS ölçümlerinde elektrot yüzeyinin elektron transfer direncini (R_{ct}) değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Ferri/ferrosiyandır sistemi, iyi tanımlanmış ve tersinir redoks özelliklerine sahip olması nedeniyle, özellikle elektrot modifikasyonlarının etkinliğini izlemek için yaygın şekilde tercih edilmektedir.

4.2. Yöntem

4.2.1. Au elektrobiriktirme

SPE'ler, safsızlıkları ortadan kaldırmak ve elektrotlar için temiz bir yüzey sağlamak amacıyla deneylerden önce LSV tekniği kullanılarak elektrokimyasal temizliğe tabi tutulmuştur. Elektrot yüzeylerinin elektrokimyasal temizliği için, negatif tarama (Stan vd., 2022) ve potasyum hidroksit ile negatif tarama (Fischer vd., 2009) en uygun yöntemler olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada, negatif tarama işlemi 0 ile -2 V aralığında 20 mV/s tarama hızıyla ancak nötral ve daha az agresif olan 0,1 M KCl içinde 1 mV'lik bir potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Temizlenen ve kurutulan elektrot yüzeyine ince bir altın (Au) tabakası kaplamak amacıyla 0,1 M KCl içerisinde hazırlanan 1 mM kloroaurik asit $[AuCl_4]^-$ çözeltisi

damlatılarak 0 ile -1,5 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında, 15 döngü CV uygulanarak kaplama yapılmıştır. Bu aşamada elektrot yüzeyinde görünür bir Au tabakası birikmiştir (Şahin vd., 2022). Au kaplama işlemi elektrot duyarlılığı ve performansını artırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. SPE-Au olarak adlandırılan bu elektrotlar, elektrobiriktirme işleminden sonra UPW ile yıkanarak yüzeydeki kalıntılar giderilmiştir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerde elektrotlar bu aşamalarla aptamer immobilizasyonu için hazır hale getirilmiştir.

4.2.2. PAT Tespiti İçin Yapısal Anahtarlama Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Sensör Geliştirilmesi

4.2.2.1. Aptamer immobilizasyonu

Aptamer immobilizasyonu, SH-(CH₂)₆-Aptamer-AttoMB2 dizisine sahip MB-modifiye edilmiş aptamer kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 0,1 M PBS (pH: 7,4) ve % 0,05 Tween-20 içeren 10 µM konsantrasyonunda MB-aptamer çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan 10 µL'lik 10 µM MB-aptamer çözeltisi (%0,05 Tween-20 PBS) SPE-Au elektrotunun yüzeyine damlatılarak inkübe edilmiş ve Au yüzeyi ile etkileşime girmesi sağlanmıştır. İnkübasyon işleminden sonra, elektrot aynı tampon çözelti kullanılarak yıkama yapılmıştır. Tampon içerisinde Tween-20 kullanılmasının amacı, aptamer ile hedef analit arasındaki etkileşimi artırmaktır (Song vd., 2019).

Spesifik olmayan etkileşimleri azaltmak (Ahmadi vd., 2019) ve aptamerin immobilizasyonu sırasında altın yüzeyle olan etkileşimini dengeleyerek immobilizasyon verimliliğini artırmak amacıyla (Wu vd., 2018), yüzeyde boşta kalan bölgeleri bloke etmek için 1 mM 6-merkapt-1-heksanol (MCH) çözeltisi kullanılmıştır. Küçük molekül yapısı sayesinde MCH, aptamer dizileri arasında düzenli bir şekilde yerleşerek yüzeyin kompakt ve homojen bir yapı kazanmasına katkı sağlar. Bu işlem, özellikle biyolojik örneklerde sıkça karşılaşılan hedef dışı moleküllerin yüzeye tutunmasını engelleyerek, spesifik olmayan sinyallerin önüne geçilmesine yardımcı olur. Aptamer immobilizasyonu gerçekleştirilen ve hedef analit (PAT) tespiti için hazırlanan bu elektrotlar SPE-Au/Apt olarak adlandırılmıştır.

Elektrokimyasal biyosensörlerde de aptamerlerin altın elektrot yüzeyine immobilizasyonunu takiben açıkta kalan bölgelerin kapatılması amacıyla MCH sıklıkla kullanılmaktadır. Vasilescu ve arkadaşları, MCH' ın bu özelliğinin sensörün arka plan sinyalini azalttığını ve ölçüm güvenilirliğini artırdığını göstermiştir. Benzer şekilde, Shaver ve arkadaşları, altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiş MWCNT yüzeylerde MCH' ın, yüzey

stabilitesini artırarak aptamerin hedefe karşı özgüllüğünü koruduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, Malecka-Baturo ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği deneysel çalışmada, MCH ile bloklanmış elektrotların yalnızca aptamerle modifiye edilmiş yüzeylere göre daha stabil elektrokimyasal yanıtlar verdiği ve arka plan gürültüsünün anlamlı şekilde azaldığı ortaya konulmuştur. Tüm bu bulgular, MCH' in yalnızca makroskobik altın yüzeylerde değil, aynı zamanda nanoyapı içeren hibrit elektrot sistemlerinde de etkili bir yüzey bloke edici ajan olarak işlev gördüğünü ve sensör performansını çok yönlü olarak geliştirdiğini göstermektedir (Malecka-Baturo vd., 2024; Shaver vd., 2020; Vasilescu vd., 2025).

4.2.2.2. PAT Tespiti

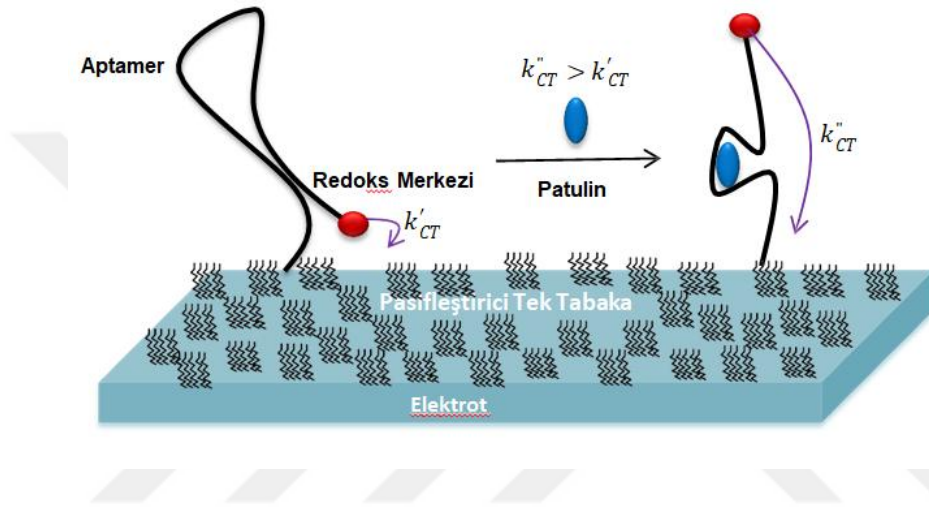
Farklı konsantrasyonlardaki PAT çözeltileri, tampon ortamda hazırlanarak elektrotlara inkübe edilmiştir. PAT inkübe edilen elektrotların yanıtı, SWV tekniği ile analiz edilmiştir. SWV ölçümleri, -0,8 V ile -0,3 V potansiyel aralığında, 10 mV sinyal büyüklüğü ve 25 Hz frekansta, tek tarama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler, PAT inkübasyonundan önce ve sonra ayrı ayrı yapılarak, her iki durum arasındaki akım farkı, aptasensörün tepkisi olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan aptamer, PAT'ın varlığının bir sinyal değişikliğine neden olduğu aptasensörün elektrokimyasal açık-kapalı davranışını göstermektedir.

Elektrokimyasal aptamer bazlı sensörlerde, hedef molekülün aptamere bağlanması ile meydana gelen konformasyonel değişim, redoks etiketi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer hızını doğrudan etkiler. Hedef analit bağlanmadan önce redoks etiketi (örneğin MB) elektrottan uzak konumdadır ve bu durum yavaş elektron transferi ile sonuçlanır. Hedef bağlandığında ise aptamer yapısı katlanarak redoks etiketi elektrota yaklaşır ve elektron transfer hızı artar.

SWV tekniği, bu elektron transfer hızlarındaki değişimlere karşı yüksek duyarlılık gösterdiğinden, hedefin bağlanma kinetiğine bağlı olarak farklı sinyal yanıtları elde edilebilir.

Hedef bağlandığında akım şiddetini artırdığı durumda "sinyal-açık" tipi bir cevap, hedef bağlanması akımı azaldığında "sinyal-kapalı" tipi bir cevap oluşmaktadır. Bu farklı yanıtların temelinde, SWV parametrelerinin sensörün bağlı ve bağlanmamış konformasyonlarına karşı gösterdiği duyarlılığın yatmakta olduğu düşünülmektedir. Uygulanan frekansa göre sistem, hızlı ya da yavaş elektron transfer durumunu daha baskın şekilde gösterebilir.

Bu durum, SWV tekniğinin uygun frekans ve genlik ayarlarıyla hem "sinyal-açık" hem de "sinyal-kapalı" şeklinde sinyal üretimine olanak tanıdığını göstermiştir. Bu esneklik, özellikle kinetik diferansiyel ölçüm gibi gelişmiş analiz yöntemlerinin uygulanmasına olanak sağlamış, böylece ölçüm sırasında oluşabilecek sinyal sürüklenmeleri (drift) etkili şekilde düzeltilebilmiştir. Sonuç olarak, SWV tekniği yalnızca hassas bir sinyal üretim aracı olmakla kalmaz, aynı zamanda sistemin dinamik yanıtlarının optimize edilmesine de imkân tanır (Verrinder vd., 2023). Çalışmamızın özgün değerlerinden biri olarak tasarlanan yapısal anahtarlama aptasensör platformunu geliştirirken SWV tekniği kullanılmıştır.



Şekil 4.

4.2.2.3. En uygun Aptamer, MCH ve PAT inkübasyon sürelerinin belirlenmesi

Aptamer, MCH ve PAT için optimal inkübasyon sürelerini belirlemek amacıyla, optimizasyon çalışmalarında merkezi kompozit tasarım yöntemi olan RSM kullanılmıştır. Optimizasyon için aptamer, MCH ve PAT inkübasyon süreleri ile ortaya çıkan akım değişimi kullanılarak RSM analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucu kuadratik yöntemin deneysel veriler için en uygun modeli sağladığı belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmalarına yönelik deneysel planda, aptamer modifikasyonu, MCH modifikasyonu ve PAT inkübasyon süresi anahtar faktörler olarak belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler ve istenebilirlik fonksiyonu temelinde belirlenen optimum değerler, Tablo 4.2. 'de verilmiştir.

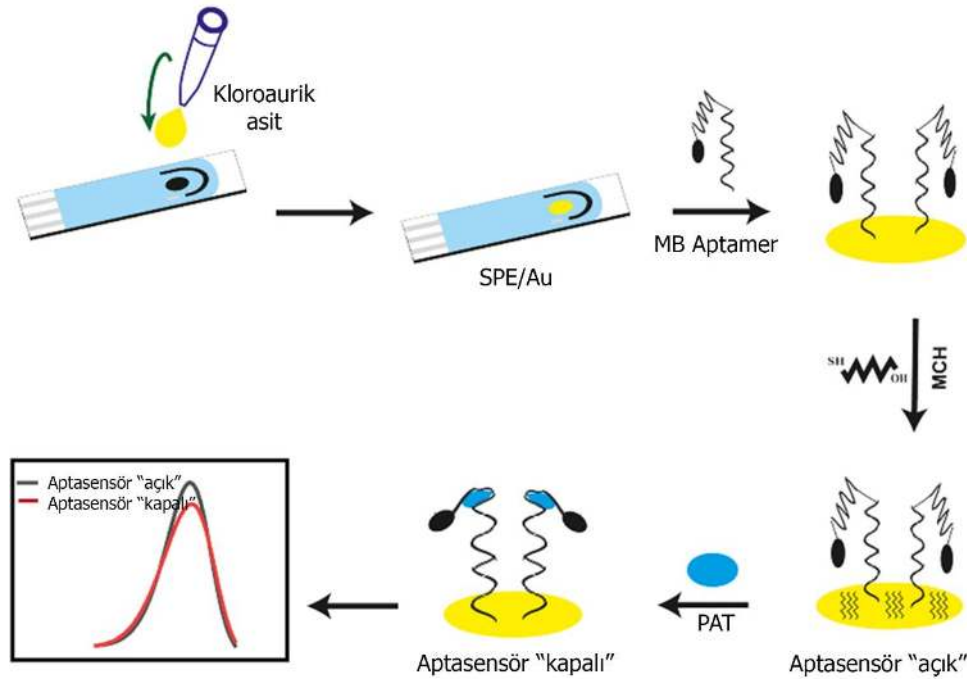
Tablo 4.

Std	Deney	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 1
		A: Aptamer Modifikasyon	B: MCH Modifikasyon	C: PAT İnkübasyon
4	1	150	60	90
18	2	150	60	47,5
17	3	150	60	47,5
10	4	240	60	47,5
9	5	60	60	47,5
7	6	60	90	90
5	7	60	30	90
6	8	240	30	90
2	9	240	30	5
13	10	150	60	5
20	11	150	60	47,5
3	12	60	90	5
15	13	150	60	47,5
12	14	150	90	47,5
19	15	150	60	47,5
16	16	150	60	47,5
8	17	240	90	90
11	18	150	30	47,5
1	19	60	30	5
4	20	240	90	5

4.2.2.4. Analitik Performansın Belirlenmesi

SPE-Au/Apt elektrotlarının analitik performansının belirlenmesi için ilk önce PAT içermeyen 0,1 M PBS (pH: 7,4) çözeltisi kullanılarak PAT bulunmayan ortamda temel yanıtın belirlenmesi amacıyla SWV tekniği uygulanmıştır. Daha sonra, elektrotlar optimizasyon sonucu belirlenen süre boyunca (89 dakika) farklı konsantrasyonlarda PAT (0,1 M PBS, pH 7,4'te 1, 2, 5, 10, 25 ng/mL) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, elektrotlar 0,1 M PBS (pH: 7,4) ile iyice yıkanmıştır. Hazırlanan SPE-Au/Apt/PAT elektrotları, 0,1 M PBS (pH: 7,4) çözeltisinde SWV kullanılarak test edilmiş ve PAT içermeyen çözeltiden elde edilen ile PAT varlığında elde edilen cevaplar arasındaki akım değişimi aptasensörün cevabı olarak kaydedilmiştir.

SPE-Au/Apt elektrodunun PAT tespiti için modifikasyon adımlarının genel şematik gösterimi Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.

Kaynak: (Şahin vd. , 2022).

Kalibrasyon eğrisi, maksimum akım değişimine karşılık gelen PAT konsantrasyonuna karşı grafik çizilerek oluşturulmuştur. Kalibrasyon deneyleri, farklı elektrotlar kullanılarak üç kez tekrar edilmiş ve verilerin standart sapması belirlenmiştir. Aptasensör kalibre edildikten

sonra, LOD %95 güven aralığında standart sapmanın 3 katı (3σ) olarak hesaplanmıştır; burada σ , tekrarlanan ölçümler arasında gözlemlenen en büyük standart sapmayı temsil etmektedir.

4.2.2.5. Girişim, Gerçek Numune ve Raf Ömrü Testleri

PAT tespitinde olası benzer toksinlerin girişim etkilerinin incelenmesi amacıyla ZEA ve OTA- A'nın eşdeğer ve 5 kat yüksek derişimlerinin inkübasyonundan kaynaklanan akım değerleri incelenmiştir. SPE-Au/Apt elektrotları başlangıçta PAT olmadan test edilmiş, ardından sırasıyla 5 ng/mL ve 25 ng/mL PAT, ZEA ve OTA-A konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Tekrarlanabilirliği belirlemek amacıyla deneyler üç kez (N=3) tekrar edilmiştir.

Gerçek numune testleri için, yerel marketlerden alınan elma suyu örnekleri, bir vorteks karıştırıcı kullanılarak eşit hacimde etil asetat çözeltisi (%99,5 saflık, Merck'ten elde edilmiştir) ile karıştırıldıktan sonra santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Faz ayırımından sonra üst etil asetat fazı (1 mL) toplanmış ve 19 mL PBS ile seyreltilmiştir. Farklı PAT konsantrasyonları (5 ng/mL, 10 ng/mL ve 25 ng/mL), bu hazırlanan elma suyu örneklerine standart ekleme yöntemi kullanılarak eklenmiştir.

Raf ömrü deneyleri ile elektrotun raf ömrü tespit edilmiştir. Hazırlanan SPE-Au/Apt elektrotları, temel akım değeri elde edildikten sonra +4°C'de 10 gün boyunca saklanmıştır. Saklama süresinin ardından, elektrotlar PAT ile test edilmiş ve akım farkı değerindeki yüzde değişim referans değerine göre hesaplanmıştır. Ayrıca, elektrotlar +4°C'de ek olarak 10 gün daha saklanmış ve referans değerine göre sensör tepkisini değerlendirmek için tekrar test edilmiştir.

4.2.3. PAT Tespiti İçin İmpedimetrik Aptasensör Geliştirilmesi

Bölüm 4.2.1.'de belirtilen şekilde hazırlanan ve SPE-Au olarak adlandırılan elektrotlar 2 mM ferri/ferrosiyandır çözeltisi içerisinde, CV ve EIS teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

CV, elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks süreçlerine genel bir bakış sunması ve geniş potansiyel aralıklarında redoks davranışının hızlı bir şekilde gözlemlenmesine olanak tanınması nedeniyle, sensörlerin ön karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Beitollahi vd., 2020). Özellikle aptamer immobilizasyonu öncesi ve sonrası yüzeydeki değişikliklerin izlenmesinde oldukça bilgilendirici bir tekniktir (Pellitero vd., 2021).

Aptamer bazlı elektrokimyasal sensörlerin yüzey modifikasyonlarının izlenmesi ve hedef analite özgü yanıtlarının değerlendirilmesinde, CV ve EIS sıklıkla birlikte

kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda aptamer immobilizasyonunu takiben CV ile yüzeyin redoks tepkisini analiz edilmiş ve sonrasında hedefin bağlanmasıyla sistemdeki yük transfer direncinin EIS ile ölçüldüğü gösterilmiştir. Bu yaklaşım, hem yüzey modifikasyonlarının takibi hem de hedef bağlanmasının doğrulanması için etkili bir kombinasyon sunmuştur (Radi, 2011).

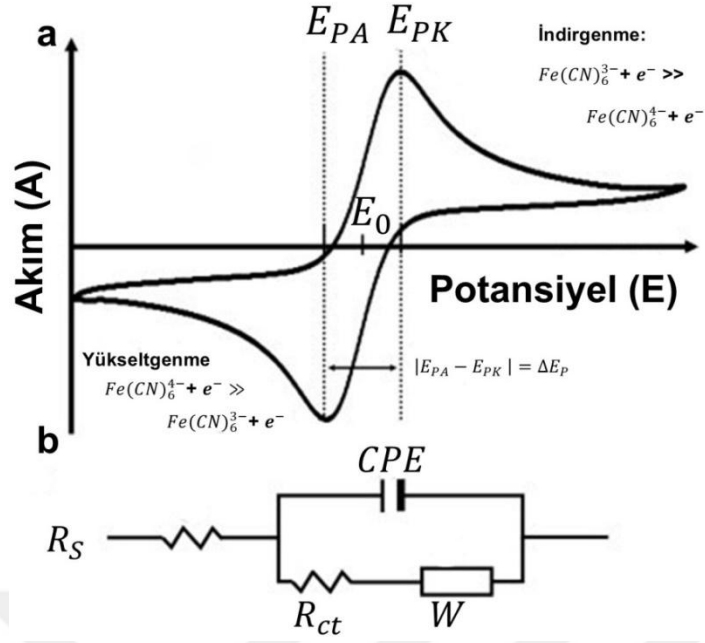
CV, özellikle yüzeydeki değişimleri hızlı ve tekrarlanabilir şekilde gösterebilirken; EIS, sensör yanıtının daha düşük konsantrasyonlarda bile ölçülmesine imkân tanıyan yüksek duyarlılıklı bir analiz sağlar. Bu bağlamda, CV ve EIS' nin birlikte kullanılması, sensör platformlarının hem yapısal bütünlüğünü hem de analitik performansını optimize etmek adına oldukça değerlidir (Pellitero vd., 2021).

4.2.3.1. Aptamer ile immobilize edilmiş SPE'lerin hazırlanması

SH- (CH₂)₆ –Aptamer sekansına (Tablo 4.1.) sahip aptamer kullanılmıştır. 5 µM derişimde pH 7,4 PBS içerisinde 0,1 M fosfat tamponlu tuzlu su içinde 5 µL hacimde 5 µM aptamer çözeltisi SPE-Au üzerinde bekletilmiş ve tampon ile yıkandıktan sonra, %2,5 yağlı süt ile muamele edilerek Au yüzeyi bloke edilmiştir.

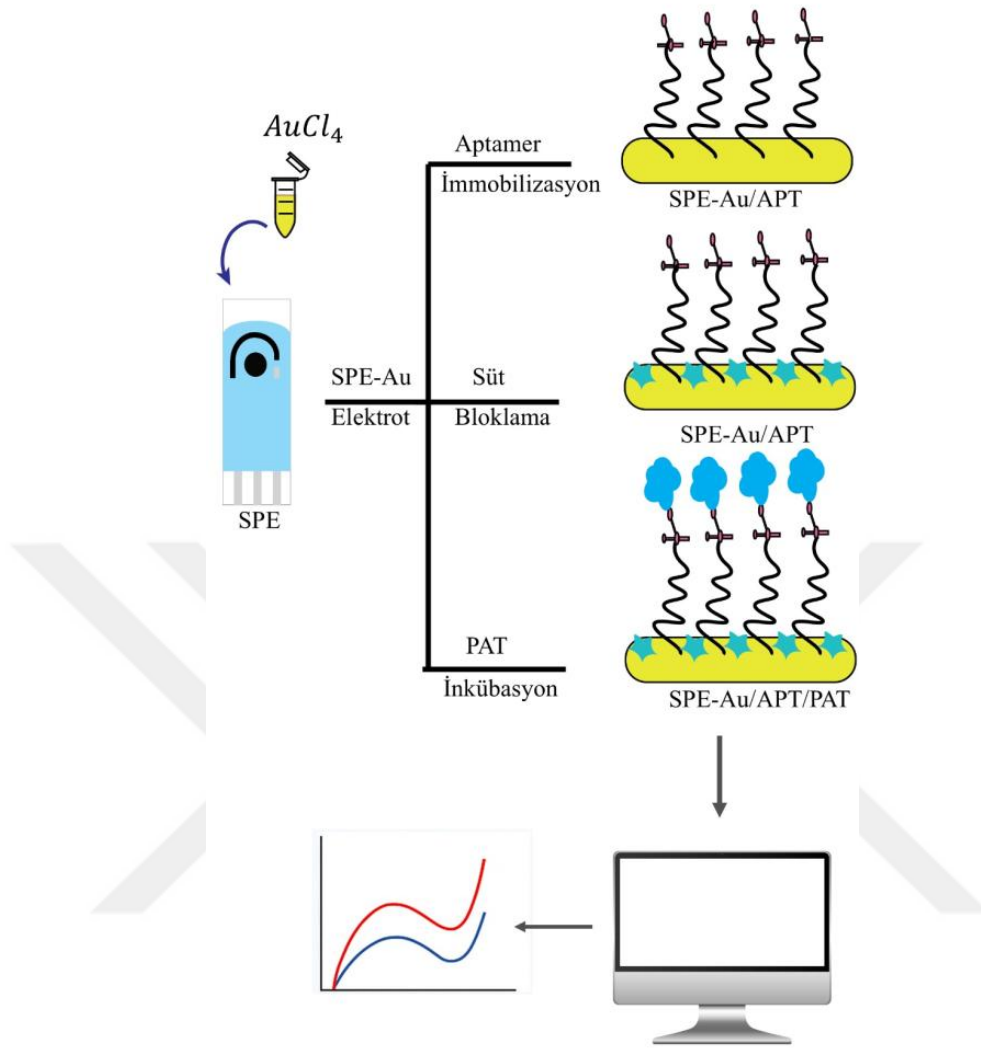
Proteinler ile genosensörlerde sinyal artırımının rapor edildiği sınırlı sayıda çalışma olsa da, MCH kullanılarak yüzey bloklama sonucu ortaya çıkan tekrarlanabilirlik sorunu süt ile muamele sonucunda ortadan kalkmıştır (Bonardo vd., 2023). Son olarak elektrotlar tampon çözelti ile yıkanarak PAT tayini için hazır hale getirilmiştir. SPE-Au/Apt olarak adlandırılan elektrotlara tampon içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PAT inkübe edilerek CV (-0,5 ile -0,48 V potansiyel aralığı, 2 çevrim) ve EIS tekniği ile test edilmiştir. Testler, 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış 2 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} redoks prob çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir

EIS ölçümleri, genellikle voltamogramda yükseltgenme ve indirgenme piklerinin ortalaması alınarak belirlenen formal potansiyelin (E₀) yakınında yapılmaktadır. Bu potansiyelde faradayik akım sıfıra yakın olup, sistem yalnızca elektrot ara yüzeyine özgü yük transferi ve kapasitif davranış üzerinden karakterize edilebilmektedir. Çalışmada EIS ölçümleri AC potansiyeli uygulanarak E₀ değeri 0,12 V olarak bulunmuş ve bu potansiyelde ölçümler gerçekleştirilmiştir. EIS sonuçlarında uydurma (fitting) için eşdeğer devre modeli (Randles devresi) kullanılmıştır. Bu devre çözelti direnci (R_s), sabit faz elemanı (CPE), yük aktarım direnci (R_{ct}) ve Warburg impedansından (W) oluşmaktadır. Bu eşdeğer devre modeli EIS verilerinin modellenmesi için kullanılmış ve Nyquist diyagramlarında verilmiştir.



Şekil 4. (a) Anodik (E_{PA}) ve katodik pik (E_{PK}) arasındaki potansiyel farkı ΔE_p , E_0 formal potansiyel olarak etiketlenir (b) Elektrokimyasal sistemin Randles eşdeğer devre modeli. (Fischer vd., 2009).

PAT tespiti için aptasensör üretim adımları şematik olarak Şekil 4.4' te gösterilmiştir.



Şekil 4.

4.2.3.2. En Uygun Aptamer Konsantrasyonu ve Aptamer immobilizasyon ve PAT İnkübasyon Sürelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada aptamer konsantrasyonu, aptamer immobilizasyon süresi ve PAT etkileşim süresi optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarına ilk olarak aptamer konsantrasyonu ile başlanmıştır. Aptamerin farklı konsantrasyonları (1, 5, 10 μ M), 120 dakika süreyle pasif adsorpsiyon yoluyla elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Elektrot yüzeyinin elektrokimyasal aktivasyonundan sonra PAT'a özgü aptamer immobilizasyonundan elde edilen Nyquist eğrilerinin eşdeğer devreleri ile belirlenen R_{ct} değeri artışı dikkate alınarak optimum aptamer konsantrasyonu belirlenmiştir. Daha sonra 60, 120 ve 180 dakika aptamer immobilizasyon süreleri ve 30, 45, 60 dakika PAT inkübasyon süreleri üç tekrar olacak

şekilde deneyler gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde R_{ct} değerleri dikkate alınarak optimum şartlar belirlenmiştir.

4.2.3.3. Analitik Performansın Belirlenmesi

Altın kaplanan ve süt ile bloklama işlemi gerçekleştirilen SPE'ler EIS tekniği kullanılarak, hücreye 0,12 V potansiyel uygulanarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemi Au kaplama, aptamer immobilizasyonu ve farklı PAT konsantrasyonlarının inkübasyonu sonrasında gerçekleştirilmiştir. Aptasensör cevabı olarak R_{ct} değerleri dikkate alınmıştır.

PAT aptasensörü cevabı esas alınarak gerçekleştirilen analizde, aptamer konsantrasyonu, aptamer ve PAT inkübasyon sürelerinin elde edilen Nyquist eğrilerinin eşdeğer devreleri ile belirlenen R_{ct} değeri artışı ilişkisi incelenmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre en iyi sonucu veren aptamer konsantrasyonu, aptamer modifikasyon ve PAT inkübasyon süreleri minimum hata ve test süresini verecek şekilde belirlenmiştir.

SPE-Au elektrotlar üzerine 5 µL aptamer damlatılarak, 120 dk süreyle immobilizasyon gerçekleştirilmiş ve 2 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redoks prob çözeltisi içerisinde EIS tekniği kullanılarak kalibre edilmiştir ve SPE-Au/Apt olarak kaydedilmiştir. Farklı miktarlarda PAT (0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 ng/mL 0,1 M PBS, pH 7,4) inkübe edilmiş elektrotlar (SPE-Au/Apt/PAT) aynı şekilde redoks probu ile analiz edilmiştir. Aptasensör cevabı olarak Nyquist eğrileri kıyaslanmıştır.

4.2.3.4. Girişim ve Raf Ömrü Testleri

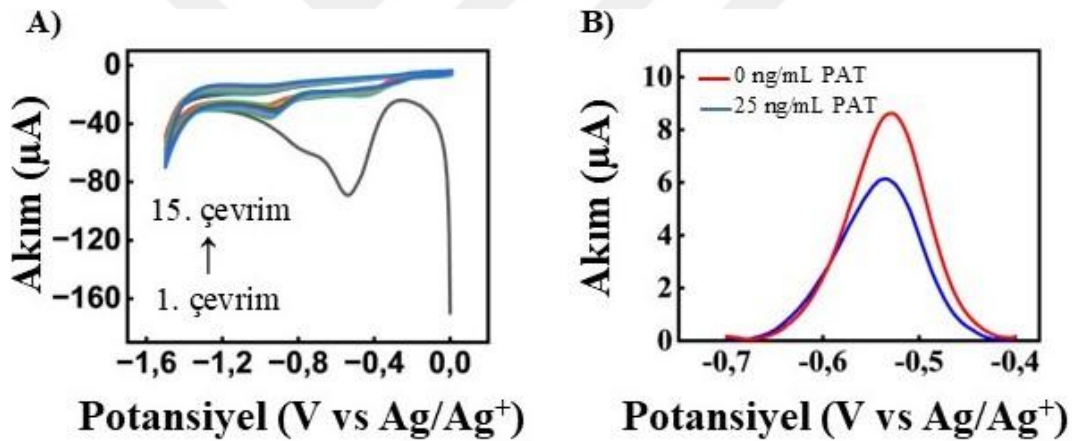
Girişim deneyleri kapsamında, iki yaygın mikotoksin olan OTA-A ve ZEA'nın, PAT tespitindeki potansiyel girişimi değerlendirilmiştir. Optimize edilmiş PAT inkübasyon süresi boyunca, girişim yapan maddelerin inkübasyonundan kaynaklanan direnç değerleri incelenmiştir. SPE-Au/Apt elektrotları 5 ng/mL ZEA (PAT+ZEA) ve OTA-A (PAT+ZEA+OTA) konsantrasyonlarıyla inkübe edilmiştir. Deneyler güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik sağlamak için üç kez (N=3) tekrar edilmiştir.

Elektrotların raf ömrünü değerlendirmek amacıyla raf ömrü deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan SPE-Au/Apt elektrotları, başlangıç direnç değerini elde ettikten sonra +4°C'de 7 gün boyunca saklanmıştır. Saklama süresinin ardından elektrotlar PAT ile test edilmiş ve dirençteki değişim değeri yüzdesi, referans değerine göre hesaplanmıştır. Böylece sensör yanıtı referans değerine göre değerlendirilmiştir.

5. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. PAT Tespiti İçin Yapısal Anahtarlama Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Sensör

SPE üzerine Au'nun elektrobiriktirmesini gösteren CV sonuçları Şekil 5.1. A 'da verilmiştir. CV sonuçlarına göre, ilk çevrimde gözlenen belirgin indirgenme piki (~ -0.85 V), altın iyonlarının Au^0 olarak yüzeye indirgenmesini göstermektedir. Artan çevrim sayısı ile bu pik kaybolmakta ve akım şiddeti azalmaktadır; bu durum, yüzeyin altınla kaplandığını ve indirgenecek iyon kalmadığını göstermektedir. Aynı zamanda toplam akımın büyüklüğü azalmaktadır, bu durum indikatif olarak yüzey doyumu yaklaşıldığını göstermektedir. Ayrıca, ilk üç döngüden sonra voltammogramda önemli bir değişiklik olmaksızın Au kaplamasının kararlı bir duruma ulaştığı gözlemlenmiştir. Sonrasında, 15 döngüden sonra, yüzeyin tamamen kaplandığı ve görünür bir Au tabakasının oluştuğu tespit edilmiştir (Zaki vd., 2020).



Şekil 5.1. A) 15 döngü boyunca 50 mV'da 0,1 M KCl'de 1 mM $[AuCl_4]^-$ elektroliz için CV'ler (B) Aptasensörün PAT'a karşı sinyal açma-kapama sinyal tepkisi.

Moleküler anahtarlama ile gerçekleşen açık-kapalı sensör tepkisi, PAT varlığında değerlendirilmiştir. Elektrot ile PBS probu arasındaki elektron transferi, bir akım geçişine olanak tanır ve böylece aptamer ile PAT arasında bir etkileşim yokken (PAT olmadığı durumda) aptasensörün "açık" durumda olmasına neden olur. Tersine, PAT ile inkübasyon, moleküler anahtarlama sonucu MB ile elektrot yüzeyi arasında sağlanan akımı engeller ve aptasensörün "kapalı" durumda olmasına yol açar. Bu "açık-kapalı" davranış, elektron transfer mesafesinin aptamere bağlı PAT moleküllerinin sayısına bağlı olabileceğini ve bu sayede belirli bir örnekte PAT konsantrasyonunun kantitatif ölçümü için kalibrasyon yapılabileceğini göstermiştir. Şekil 5.1. (B)'de 0 ng/mL PAT ve 25 ng/mL PAT varlığında sensörden elde

edilen sinyaller karşılaştırılmıştır. 25 ng/mL PAT varlığında akımda belirgin bir düşüş (~ 0.5 V civarı) gözlemlenmektedir. Burada, Au kaplı yüzeyde immobilize edilen aptamer, PAT ile etkileşime girerek yüzey yük geçişini sınırlar. Bu durum ise pik akımının azalmasına neden olur. 25 ng/mL PAT inkübasyonu sonrası diferansiyel puls voltametrisi (DPV) sinyalinde gözlenen akım düşüşü, hedef analitin yüzeye özgül bağlanması ve böylece yüzeydeki elektron transferinin engellendiğini göstermektedir.

Bu durum, fonksiyonel sensör yüzeyinin oluştuğunu ve aptamer-PAT etkileşiminin başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. CV ile yapılan çoklu çevrim analizleri, yüzeye başarılı bir şekilde altın kaplandığını gösterirken, DPV analizi, immobilize edilen aptamerin hedef analit olan PAT ile özgül etkileşimini doğrulamaktadır. Bu bulgular, yüzeyin hem yapısal hem de fonksiyonel olarak sensör uygulamaları için uygun şekilde modifiye edildiğini ortaya koymaktadır.

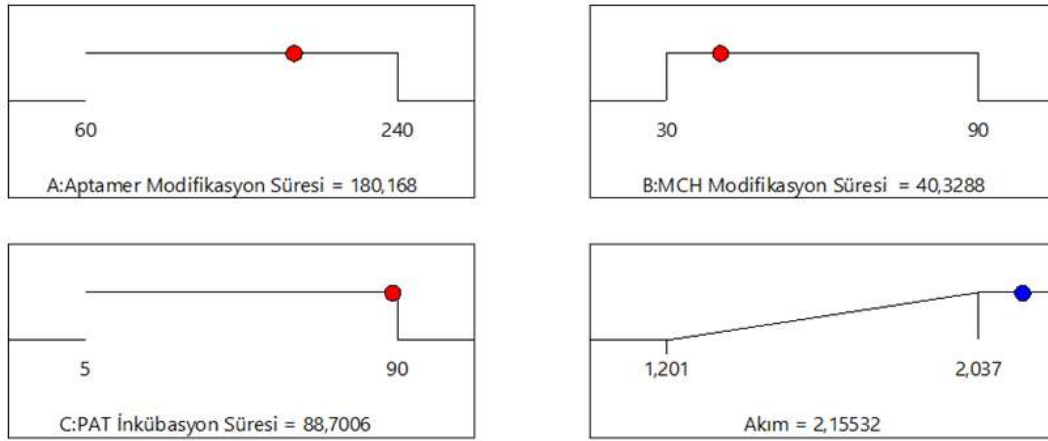
Elektrodun analitik performansını optimize etmek için, aptamer ve MCH'nin modifikasyonu ile hedef molekül (PAT) için inkübasyon süreleri anahtar değişkenler olarak belirlenerek RSM ile optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Detaylı RSM deney tasarımı Tablo 5.1.'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Design Expert programı tarafından belirlenen deneyler ve elde edilen sonuçlar.

Deney	Faktör 1 A:Aptamer Modifikasyon Süresi (dakika)	Faktör 2 B:MCH Modifikasyon Süresi (dakika)	Faktör 3 C:PAT İnkübasyon Süresi (dakika)	Sonuç 1 Akım μA
1	150	60	47,5	1,566
2	60	90	5	1,201
3	150	60	47,5	1,934
4	150	60	47,5	1,570
5	150	60	47,5	2,037
6	60	30	5	1,335
7	240	90	5	1,701

PAT aptasensörü cevabı esas alınarak gerçekleştirilen RSM analizinde aptamer, MCH ve PAT inkübasyon sürelerinin akımdaki değişimle olan ilişkisi incelenmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmeler neticesinde elde edilen analiz sonuçlarına göre en iyi sonucu veren kuadratik yöntem, deney verilerine en uygun model olarak önerilmiştir.

Aptamer, MCH ve PAT inkübasyon süreleri ile ortaya çıkan elektrokimyasal PAT sensöründen elde edilen akım değişimi arasındaki ilişki ile optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda boş elektroda kıyasla daha yüksek bir akım farkı veren koşullar tercih edilmiştir. İsteklilik fonksiyonunun 1'e eşit olduğu çözüm kullanılarak, aptamer, MCH ve hedef molekül inkübasyon süreleri için optimize edilmiş değerler sırasıyla 180 dakika, 40 dakika ve 89 dakika olarak belirlenmiştir. Yaklaşık 40 bazlık aptamerin Au yüzeyine kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (SAM) formunda bağlanması için bu çalışmada bulunan optimum değerler literatür ile uyumludur (Erkal-Aytemur vd., 2024). Ayrıca MCH bloklama süresi de bu türde küçük bir SAM oluşturan molekül için literatüre uyumlu ve gerçekçi bir optimizasyon sonucu olarak değerlendirilmiştir (Şahin vd., 2022). Bu optimize edilmiş değerler, çalışmanın sonraki aşamalarında Au kaplı SPE elektrotlarının üretimi ve analizi için kullanılmıştır.

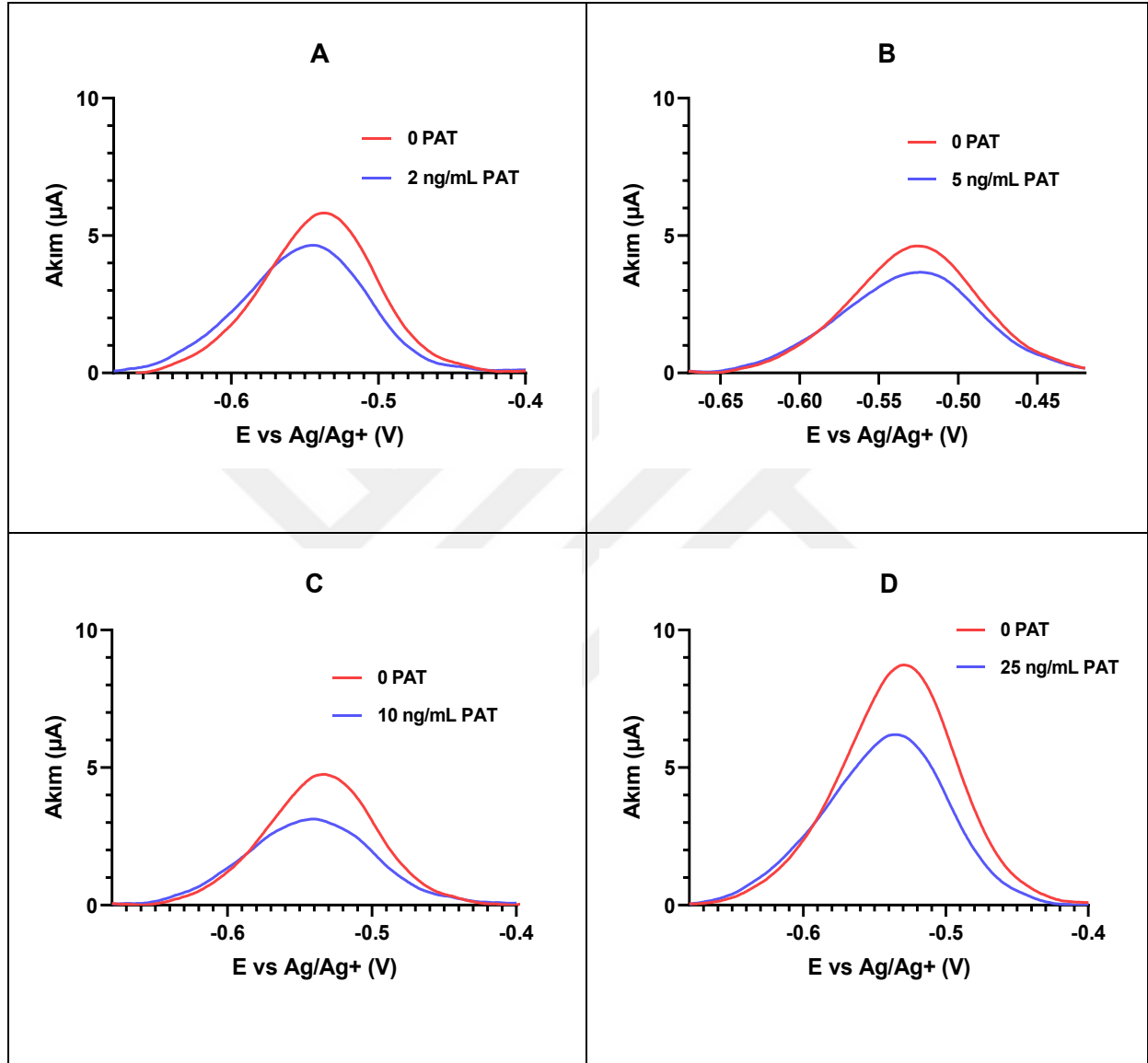


Şekil 5.2. Au kaplı SPE elektrotlarının üretimi ve analizi için optimizasyon değerleri.

5.1.1. Analitik performansın belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki PAT çözeltileri (0,1 M PBS, pH 7,4'te 2, 5, 10, 25 ng/mL) ile inkübe edilen elektrotlardan elde edilen tepe akım yoğunluğu değerleri, yanıt değişikliklerini incelemek için grafiğe geçirilmiştir. Her bir çalışma üç tekrarlı yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. Şekil5.3'te dört farklı PAT derişimi için DPV sonuçları gösterilmektedir. Her panelde (A: 2 ng/mL, B: 5 ng/mL, C: 10 ng/mL, D: 25 ng/mL), kırmızı eğri PAT eklenmeden önceki sensör yanıtını, mavi eğri ise ilgili PAT derişimiyle inkübasyon sonrası ölçülen akımı temsil etmektedir. Tüm panellerde PAT varlığında akım şiddetinde sistematik bir azalma gözlenmektedir. Bu durum, yüzeye immobilize edilen anti-PAT aptamerin hedef molekülle özgül olarak bağlandığını ve bu bağlanmanın yüzeydeki elektron transferini kısıtlayarak akım değerini düşürdüğünü göstermektedir. Özellikle düşük

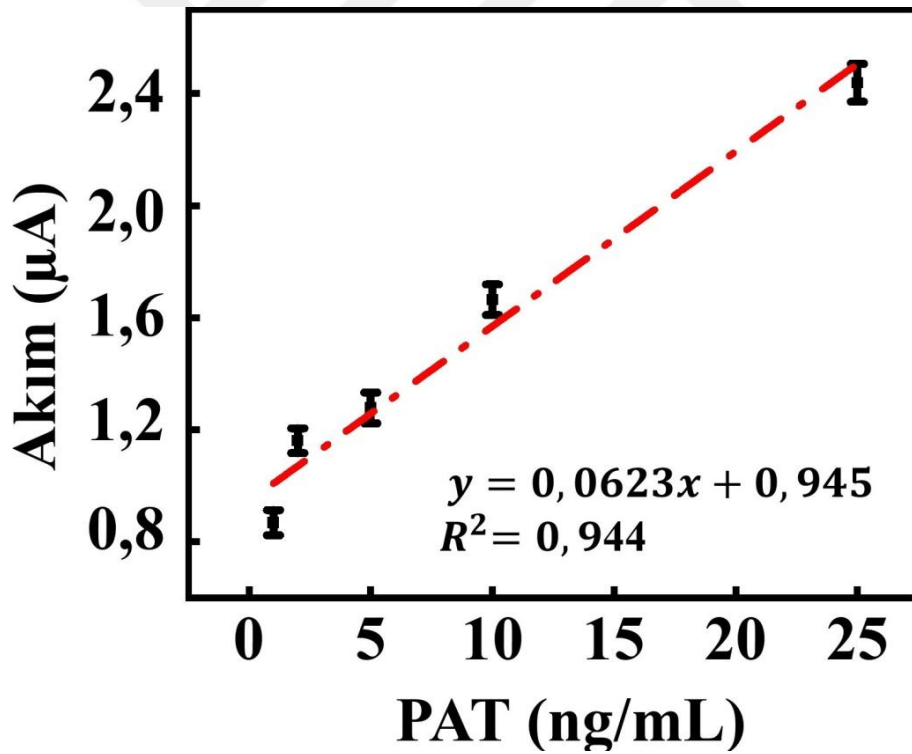
konsantrasyonlarda (2 ve 5 ng/mL) dahi gözlenen akım azalması, sensörün yüksek duyarlılıkla çalıştığını kanıtlamaktadır. PAT konsantrasyonu arttıkça akım şiddetindeki düşüşün daha belirgin hale gelmesi ise sensörün konsantrasyon bağımlı yanıt verdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 5.3. Farklı PAT konsantrasyonlarında elde edilen tepe akım yoğunluğu değerleri.

Seçilen aptasensör 1-25 ng/mL'lik doğrusal bir çalışma aralığı göstermiş ve LOD, standart sapmanın 3 katı (3σ) ile belirlenen %95 güven aralığıyla 3,56 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirdiğimiz aptasensörün performansını değerlendirmek için bu aralık ve LOD değerlerini literatürde diğer elektrokimyasal tespit yöntemleri için bildirilenlerle karşılaştırılmıştır (Tablo 3.2.). Sonuçlar, aptasensörümüzün PAT'ın doğru tespiti için önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Geliştirilen aptasensörün kalibrasyon eğrisi Şekil 5.4.'de sunulmuştur. Kalibrasyon eğrisi, beş farklı PAT konsantrasyonunun her birinde üç tekrar yapılarak ve ortalama değerler hesaplanarak oluşturulmuştur. Yapısal anahtarlama mekanizmasının, PAT konsantrasyonu arttıkça akım yoğunluğunda orantılı bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu orantısallık, 2 ng/mL 'lik bir PAT konsantrasyonundan itibaren daha belirgin hale gelmiştir ve daha yüksek bir doğrusal düzey sergilemiştir (belirleme katsayısı, CoD, $R^2 = 0,993$). Daha düşük PAT konsantrasyonlarında, anahtar değiştirme olaylarının akım yoğunluğunda önemli bir değişiklik yaratacak kadar sık gerçekleşmemesi beklenir. Ancak, 2 ng/mL ile 25 ng/mL aralığında, anahtarlama davranışı yüksek bir doğrusal ilişki ve yüksek bir CoD ortaya koymuştur. Ayrıca, tekrarlanabilirlik analizi ortalama 0,055 μA standart sapma ve maksimum 0,067 μA sapma olduğunu göstermiştir. Bu sapma, 1 ng/mL PAT için ölçülen sensör sinyalinin %5'ine karşılık gelir ve tekrar edebilirlik sonuçlarının tatmin edici analitik performans sonucu verdiğini ortaya koymuştur (Khan vd., 2020; Zhang vd., 2020).



Şekil 5.4. Yapısal Anahtarlama Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Sensör için kalibrasyon eğrisi.

Kalibrasyon eğrisinden elde edilen analitik parametreler Tablo 5.2.'de verilmiştir. LOD, $(3.3\sigma)/\text{eğim}$ ilişkisi kullanılarak CoD, R^2 değerinin 0,94 olduğu

$$i = 0,0623 \cdot [PAT] + 0,945 \quad (5.1)$$

doğrusal denklemden belirlenmiştir. LOD belirlenirken, ölçümlerden elde edilen maksimum σ değeri olan 0,067 μA standart sapma değeri kullanılmıştır. LOD, 3,56 ng/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.4) (Şahin vd., 2022).

Tablo 5.2. Aptasensör için analitik parametreler.

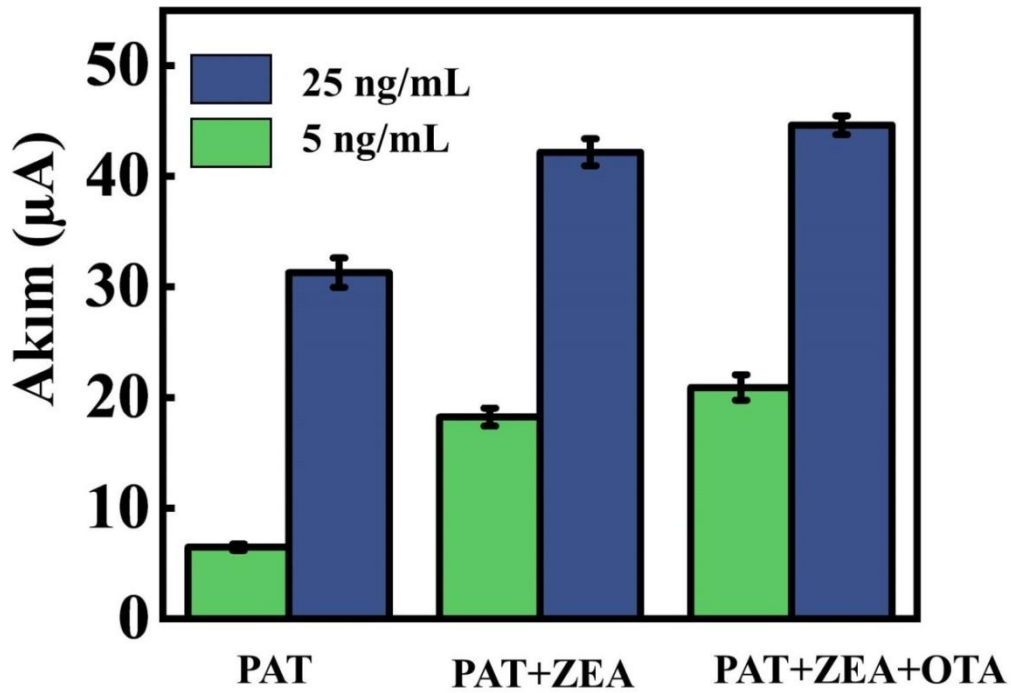
Analitik parametre	Değerler
Doğrusal aralık (ng/mL)	1 ila 25
Kalibrasyon doğrusu eşitliği , i (μA), [PAT] (ng/mL)	$i = 0,0624[PAT] + 0,946$
Hassasiyet (ng PAT/ μA /mL)	0,0623
Eğimin standart hatası, $\pm$	0,008
Kesim noktasının standart hatası, $\pm$	0,946
CoD, R^2	0,945
LOD ng/mL	3,560
LOQ ng/mL	10,700

Alternatif olarak, kalibrasyon eğrisi 2 ng/mL 'den başlatıldığında, $i = 0,0565[PAT] + 1,043$ denklemine uyan ve R^2 değeri 0,99 olan mükemmel bir uyum ortaya koymuştur. İkinci kalibrasyon eğrisi kullanıldığında ise, hesaplanan LOD 3,91 ng/mL olmuştur. Özellikle, her iki LOD değeri de birbirine oldukça yakın olup, kalibrasyon eğrisinin eğimi olan sensör hassasiyeti arasında yaklaşık %9'luk önemsiz bir mutlak oransal fark olduğunu gösterilmiştir.

Geliştirilen yapı değiştiren aptamer tabanlı elektrokimyasal sensör, 2–25 ng/mL aralığında PAT için yüksek doğrusal yanıt ($R^2 = 0,993$) ve düşük tekrar sapması (en fazla 0,067 μA) ile güçlü bir analitik performans sergilemiştir. Artan PAT konsantrasyonu, aptamer-hedef etkileşimine bağlı olarak elektron transferini kısıtlamış ve akım yoğunluğunda sistematik bir azalma oluşturmuştur. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim ve ölçüm sapmaları kullanılarak hesaplanan LOD değeri 3,56 ng/mL olup, alternatif kalibrasyonda bu değer 3,91 ng/mL olarak bulunmuştur. Her iki durumda da elde edilen düşük LOD ve yüksek tekrarlanabilirlik, sensörün seçicilik ve duyarlılık açısından güvenilirliğini doğrulamaktadır.

Gerçek numune testleri için, yerel marketlerden elde edilen elma suyu örnekleri, bir vorteks karıştırıcı kullanılarak eşit hacimde etil asetat çözeltisi (99,5% saflık, Merck'ten elde edilmiştir) ile karıştırıldıktan sonra santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Faz ayırımından sonra üst etil asetat fazı (1 mL) toplanmış ve 19 mL PBS ile seyreltilmiştir. Farklı PAT konsantrasyonları (5 ng/mL, 10 ng/mL ve 25 ng/mL), bu hazırlanan elma suyu örneklerine standart ekleme yöntemi kullanılarak eklenmiştir. Ölçülen değerler daha sonra gerçek örneklerde PAT tespiti için doğruluğunu değerlendirmek için kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılmıştır.

OTA-A ve ZEA gibi girişim yapan maddelerin aptasensörün tepkisi üzerindeki etkisi, her madde için 5 ng/mL ve 25 ng/mL konsantrasyonlarında araştırılmıştır. Bu analiz dört elektrot kullanılarak yürütülmüş olup ve kalibrasyon eğrisinden elde edilen karşılık gelen değerler, standart sapmayla birlikte Şekil 5.5.'de gösterilmiştir.

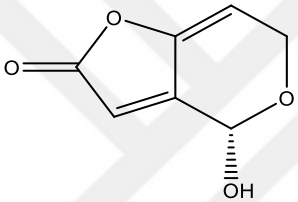
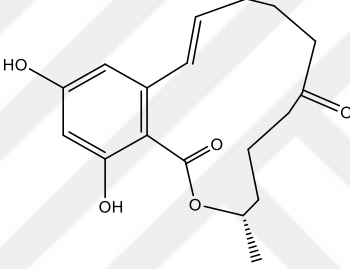
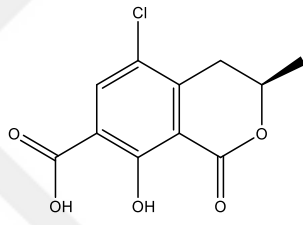


Şekil 5.5. Girişim yapan maddelerin aptasensörün tepkisi üzerindeki etkisi. Girişim yapan maddenin 5 ng/mL ve 25 ng/mL konsantrasyonundaki tepkisi. Hata çubukları, bağımsız olarak hazırlanmış dört elektrottan türetilen numunelerin standart sapmalarını temsil eder.

Bu çalışmada kullanılan ve spesifik olarak PAT'a bağlanan aptamer, daha önce literatürde bildirilmiştir (Wu vd., 2016). Öte yandan, ZEA ve OTA dahil olmak üzere potansiyel interferansların sensör yüzeyinde 5 ng/mL PAT ile birlikte inkübe edildiğinde, kalibrasyon eğrisinden elde edilen ölçülen değerlerin pozitif bir önyargı sergilediği

gözlemlenmiştir. Özellikle, ZEA, 5 ng/mL konsantrasyonda sensör tepkisinde önemli bir artışa neden olmuş ve 15 ng/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlara eşdeğer bir tepkiyle sonuçlanmıştır. Ancak, bu spesifik olmayan girişim etkisi daha yüksek bir ZEA konsantrasyonunda (25 ng/mL) gözlenmemiştir. ZEA' nın düşük konsantrasyonlarda PAT- spesifik aptamer ile rekabetçi etkileşiminin yanı sıra, ZEA' nın ayrıca sinyal azalma oranını artıran yapısal bir etkileşime neden olduğu açık olarak görülmüştür. PAT, ZEA ve OTA'nın fizikokimyasal özellikleri moleküler mekanik (MM2) modellemesi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 5.3.'de özetlenmiştir.

Tablo 5.3. Girişimciler için ZEA ve OTA ile PAT için hesaplanan fizikokimyasal özellikler, 1-4 van der Waals faktörü ve Wiener endeksi.

	PAT	ZEA	OTA
Moleküler yapı			
Germe	0,3975	3,3788	2,7855
Bükme	14,2503	14,2710	8,9576
Germe- Bükme	0,0877	0,6306	0,0567
Burulma	1,1177	15,1357	-0,7561
1,4 VDW	-2,0779	-1,9683	-4,0717
Olmayan	4,1251	18,1306	14,5069
Dipol/Dipol	0,9734	3,1423	4,4234
Toplam Enerji	18,87 kcal/mol	52,72 kcal/mol	25,90 kcal/mol
LogP	-0,928	3,316	1,877
Toplam Bağlantı	0,019642	0,000473	0,004365
Wiener Endeksi	139	1150	460

LogP, toplam bağlanabilirlik ve topolojik indeks (Wiener) dâhil olmak üzere hesaplanan parametreler beklendiği gibi PAT, ZEA ve OTA için farklılık göstermektedir. OTA, ZEA'ya kıyasla PAT'a yapısal olarak daha yakın olmasına rağmen, ZEA'ya kıyasla aptamer ile daha düşük bir spesifik olmayan etkileşim sergilemiştir. OTA tek başına ölçülen PAT konsantrasyonunun yaklaşık %10'u kadar bir girişim sinyali üretmiştir. Her iki girişim de aynı anda etkileşime girdiğinde, yaklaşık %10'luk benzer bir pozitif yanlı sapma (bias) gözlemlenmiştir. Öte yandan, diğerlerine kıyasla daha hidrofobik olan ZEN, yapısal geçiş veya redoks merkeziyle etkileşim yoluyla akımda bir azalmaya yol açabilecek spesifik olmayan bir etkileşim sergilemiştir. İlginç bir şekilde, bu negatif etkileşim daha yüksek ZEA konsantrasyonlarında azalmıştır. Ancak, PAT-spesifik aptamerin farklı interferanslar için seçilip doğrulandığı bu çalışmada, aptamerin ZEA ile spesifik olmayan bir şekilde etkileşime girdiği sonucuna kesin olarak varılamaz. Bunun yerine, aptamer geçişinde veya redoks merkezinin elektrot yüzeyi ile etkileşiminde bir interferans olduğu sonucuna varılabilir. Yine de, pratik uygulamalarda, ZEA elma suyunda bir kirletici olmadığından (Zinedine vd., 2007), bahsedilen interferans sensörün analitik performansını önemli ölçüde etkilemeyebilir.

Çalışmanın ilk basamağında, PAT tespiti amacıyla geliştirilen yapı anahtarlamalı aptamer tabanlı elektrokimyasal sensör, yüzeye elektrokimyasal olarak biriktirilen altın tabaka üzerine immobilize edilen aptamer sayesinde yüksek seçicilik ve duyarlılık göstermiştir. Altın kaplama süreci, çoklu çevrimli CV ile izlenmiş ve yüzeyin homojen şekilde kaplandığı doğrulanmıştır. PAT varlığında aptamerin yapı değiştirme mekanizması sayesinde sensör açık-kapalı konuma geçerek akım sinyalinde belirgin bir düşüş üretmiş ve bu değişim, hedef molekülün özgül olarak bağlandığını göstermiştir. RSM ile optimize edilen aptamer, MCH ve PAT inkübasyon süreleri, sensör performansını maksimum düzeye çıkarmış; DPV sonuçları ise 2–25 ng/mL aralığında yüksek doğrusal yanıt ($R^2=0,993$) ve düşük tekrar sapması ile bu performansı doğrulamıştır. Hesaplanan LOD değeri 3,56 ng/mL olup, sensörün düşük düzeydeki PAT miktarlarını bile doğru şekilde tespit edebildiği gösterilmiştir.

Gerçek numune analizlerinde, elma suyu örneklerinde gerçekleştirilen standart ekleme ve geri kazanım testleri sensörün karmaşık matrislerde de güvenilir çalıştığını ortaya koymuştur. Ayrıca, OTA ve ZEA gibi potansiyel interferanslar karşısında sensörün seçiciliği değerlendirilmiş ve ZEA'nın düşük konsantrasyonlarda kısmi bir pozitif sapmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu sapma, ZEA'nın aptamerle yapısal olarak benzerliği veya redoks merkezine olan spesifik olmayan etkileşimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak ZEA'nın gıda matriksinde bulunma olasılığının düşük olması nedeniyle bu girişimin

uygulamalı analiz performansını önemli ölçüde etkilemeyeceği öngörülmektedir. Sonuç olarak, geliştirilen aptasensör; düşük tespit limiti, yüksek doğrusal yanıt aralığı, tekrarlanabilirliği ve gerçek örneklerdeki başarısı ile PAT'ın elektrokimyasal olarak güvenilir tespiti için etkili bir platform sunmaktadır.

5.2. PAT Tespiti İçin İmpedimetrik Aptasensör

Çalışmanın ikinci basamağında ise, aptamer tabanlı impedimetrik elektrokimyasal sensör platformunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece daha karmaşık bir tespit stratejisi olan yapısal anahtarlama aptasensörünün daha bilinen ve basit bir impedimetri stratejisi ile karşılaştırılması da hedeflenmiştir. SPE' ler bölüm 4.1.2.1'deki gibi hazırlanmış, daha sonra aynı işlem basamakları takip edilerek yüzeyleri Şekil 5.1. A 'daki gibi 15 döngü ile Au tabakası ile kaplanmıştır.

Elektrodun analitik performansının optimize edilmesi için, sensör üzerinde etkili olduğu ön denemelerle tespit edilen aptamer konsantrasyonu, aptamer immobilizasyon süresi ve PAT etkileşim süresi değişkenleri seçilmiş ve optimize edilmiştir. Optimizasyon aşamasında, ilk çalışmadan bağımsız olarak ve RSM sonuçlarını doğrulamak amacı ile deneysel tasarım yöntemi kullanılmamıştır. Optimizasyon aşamasında ilk olarak aptamer konsantrasyonu optimize edilmiştir. Aptamerin farklı konsantrasyonları (1,5,10 μ M) SPE yüzeyinde 120 dakika boyunca pasif adsorpsiyon yoluyla elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Elektrot yüzeyinin elektrokimyasal aktivasyonundan sonra PAT' a özgü aptamer immobilizasyonundan elde edilen Nyquist eğrilerinin eşdeğer devreleri ile belirlenen R_{ct} değeri artışı dikkate alınarak optimum aptamer konsantrasyonu belirlenmiştir. Daha sonra 60, 120 ve 180 dk aptamer immobilizasyon süresi ve 30, 45, 60 dakika olarak PAT inkübasyon süreleri üç tekrarlı olarak denenmiş ve aynı şekilde R_{ct} değerleri dikkate alınarak optimum şartlar belirlenmiştir.

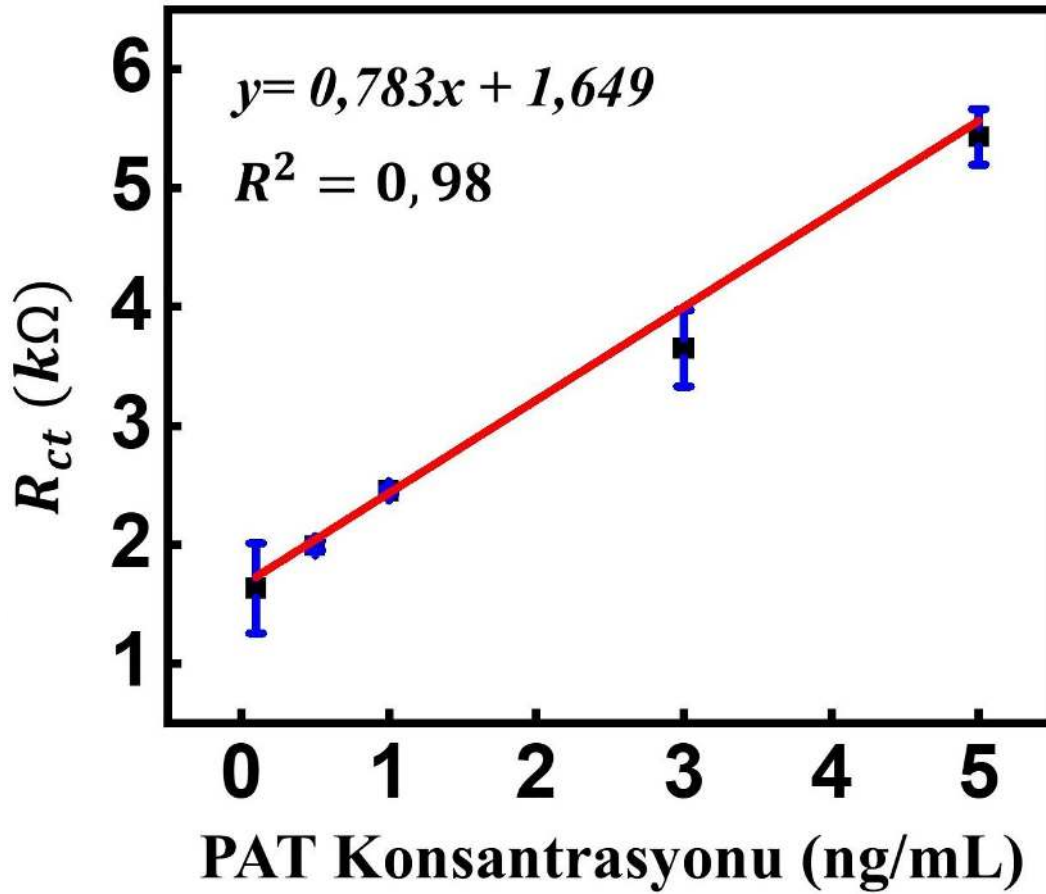
5.2.1. PAT Tespitinde İmpedimetrik Aptasensörün Performansı

Altın bloklanmış SPE elektrotlar elektrokimyasal impedans tekniği kullanılarak, hücreye uygulanan 0,12 V potansiyel ile Au kaplama, aptamer immobilizasyon ve çeşitli PAT konsantrasyonlarından sonra karakterize edilmiş aptasensör cevabı olarak R_{ct} değerleri dikkate alınmıştır.

PAT aptasensörü cevabı esas alınarak gerçekleştirilen analizde aptamer konsantrasyonu, aptamer ve PAT inkübasyon sürelerinin elde edilen Nyquist eğrilerinin eşdeğer devreleri ile belirlenen R_{ct} değeri artışı ilişkisi incelenmiştir.

Geliştirilen aptamer tabanlı impedimetrik sensörün performansı, elektrot yüzeyindeki modifikasyon adımlarının ardından ölçülen yük transfer direnci (R_{ct}) üzerinden değerlendirilmiştir. Altın kaplanmış ve MCH ile bloklanmış SPE elektrotlarda, aptamer immobilizasyonu ve ardından farklı PAT konsantrasyonları ile inkübasyon sonrası elde edilen Nyquist eğrileri, elektrot yüzeyindeki değişimlerin etkisini açıkça göstermiştir. R_{ct} değerindeki artış, özellikle aptamerin yüzeye immobilizasyonu ve hedef analit olan PAT ile özgül etkileşim sonrası gözlenmiştir; bu artış, elektron transfer sürecine olan direncin yükseldiğini ve yüzeyin kademeli olarak daha az geçirgen hâle geldiğini göstermiştir. Bu durum, hedef molekül bağlanmasıyla birlikte aptamerin konformasyonel değişime uğrayarak elektrot yüzeyine daha fazla yalıtkanlık kazandırması ve elektron transferini fiziksel olarak engellemesiyle açıklanabilir. Yani, aptamer-PAT etkileşimi sonucunda oluşan kompleks, elektrot ile çözeltideki redoks probu arasındaki yük transfer yolunu sınırlamakta, böylece daha yüksek R_{ct} değerleri elde edilmektedir.

PAT'in 0,1- 5 ng/mL derişimde impedimetrik sensör cevaplarından elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 5.6'da sunulmuştur. Çalışma aralığında 0,99 R^2 'lik bir belirleme katsayısı sağlayan doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Analitik performans değerlendirmesi Tablo 5.4'de verilmiştir. Görüldüğü üzere, sensörün hassasiyeti eğim cinsinden 0,7239 $R_{ct}/[PAT]$ olmuştur. S/N oranı olarak kesim noktasındaki standart hata ($\sigma=0,07174$) dikkate alınarak 3.3σ /eğim değerinden tespit sınırı (LOD) 0,328 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Sensör cevabının ortalama standart sapmaları S/N oranı olarak ele alındığında ise ($\sigma=0,08284$) LOD 0,303 ng/mL olarak hesaplanmaktadır. Her iki durumda tespit sınırı, literatürde daha önceden rapor ettiğimiz 3,56 ng/mL PAT değerinden düşük bulunmuştur.



Şekil 5.6. İmpidimetrik aptasensöre ait kalibrasyon eğrisi.

Yürütülen impedimetrik analizlerde, 0,1–5 ng/mL aralığında PAT ile inkübe edilen sensörlerin Rct değerlerinde artan bir trend gözlemlenmiş ve bu artışlar yüksek doğrusal orantı ($R^2=0,99$) ile kalibrasyon eğrisi üzerinde modellenmiştir. Rct vs. [PAT] doğrusal denkleminde; ($R_{ct} = 0,783[PAT] + 1,649$) elde edilen eğim $0,783 \text{ k}\Omega/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu yüksek eğim değeri, sensörün küçük PAT konsantrasyonlarına dahi duyarlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, $0,33 \text{ ng/mL}$ seviyesinde hesaplanan LOD değeri, daha önce geliştirilen voltametrik sensöre kıyasla yaklaşık 10 kat daha düşük olup, elektrokimyasal impedans spektroskopisinin (EIS) bu sistemde daha yüksek duyarlılık sunduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, yapı değiştiren aptamerin impedimetrik mekanizmaya dayalı sinyal üretimini desteklediğini ve bu yöntemin özellikle düşük konsantrasyon aralıklarında güvenilir bir tanı aracı sunduğunu göstermektedir.

Tablo 5.4. İmpedimetrik aptasensöre ait analitik parametreler.

Analitik parameter	Değer
Doğrusal aralık (ng/mL)	0,5-5
Denklem, R_{ct} (k Ω), [PAT] (ng/mL)	$R_{ct}=0,783 [PAT]+1,649$
Hassasiyet (k Ω /(ng/mL)	0,783
Eğimin standart hatası, $\pm$	0,028
Kesimin standart hatası, $\pm$	0,078
R^2	0,99
LOD ng/mL	0,33
LOQ ng/mL	1

Bu çalışmada geliştirilen iki farklı aptamer tabanlı sensör platformu, analitik performans yönünden karşılaştırıldığında, her iki yaklaşımın da kendine özgü avantajlar sunduğu görülmüştür. Yapısal anahtarlama esasına dayalı ve MB etiketli aptamer kullanılan voltametrik sensör, 2–25 ng/mL PAT konsantrasyon aralığında yüksek doğrusal yanıt ($R^2 = 0,993$) göstermiş ve 3,56 ng/mL gibi oldukça düşük bir tespit sınırına ulaşmıştır (Şekil 5.4, Tablo 5.2). Bu platformda moleküler anahtar yapısının etkisiyle hedef bağlanması sonucu sensörün "açık-kapalı" sinyal geçişi sağlanmış; bu durum özellikle düşük PAT konsantrasyonlarında dahi akım şiddetinde belirgin azalmalarla doğrulanmıştır. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim değeri 0,0623 $\mu A/ng.mL$ ile yüksek hassasiyet sergilemiştir. Ayrıca, ölçümlerin tekrarlanabilirliği açısından 0,067 μA 'ya kadar düşük standart sapmalar kaydedilmiş, bu da sensörün güvenilirliğini desteklemiştir.

Diğer yandan, impedimetrik sensör platformu, tiyol ile modifiye edilmiş aptamer kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elektrot yüzeyinde PAT ile oluşan bağlanmanın yük transfer direnci (R_{ct}) üzerindeki etkisi üzerinden değerlendirilmiştir. Bu platformda 0,5–5 ng/mL aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi yüksek bir doğrusal korelasyon ($R^2 = 0,99$) sunmuş; kalibrasyon denklemi;

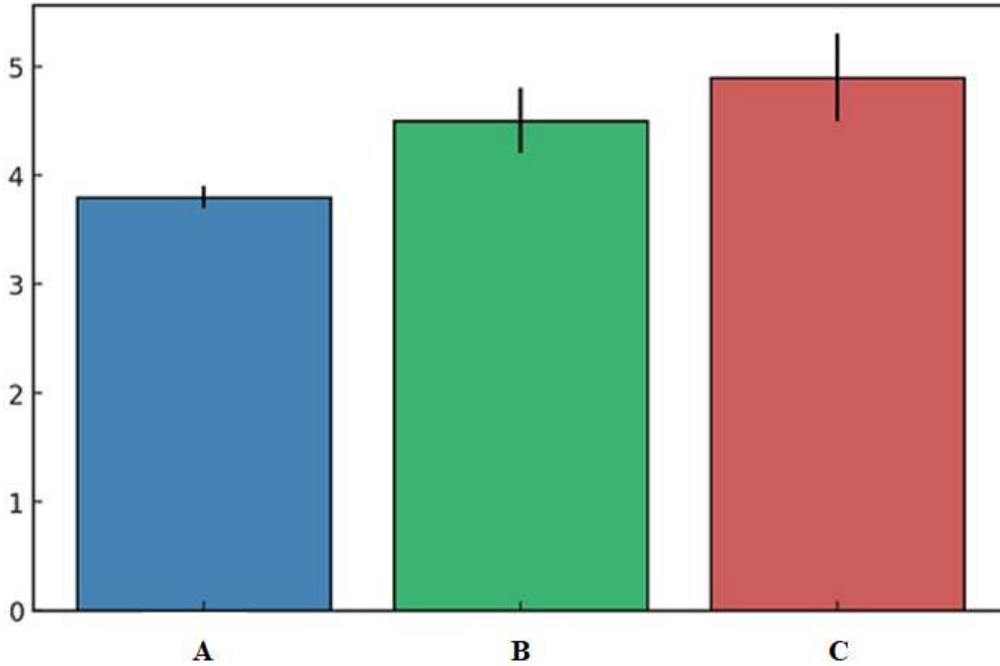
$$R_{ct} = 0,783[PAT] + 1,649 \quad (5.2)$$

olarak belirlenmiştir (Şekil 5.6, Tablo 5.4). İmpedans tabanlı ölçümlerde hesaplanan tespit sınırı (LOD) 0,33 ng/mL ile voltametrik sensöre kıyasla daha düşüktür ve bu durum, sensörün düşük derişimlerde daha hassas ölçüm yapabildiğini göstermektedir. Elde edilen eğim

(0,783 k Ω /ng.mL), sensörün PAT bağlanması ile elektron transferinin etkili şekilde engellendiğini ve bu engelin doğrudan Rct artışına yansıdığını kanıtlamaktadır. Dolayısıyla impedimetrik platform, özellikle sinyal kararlılığı ve düşük LOD açısından üstünlük sağlarken, yapısal anahtarlama sistemde daha geniş bir çalışma aralığı ve yüksek akım değişimi ile gözlenen sinyal amplifikasyonu dikkat çekmektedir.

5.2.2.Girişim, Gerçek Numune ve Raf Ömrü Test Sonuçları

Çalışmanın bu basamağında, çalışmanın ilk bölümünde olduğu gibi girişim yapması muhtemel maddeler olan OTA-A ve ZEN'in, aptasensörün yanıtı üzerindeki etkisi her bir madde için 5 ng/mL derişimde incelenmiştir. Böylece aptamer veya tespit stratejisinden kaynaklanması muhtemel girişim etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen ilgili değerler ile standart sapmalar Şekil 5.7.'te gösterilmiştir. OTA'nın eklenmesi ile elde edilen sinyal değişimi %16,1 $\pm$ 6,9 ve ZEA eklenmesi ile elde edilen sensör cevap değişimi ise %26,7 $\pm$ 11,7 olmuştur. Daha önceki çalışmamızda da (Küçük ve diğ. 2024), OTA-A ve ZEN'in girişim gösterdiği, özellikle de ZEN'in girişiminin yüksek olduğu belirlenmişti. Bu çalışmada kullandığımız ve literatürde rapor edilmiş olan aptamerin seçiminde çeşitli girişimciler ile deneyler yapılmış olsa da (Wu ve diğ. 2016), aptamerin seçiciliğinin özellikle ZEN'e karşı zayıf olduğu, diğer girişimci olan OTA için de 5 ng/mL için %10'dan daha yüksek sensör cevabı kaymasına neden olduğu görülmektedir.



Şekil 5.7. Girişim yapan maddelerin 5 ng/mL derişimdeki aptasensör yanıtı.

(A: PAT, B: PAT+OTA-A, C: PAT+OTA-A+ZEN).

Geliştirilen iki sensör platformu seçicilik açısından karşılaştırıldığında, yapısal anahtarlamalı voltametrik sensörün, PAT'a yapısal olarak benzeyen ZEN ve OTA gibi mikotoksinler karşısında daha düşük düzeyde sinyal kayması gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.5). Bu durum, sensörün hedefe özgül bağlanma kapasitesinin yüksek olduğunu ve çapraz etkileşimlere karşı daha dirençli bir davranış sergilediğini göstermektedir. Bu platformda kullanılan aptamerin 5' ucuna bağlanan metilen mavisi etiketi, yalnızca özgül hedef bağlanması sonucu konformasyonel bir değişiklikle sinyal ürettiğinden, spesifik olmayan etkileşimler sinyale daha az yansımaktadır. Ayrıca, voltametrik sinyalin üretim mekanizması olan "açık-kapalı" yapısal anahtarlama davranışı, yalnızca aptamer-hedef kompleksleşmesi durumunda sinyalin kapanmasına izin verdiği için bu platformun seçicilik avantajı sağladığı düşünülmektedir.

Buna karşın, impedimetrik platformda ZEN ve OTA'nın sensör yanıtında anlamlı düzeyde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.7). Bu platformda sinyal üretimi, yüzeydeki yük transfer direncinin (R_{ct}) hedef molekül bağlanmasıyla artmasına dayanır. Ancak bu mekanizma, aptamer ile gerçekleşen bağlanmanın özgüllüğünden ziyade, yüzeydeki fiziksel tıkanıklığın ve yük aktarım engelini derecesine duyarlıdır. Bu nedenle, yapısal olarak benzer olan veya hidrofobik karakter taşıyan diğer mikotoksinler, sensör yüzeyinde sterik engel oluşturarak R_{ct} değerinde artışa neden olabilmektedir. Özellikle ZEN'nin daha büyük hacimli ve hidrofobik bir molekül olması, aptamer yüzeyine nonspecifik olarak adsorbe olma eğilimini artırmakta ve bu durum sinyali etkilemektedir. Bu bağlamda, impedimetrik platformun çapraz reaktiviteye karşı daha hassas olduğu ve seçiciliğinin, voltametrik sensöre kıyasla nispeten sınırlı olduğu sonucuna varılabilir.

5.3 TARTIŞMA

Bu çalışmada geliştirilen elektrokimyasal aptasensörler, PAT tespitine yönelik mevcut yöntemlerle karşılaştırıldığında rekabetçi ve uygulanabilir alternatif oluşturduğu görülmektedir. Yapısal anahtarlama strateji ile çalışan aptasensörün 1–25 μM 'lık geniş doğrusal çalışma aralığı ve 3,56 ng/mL seviyesindeki düşük LOD, benzer amaçla literatürde bildirilen MOF-temelli MIP sensörler ve immünosensörlerle karşılaştırıldığında dikkat çekicidir. Örneğin, Hatamluyi ve ark. (2020) tarafından geliştirilen bir MOF destekli MIP sensör, PAT için daha düşük bir LOD değeri (0,0007 ng/mL) (Hatamluyi vd., 2020) sunmasına rağmen, sensörün üretim sürecinin çok aşamalı olması ve özel malzeme gereksinimleri, pratik kullanım açısından sınırlayıcı unsurlar oluşturmaktadır. Benzer şekilde, Riberi ve ark. (2020) tarafından raporlanan immünosensörler de oldukça düşük LOD değerleri (9,8 pg/mL ve 360 pg/mL) bildirmiş, ancak antikor temelli tasarımın üretim maliyeti, stabilite sorunları ve antikorların depolama koşullarına duyarlılığı gibi dezavantajları sahada uygulama imkânını kısıtlamaktadır (Riberi vd., 2020).

İmpedimetrik tespit stratejisi ile geliştirilen aptasensör ise, EIS yöntemiyle, Nyquist eğrilerinden elde edilen yük transfer direncindeki (R_{ct}) artışa dayalı olarak PAT tayinini gerçekleştirmiş; 0,5–5 ng/mL aralığında lineer tepki ve 0,328 ng/mL LOD ile yüksek hassasiyet sunmuştur ($R^2 = 0,996$). Bu sensörün düşük konsantrasyonlardaki analitlerin güvenilir tespiti, Xu ve ark. (2019a) tarafından BP NS-GCE üzerine AuNP entegrasyonu ile elde edilen ultra düşük LOD'a kıyasla daha yüksek olmasına rağmen, sensörümüzün kompleks nanomalzeme modifikasyonları gerektirmemesi üretim kolaylığı ve maliyet açısından önemli bir avantajdır (Xu vd., 2019a).

Seçicilik testlerinde ise, impedimetrik aptasensörde ZEN ve OTA varlığında sırasıyla %26,7 ve %16,1 sinyal artışı gözlenmiştir. Bu da yapısal olarak benzer mikotoksinlerin aptamer bağlanma bölgelerinde çapraz etkileşime neden olabileceğini göstermiştir. Yapısal anahtarlama sensöründe ise OTA'nın etkisi daha düşük seviyede gerçekleşmiş (%10'un altında) ve bu fark, sensör tipine ve bağlanma mekanizmasına bağlı olarak seçiciliğin değişebileceğine işaret etmektedir (Wang vd., 2020).

Gerçek örnekler üzerinde yapılan uygulamalarda, elma suyu matrisi içerisinde özellikle düşük konsantrasyonlarda gözlenen girişim etkisi, aptasensör performansını kısmen sınırlamıştır. Bu durum, kompleks gıda matrislerinin içerdiği girişim yapıcı bileşiklerin aptamer-hedef etkileşimini zayıflatabileceğini göstermektedir. Ancak 25 ng/mL gibi daha

yüksek konsantrasyonlarda bu etki ortadan kalkmış ve geri kazanım değerlerinin %6,6 standart sapma ile stabil seyrettiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Pang ve ark. (2022) tarafından farklı matrislerde test edilen aptasensör uygulamalarında da düşük konsantrasyonlarda matris etkisinin analitik performansı olumsuz etkilediği, ancak optimizasyonlar ile bu etkinin minimize edilebildiği bildirilmiştir (Pang vd., 2022).

Aptasensörün 10 günlük stabilite testi sonucunda orijinal sinyalin %13,12'sinin korunmuş olması, kısa süreli depolamalarda pratik kullanıma uygun bir dayanıklılık sağladığını göstermektedir. Aptamer bazlı sensörlerin uzun süreli stabilitesinin artırılmasına yönelik yeni kuşak modifikasyon stratejileri (örneğin kimyasal çapraz bağlayıcılar veya nanomalzeme destekli yapıların kullanılması) bu tür kayıpları azaltabilir ve saha uygulamalarını destekleyebilir (Duan vd., 2024).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında geliştirilen aptasensör, PAT' ın hızlı, hassas ve özgül tespitini mümkün kılarken, maliyet ve üretim kolaylığı açısından da avantaj sunmaktadır. Bununla birlikte, gerçek numune matrislerinde özellikle düşük düzey tespitlerde karşılaşılan girişimlerin minimize edilmesi ve sensör stabilitesinin uzun vadede iyileştirilmesi, gelecek çalışmalarda ele alınması gereken temel konular olarak öne çıkmaktadır. Bu yönüyle geliştirilen platform, gıda güvenliği ve kalite kontrol süreçlerinde hızlı tarama testleri için güçlü bir aday olarak değerlendirilebilir.

Daha kapsamlı olarak, bu çalışmada geliştirilen yapısal anahtarlama aptasensör ve impedimetrik aptasensör yapılarının karşılaştırması şu şekildedir:

Yapısal “açık-kapalı” ve İmpedimetrik stratejilerin sensör performansı

SWV tabanlı sensörümüz, 1–25 ng/mL aralığında $LOD = 3,56 \text{ ng/mL}$ ($R^2 = 0,944$) performansı ile çalışmıştır. Ahmadi ve arkadaşlarının (2019) floresan tabanlı ratiometrik PAT sensörü 6 pg/mL LOD sağlarken, bu yöntem floresan etiketleme gerektirmekte ve pahalı cihazlar kullanmaktadır (Qi vd., 2024). Dolayısıyla, sensörümüz daha yüksek LOD'a sahip olsa da saha uygulamalarında kullanılabilirliği daha yüksektir.

GCE üzerine uygulanan aptamer immobilizasyonu, MCH bloklama ve RSM optimizasyonu ile belirlenen inkübasyon süresinin (120 dk. aptamer, 30 dk. bloklama, 60 dk. PAT) ardından elde edilen lineer aralık 0,5–5 ng/mL, $LOD = 0,328 \text{ ng/mL}$ ($R^2 = 0,996$) olmuştur. Bu LOD değeri, Xu ve ark. (2019a) tarafından BP NS-GCE üzerine AuNP entegrasyonu ile elde edilen $\sim 0,0046 \text{ ng/mL}$ LOD'dan (0,03 nM) daha yüksek olsa da,

önerilen yöntem maliyet, sentez karmaşıklığı ve sahada uygulama kolaylığı açısından avantaj sağlar (Nan vd., 2022).

Literatürde farklı yüzey modifikasyon teknikleri kullanılarak sensörün hassasiyetinin artırıldığı görülmektedir. Örneğin, bazı çalışmalarda (He, Baoshan ve Dong, 2021) MoF, DNA yürüyüş makineleri ve Pt@AuNRs modifikasyonları ile 40 fg/mL seviyelerinde LOD elde etmişlerdir. Ancak bu tarzda stratejiler, hem sensör platformunun üretilmesinde maliyet etkinliği azaltmaktadır hem de zaten 50 ng/mL olan PAT kontaminasyon sınırı için 10^6 kat daha yüksek bir tespit sınırının gerekliliği tartışmaya açıktır. Literatür özeti kısmında belirtildiği üzere PAT gibi genel ve sıklıkla karşılaşılan bir kontaminantın, gıda sektörünün her basamağında tespit zorunluluğu bulunduğundan, daha az maliyetli ve yerinde ölçüme uygun tespit yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada geliştirilen yöntemlerin her ikisi de bu ultra düşük LOD'a ulaşmasa da basit, hızlı ve taşınabilir sistemlere kolay uyum sağlamaktadır. Bu yaklaşım, hassasiyet-pratiklik dengesi açısından önemli bir noktadır.

Seçicilik ve gerçek numune uygulamaları

İmpedans sensörde ZEA ve OTA için sırasıyla $26,7 \pm 11,7$ ve $16,1 \pm 6,9$ oranında pozitif sinyal kayması gözlenmiştir. Literatürde, özellikle benzer yapısal özellikler taşıyan mikotoksinlerin, aptamer tabanlı sensörlerde çapraz tepkimeye neden olabileceği ve seçiciliği olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiştir (Chrouda vd., 2022). Bu durum, elde edilen sinyal değişimlerinin, aptamer-seçiciliğinde yapısal yakınlığın kritik rol oynadığını göstermektedir. Ancak bu türde girişimler, tanı elemanı olan aptamer esaslı olduğundan seçiciliği daha yüksek ve girişim yapması muhtemel moleküllere karşı daha geniş kapsamda seçiciliği doğrulanmış aptamerlerin seçilmesi PAT tespitinde daha seçici sensör platformlarının geliştirilmesini mümkün kılacaktır. Yöntemimizde algılanan girişimlerin, ileri düzey aptamer mühendisliği ve optimizasyon teknikleriyle daha da azaltılabileceği değerlendirilmektedir.

Her iki sensörde elde edilen %90–110 geri kazanım sonuçları, Fang ve ark. (2016) tarafından QCM-MIP sensöründe bildirilen %95–105 geri kazanım değerleriyle uyumludur. Ayrıca Riberi ve ark. (2020) immünosensör çalışması da benzer performans sergilemiştir (Nan vd., 2022). Bu durum elektroanalitik aptasensörlerin gerçek örnek analizlerinde güvenilir alternatifler olduğunu göstermektedir.

Avantaj–dezavantaj dengesi

SWV tabanlı sensörümüz düşük donanım gereksinimi ve kısa analiz süresi (90 dk) gibi güçlü yönlerle sahipken, LOD’u EIS sensörüne göre yaklaşık 10 kat daha yüksektir. Buna karşın EIS sensör, daha düşük LOD (0,328 ng/mL) ve yüksek lineerite ($R^2 = 0,996$) sunmakla beraber daha karmaşık cihazlar ve analiz gerektirir.

Sinyal amplifikasyon stratejileri, LOD’u fg/mL düzeyine indirmek için yaygın olarak kullanılmakta olup, Literatürde karşılaşılan ((He ve Dong, 2021; Zhang vd., 2020)) çalışmalarda DNA yürüyüş makineleri, metal-organik çerçeveler (MOF) ve karmaşık nanoyapı kombinasyonlarıyla bu başarıyı elde etmiştir. Ancak PAT için yasal sınır olan 50 ng/mL’lik değer ile kıyaslandığında 10^6 kat daha hassas bir sensör platformunun geliştirilmesindeki gereklilik net değildir. Ayrıca bu yöntemler yüksek teknik uzmanlık, uzun analiz süresi ve pahalı reaktifler gerektirdiğinden, saha uygulamaları için uygunluğu sınırlıdır. Bu bağlamda, geliştirilen sensör platformlarımız doğrudan sinyal ölçümüne dayalı basit yapılarıyla öne çıkmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, laboratuvar ölçeğinden sahaya uygulanabilir elektroanalitik aptasensörlerin geliştirilmesine yönelik önemli bir adım sunmaktadır. İmpedimetrik sensör yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlarken, yapısal anahtarlama sensörü düşük maliyet ve kullanım kolaylığıyla öne çıkmaktadır. Gelecekte, aptamer mühendisliği, nanomalzeme tabanlı elektrot modifikasyonları, sinyal amplifikasyon teknikleri ve taşınabilir mikro akışkan sistemlerle entegrasyon çalışmaları ile bu platformların daha da geliştirilmesi mümkündür. Özellikle aptamer-MOF kombinasyonları, *in silico* aptamer tasarımı ve mini potansiyostatlarla gerçek zamanlı analiz modüllerinin tasarımı, saha uygulamalarında doğruluk ve güvenilirliği artıracaktır. Bu kapsamda, geliştirilen sensörlerin gıda güvenliği ve çevresel analizlerde yaygın kullanımı için sağlam bir temel oluşturduğu söylenebilir.

Bu çalışmada geliştirilen iki farklı elektrokimyasal aptasensör, kare dalga voltametrisi (SWV) temelli yapısal anahtarlama sensörü ile elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli impedimetrik sensör, hem analitik performansları hem de saha uygulamalarına uygunlukları açısından kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Her iki sensör de elma suyu matriksinde başarılı şekilde çalışmış, %90–110 geri kazanım oranları ve kısa süreli (+4 °C’de 7–10 gün) stabilite performansları ile gerçek örnek analizlerine uygunluk göstermiştir.

Geliştirilen iki elektroanalitik aptasensör platformu olan SWV tabanlı yapısal “açık-kapalı” sensör ile EIS tabanlı impedimetrik sensör, elma suyu analizlerinde %90–110 geri

kazanım ve +4 °C'de 7–10 günlük stabilite göstermiştir. Bu sonuçlar, saha uygulamaları için yeterli güvenilirlik sunmaktadır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, PAT tespitine yönelik yüksek hassasiyetli, seçici ve uygulanabilir iki farklı elektrokimyasal aptasensör başarılı bir şekilde optimize edilerek geliştirilmiştir. Bu amaçla yapısal anahtarlamalı aptasensör ve impedimetrik aptasensör stratejileri ilk kez ve başarıyla uygulanmıştır. Her iki aptasensör platformu için tanı elemanının yüzeye sabitlenmesi önemli bir süreçtir (Sandhyarani, 2019). Yapısal anahtarlamalı aptasensör için optimum koşullar, aptamer anahtarlama nedeniyle sinyal eldesinde daha önemli bir değişken olduğundan ilk kez ve ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir. Aptamer immobilizasyonu için 180 dakika, MCH inkübasyon süresi 40 dakika ve PAT inkübasyonu 89 dakika olarak koşullar optimize edilmiştir. Yapısal anahtarlama prensibine dayalı “açık-kapalı” tipi aptasensör, 1–25 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal bir yanıt vermiş ve elde edilen kalibrasyon eğrisi aşağıdaki regresyon denkleminde tanımlanmıştır:

$$i=0,0623 \cdot [\text{PAT}] + 0,945 \quad (R^2=0,944) \quad (6.1)$$

Sensörün duyarlılığı 0,062 $\mu\text{A} \cdot \text{mL}/\text{ng}$ olarak hesaplanmış, LOD ve LOQ sınırları sırasıyla 3,56 ng/mL ve 10,70 ng/mL olarak belirlenmiştir. Beş farklı elektrot ile yapılan tekrarlanabilirlik analizlerinde elde edilen ortalama yanıt $0,055 \pm 0,012 \mu\text{A}$ (maks. 0,067 μA) olup, bu değerler sistemin yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bulgular, aptamerin konformasyonel değişimine dayanan "açık-kapalı" mekanizmasının düşük sinyal-gürültü oranı ile hassas ölçüm olanağı sunduğunu ortaya koymaktadır.

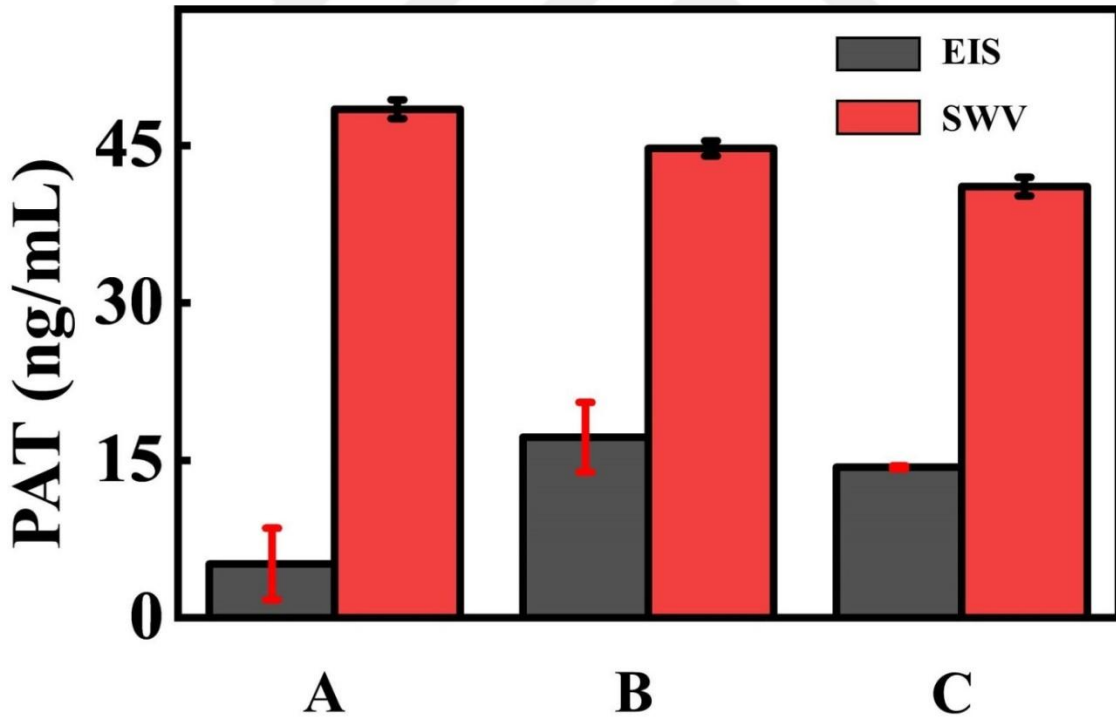
Yapısal anahtarlama temelli bu sensörün analitik performansı literatürde yer alan diğer elektrokimyasal aptasensörlerle karşılaştırıldığında, bildirilen LOD 0,27 pg/mL–0,7 pg/mL aralığındaki metotlardan bir miktar daha yüksektir. Ancak çoğu laboratuvar dışı uygulama için yeterince düşüktür (Tablo 3.2). Diğer “açık-kapalı” tip aptasensörlerle karşılaştırıldığında (floresan tabanlı yöntemlerde 0,003–0,13 ng/mL LOD), elektrokimyasal yöntem daha basit ekipman ve daha düşük maliyet avantajı sunar. Bununla birlikte, elektrokimyasal temelli bu yöntem, basit üretim süreçleri, düşük ekipman gereksinimi ve minimal numune hazırlığı gibi avantajları sayesinde saha analizleri için oldukça elverişlidir. Özellikle floresan tabanlı sistemlerde bildirilen çok düşük LOD değerlerine karşın, elektrokimyasal yaklaşımlar daha pratik, ekonomik ve taşınabilir çözümler sunmaktadır.

İkinci olarak geliştirilen impedimetrik aptasensör, EIS tekniğiyle karakterize edilmiş ve 0,5–5 ng/mL aralığında doğrusal yanıt vermiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi:

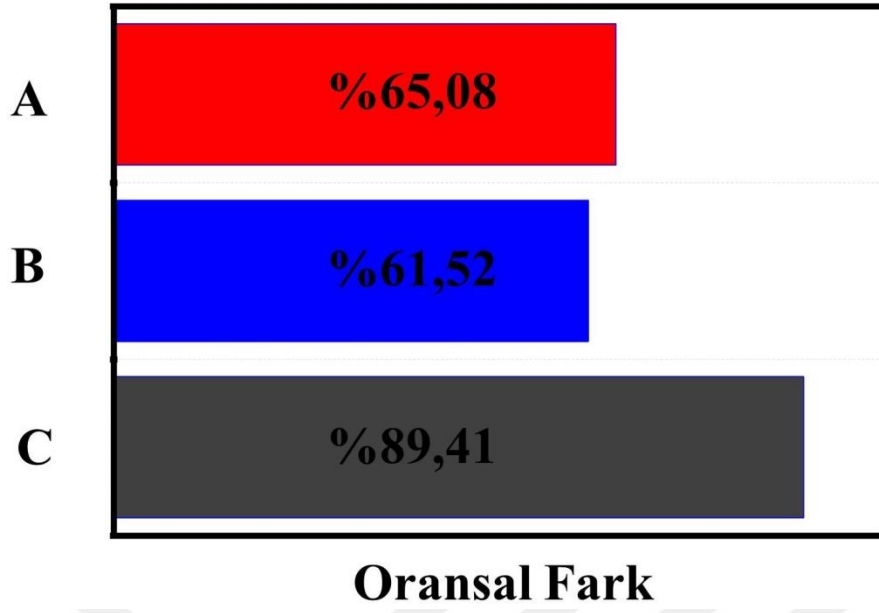
$$R_{ct}=0,783 \cdot [PAT]+1,649 \quad (R^2 = 0,98) \quad (6.2)$$

olarak hesaplanmıştır. Elde edilen doğrusal yanıt, Nyquist diyagramlarından elde edilen R_{ct} artışlarının PAT konsantrasyonu ile yüksek korelasyonunu yansıtmaktadır. Bu sensör için hesaplanan LOD 0,33 ng/mL, LOQ ise 1 ng/mL olup, yapısal anahtarlamalı sensöre kıyasla yaklaşık on kat daha yüksek bir hassasiyet sunmaktadır. Bu durum, düşük PAT seviyelerinin tespitinde impedimetrik yaklaşımın avantaj sağladığını göstermektedir.

Bu çalışmada, SWV ve EIS teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen seçicilik (girişim) testleri kapsamında, üç farklı analitin (A: PAT, B: OTA-A, C: ZEA) neden olduğu sinyal değişimleri karşılaştırılmıştır. Şekil 6.1.'de her iki yönteme ait, spesifik ve çapraz reaktiviteye ilişkin sinyal seviyeleri görselleştirilmiştir. Şekil 6.2. ise, her analit için tespit edilen oransal farklar sunulmaktadır.



Şekil 6.1. Girişim deneylerinde SWV ve EIS yöntemlerinin kıyaslanması (A) PAT, (B) OTA-A, (C) ZEA.



Şekil 6.2. Girişim deneylerinde (A) PAT, (B) OTA-A, (C) ZEA, için tespit edilen oransal farklar.

Analiz sonuçları, özellikle SWV yönteminde gözlemlenen sinyal artışlarının, EIS yöntemine kıyasla oldukça yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, A (PAT) analitinde SWV ile elde edilen sinyal yaklaşık 45 ng/mL seviyesinde iken, aynı koşullarda EIS ile ölçülen değer 5 ng/mL civarındadır. Benzer şekilde, B (OTA-A) ve C (ZEA) analitleri için de SWV, EIS'e göre belirgin şekilde daha yüksek çıkışlar vermiştir. Bu bulgular, SWV yönteminin, hedef dışı analitlerin varlığında dahi sensör yanıtında önemli artışlara yol açabileceğini göstermektedir. Oransal farklar açısından incelendiğinde, C analitinde (%89,41) gözlenen yüksek değer, bu yöntemin, özellikle ZEA gibi yapısal olarak benzer mikotoksinlerde özgüllük sorununa daha açık olduğunu düşündürmektedir.

Diğer yandan, EIS tabanlı ölçümler, tüm girişimci analitler için daha düşük sinyal artışları sergilemiş ve yöntemin çapraz tepkilere karşı daha dirençli olabileceğine işaret etmiştir. Bu durum, EIS'in, yüzeyde gerçekleşen bağlanma olaylarının elektriksel özellikler üzerindeki etkisini daha seçici şekilde algılayabilmesine bağlanabilir.

Çalışmada gözlenen bir diğer önemli husus, özellikle SWV ölçümlerinde PAT, OTA-A ve ZEA'nın tümünde anlamlı düzeyde sinyal artışı gözlenmesidir. Bu durum, aptamer bazlı sensörlerde bağlanma bölgelerinin mikotoksinler arasındaki yapısal yakınlık nedeniyle belirli oranda çapraz etkileşime açık olabileceğini göstermektedir. Nitekim bu tür yanıtlar, sensörün seçicilik parametrelerinde önemli bir kısıt oluşturabilir. Özellikle C (ZEA) analitiğinde elde

edilen %89,41'lik oransal fark, yapısal benzerliğin aptamer sensör performansı üzerindeki etkisini güçlü biçimde ortaya koymaktadır.

SWV yöntemi, MB gibi redoks etiketli aptamerlerle çalışıldığında, aptamer hedef dışı moleküllerle (örneğin OTA, ZEA gibi) zayıf bağlanmalar yapsa bile, sinyalde önemli bir artış gözlemlenebilir. Çünkü MB ucu, hedef molekül bağlandığında elektroda daha yakın konumlanır ve bu da güçlü bir sinyal artışına neden olur (Chang vd., 2024). Oysa EIS, yüzeydeki iletkenlik ve kapasitans gibi özelliklerdeki değişiklikleri ölçer ve yalnızca güçlü ve özgül bağlanmalar sinyalle sonuçlanır. SH-modifikasyonlu aptamerlerde bu zayıf etkileşimlerin etkisi daha sınırlı kalır (Abd-Ellatief ve Abd-Ellatief, 2021; Rozenblum vd., 2019).

MB ile modifiye edilmiş aptamer, bağlanma sonrası konformasyonel değişikliğe bağlı olarak sinyal gücünü artırır. Ancak bu yapı, hedef dışı moleküllerin dalgalı bağlanma durumlarında bile tespit edilebilir sinyal oluşturmaya neden olabilir.

SH terminali ile immobilize edilen aptamer, genellikle daha kararlı şekilde altın yüzeye bağlanır. Bu nedenle yalnızca belirgin ve özgül bağlanmalar sensör çıkışında anlamlı değişikliğe yol açar. Dolayısıyla seçicilik açısından daha tutarlı sonuç verir, ancak duyarlılığı biraz daha düşüktür (Xu vd., 2009).

MB modifikasyonlu aptamer ile gerçekleştirilen SWV tabanlı ölçümler, zayıf bağlanmaların dahi sinyal üretmesine olanak tanırken, SH terminali ile immobilize edilen aptamer ve EIS tabanlı analiz bu tür etkileşimlerde daha düşük sinyal artışı verir. Dolayısıyla gözlenen girişim farkları yalnızca yöntem veya yalnızca modifikasyona atfedilemez; bu fark, iletişim çiftinin (aptamer + yöntem) birlikte yarattığı etkileşimlerden kaynaklanmaktadır (Abd-Ellatief ve Abd-Ellatief, 2021; Chang vd., 2024; Rozenblum vd., 2019; Xu, Y. vd., 2009).

Literatürde nükleik asit amplifikasyonları (örn. DNA yürüyüş makineleri), altın nanopartiküller/grafen-MOF entegrasyonları ve taşınabilir mikroakışkan sistemlerle yapılan çalışmalar, hem LOD düşürülmesi hem de seçicilik artırılması için önemli yaklaşımlar sunmaktadır (Rabiee vd., 2024).

Seçicilik çalışmaları kapsamında yapılan girişim testlerinde, 5 ng/mL seviyesindeki OTA ve ZEA varlığında sırasıyla $16,1 \pm 6,9$ ve $26,7 \pm 11,7$ oranlarında pozitif sinyal sapmaları gözlemlenmiştir. Özellikle ZEA için belirgin olan bu girişim etkisi, elma suyu gibi bazı gıda matrislerinde bu toksinin genellikle düşük düzeyde bulunması nedeniyle pratik uygulamalarda ciddi bir sorun teşkil etmemektedir. Bununla birlikte, gerektiğinde örnek ön

temizleme adımlarının entegrasyonu ile seçiciliğin daha da artırılabilceğı düşünölmektedir. Sonuç olarak, iki farklı elektroanalitik tekniğın girişim testlerindeki performans farklılıkları, sensör tasarımıında kullanılacak aptamerin seçimi ve analiz yönteminin belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır. EIS'in daha özgül sonuçlar sunma eğilimine karşın, SWV'nin duyarlılık açısından avantajlı fakat seçicilik yönünden daha fazla iyileştirme gerektirdiğı görölmektedir. Bu bulgular ışığında, ileri aptamer mühendisliğı ve *in silico* konformasyon analizleri gibi yaklaşımların, çapraz reaktivite sorunlarının aşılmasında önemli bir strateji olabileceğı düşünölmektedir.

Geliştirilen aptasensör, elma suyu örneklerinde gerçekleştirilen standart ekleme analizleriyle test edilmiş ve %90–110 arasında değışen geri kazanım oranlarıyla başarılı bir performans sergilemiştir. Yapısal anahtarlama sensörü +4 °C'de 10 gün, impedimetrik sensör ise 7 gün boyunca stabilitesini korumuş; bu durum kısa süreli depolama ve saha uygulamaları açısından sensörlerin yeterli raf ömrüne sahip olduğunu göstermiştir.

Genel olarak değeriendirildiğinde, yapısal anahtarlama sensörü düşük maliyet, kolay taşınabilirlik ve hızlı okuma avantajlarıyla saha uygulamalarına uygunken; impedimetrik sensör daha yüksek hassasiyet, daha geniş dinamik aralık ve yüksek lineerite gibi üstün analitik performans özellikleri sunmaktadır. Ancak EIS tekniğinin daha karmaşık cihaz ve veri analiz süreçleri gerektirdiğı de göz önünde bulundurulmalıdır. Her iki yaklaşımda da aptamerin seçiciliğı, sensör yüzey kimyası ve üretim süreçlerinin standardizasyonu performans üzerinde belirleyici rol oynamaktadır.

Bu tez kapsamında elde edilen bulgular, PAT gibi toksik bileşiklerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesine yönelik yeni nesil sensör tasarımları için önemli bir temel oluşturmaktadır. Gelecek çalışmalarda, daha yüksek seçicilik sunan aptamer dizilerinin kullanımı, nano-malzeme destekli yüzey modifikasyonlarıyla sensör hassasiyetinin artırılması, yapısal ve impedans verilerinin kombinasyonuna dayalı çok parametrelili analiz yaklaşımlarının geliştirilmesi ve taşınabilir cihaz entegrasyonlarının sağlanması önerilmektedir. Ayrıca, uzun dönem stabilite çalışmalarına odaklanılarak sensörlerin raf ömrünün artırılması ve ticari uygulamalara yönelik prototip optimizasyonlarının yapılması da önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır.

Gelecekte bu sensörlerin daha da geliştirilmesi için birtakım öneriler sunulabilir. Öncelikle, aptamer dizilerinin seçiciliğini artırmak amacıyla mutasyon geçirmiş veya yeni nesil aptamerlerin kullanımı, girişim etkilerini minimize edebilir. Sensör performansının

artırılması amacıyla, altın nanopartiküller, grafen türevleri veya metal-organik çerçeveler gibi nanomalzemelerin yüzey entegrasyonu LOD değerini düşürürken aynı zamanda uzun dönem kararlılığa katkı sağlayabilir. Ayrıca, yapısal anahtarlama verisi ile impedans yanıtlarının birlikte değerlendirilmesiyle daha güvenilir kantifikasyon algoritmaları geliştirilebilir. Bu yaklaşımlar, taşınabilir potansiyostat veya EIS modülleriyle entegre edilerek saha uygulamaları için gerçek zamanlı analiz imkânı yaratabilir. Son olarak, uzun dönem stabiliteyi artırmaya yönelik yüzey modifikasyonları ve 30–60 gün saklama koşullarını kapsayan çalışmalarla sensörlerin raf ömrü uzatılabilir. Bu öneriler doğrultusunda geliştirilecek aptasensör platformları, gıda güvenliği ve çevresel izleme başta olmak üzere birçok alanda etkili, hızlı ve güvenilir tespit araçları olarak değerlendirilebilir.



KAYNAKÇA

- Abd-Ellatief, R. & Abd-Ellatief, M. R.** (2021). Electrochemical Aptasensors: Current Status and Future Perspectives. *Diagnostics (Basel)*, 11(1).
- Ahmadi, A., Danesh, N. M., Ramezani, M., Alibolandi, M., Lavaee, P., Emrani, A. S., . . . Taghdisi, S. M.** (2019). A rapid and simple ratiometric fluorescent sensor for patulin detection based on a stabilized DNA duplex probe containing less amount of aptamer-involved base pairs. *Talanta*, 204, 641-646.
- Al-Jaal, B. A., Jaganjac, M., Barcaru, A., Horvatovich, P. & Latiff, A.** (2019). Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic literature review, 2001–2018. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 211-228.
- Aşık, İ.** (2020). *Altın nanoparçacık-grafen nanoşerit modifiye camı karbon elektrotun hazırlanması, karakterizasyonu, parasetamol ve Sudan I için elektroanalitik uygulamaları*. (PhD Thesis), Kütahya Dumlupınar Üniversitesi.
- Barreira, M. J., Alvito, P. C. & Almeida, C. M. M.** (2010). Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry*, 121(3), 653-658.
- Beitollahi, H., Tajik, S., Dourandish, Z., Zhang, K., Le, Q. V., Jang, H. W., . . . Shokouhimehr, M.** (2020). Recent Advances in the Aptamer-Based Electrochemical Biosensors for Detecting Aflatoxin B1 and Its Pertinent Metabolite Aflatoxin M1. *Sensors*, 20(11).
- BelBruno, J. J.** (2019). Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical Reviews*, 119(1), 94-119.
- Bell, S.** (2009). Experimental Design. In Kitchin, R. ve Thrift, N. (Eds.), *International Encyclopedia of Human Geography* (pp. 672-675). Oxford: Elsevier.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P.** (2016). Introduction to biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 1-8.
- Bonaldo, S., Franchin, L., Pasqualotto, E., Cretaio, E., Losasso, C., Peruzzo, A. & Paccagnella, A.** (2023). Influence of BSA Protein on Electrochemical Response of Genosensors. *IEEE Sensors Journal*, 23(3), 1786-1794.
- Brause, A. R., Trucksess, M. W., Thomas, F. S., Page, S. W., Collaborators: & Collaborators:.** (2020). Determination of Patulin in Apple Juice by Liquid

- Chromatography: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 79(2), 451-455.
- Chang, W., Zheng, Z., Ma, Y., Du, Y., Shi, X. & Wang, C.** (2024). An electrochemical aptasensor for methylamphetamine rapid detection by single-on mode based on competition with complementary DNA. *Scientific Reports*, 14(1), 9279.
- Chen, X., F. Abdallah, M., Chen, X. & Rajkovic, A.** (2023). Current Knowledge of Individual and Combined Toxicities of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 In Vitro. *Toxins*, 15(11).
- Chen, Y., Yang, Y., Wang, Y., Peng, Y., Nie, J., Gao, G. & Zhi, J.** (2020). Development of an Escherichia coli-based electrochemical biosensor for mycotoxin toxicity detection. *Bioelectrochemistry*, 133, 107453.
- Chrouda, A., Ayed, D., Zinoubi, K., Majdoub, H. & Jaffrezic-Renault, N.** (2022). Highly stable and ultra-sensitive amperometric aptasensor based on pectin stabilized gold nanoparticles on graphene oxide modified GCE for the detection of aflatoxin M1. *Food Chemistry Advances*, 1, 100068.
- Çağlayan, M.** (2016). Electrochemical Aptasensors for Early Cancer Diagnosis: A Review. *Current Analytical Chemistry*, 13, 18-30.
- Dempsey, J. L., Jackson, M. N. & Peroff, A. G.** (2024). Meeting the Need: Formal Electrochemistry Training through Workshops. *Journal of Chemical Education*, 101(2), 483-489.
- Dong, Q., Manns, D. C., Feng, G., Yue, T., Churey, J. J. & Worobo, R. W.** (2010). Reduction of patulin in apple cider by UV radiation. *Journal of Food Protection*, 73(1), 69-74.
- Dong, Y., Zhang, T., Lin, X., Feng, J., Luo, F., Gao, H., . . . He, Q.** (2020). Graphene/aptamer probes for small molecule detection: from in vitro test to in situ imaging. *Microchimica Acta*, 187(3), 1-18.
- Duan, H., Tang, S.-Y., Goda, K. & Li, M.** (2024). Enhancing the sensitivity and stability of electrochemical aptamer-based sensors by AuNPs@MXene nanocomposite for continuous monitoring of biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, 246, 115918.
- Duan, N., Wu, S., Dai, S., Gu, H., Hao, L., Ye, H. & Wang, Z.** (2016). Advances in aptasensors for the detection of food contaminants. *Analyst*, 141(13), 3942-3961.

- Economou, A., Kokkinos, C., Bousiakou, L. & Hianik, T.** (2023). Paper-Based Aptasensors: Working Principles, Detection Modes, and Applications. *Sensors*, 23(18).
- Erkal-Aytemur, A., Şahin, S., Üstündağ, Z., Mülazımoğlu, İ. E. & Caglayan, M. O.** (2024). Determination of carcinoembryonic antigen (CEA) by surface plasmon resonance-enhanced total internal reflection ellipsometry (SPRe-TIRE). *Instrumentation Science & Technology*, 52(2), 203-219.
- Erkal Aytemur, A.** (2024). Karsinoembriyonik antijen tayini için aptamer esaslı yöntemlerin geliştirilmesi.
- Evtugyn, G. & Hianik, T.** (2019). Electrochemical Immuno- and Aptasensors for Mycotoxin Determination. *Chemosensors*, 7(1), 10.
- Evtugyn, G., Porfireva, A., Kulikova, T. & Hianik, T.** (2021). Recent Achievements in Electrochemical and Surface Plasmon Resonance Aptasensors for Mycotoxins Detection. *Chemosensors*, 9(7).
- Evtugyn, G. A., Shamagsumova, R. V. & Hianik, T.** (2017). 2 - Biosensors for detection mycotoxins and pathogenic bacteria in food. In Grumezescu, A. M. (Ed.), *Nanobiosensors* (pp. 35-92): Academic Press.
- Fang, G., Wang, H., Yang, Y., Liu, G. & Wang, S.** (2016). Development and application of a quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted sol-gel polymer for rapid detection of patulin in foods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237, 239-246.
- Fischer, L. M., Tenje, M., Heiskanen, A. R., Masuda, N., Castillo, J., Bienten, A., . . . Boisen, A.** (2009). Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectronic Engineering*, 86(4), 1282-1285.
- Gashlan, H.** (2009). High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia. *Scientific Research and Essay*, 4, 69-72.
- Gaspar, E. M. & Lucena, A. F.** (2009). Improved HPLC methodology for food control—furfurals and patulin as markers of quality. *Food Chemistry*, 114(4), 1576-1582.
- Gavrilaş, S., Ursachi, C. Ş., Perţa-Crişan, S. & Munteanu, F.-D.** (2022). Recent Trends in Biosensors for Environmental Quality Monitoring. *Sensors*, 22(4).

- Giovannoli, C., Spano, G., Di Nardo, F., Anfossi, L. & Baggiani, C.** (2017). Screening of a combinatorial library of organic polymers for the solid-phase extraction of patulin from apple juice. *Toxins*, 9(5), 174.
- Hatamluyi, B., Rezayi, M., Beheshti, H. R. & Boroushaki, M. T.** (2020). Ultra-sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor for patulin detection based on a novel assembling strategy using Au@Cu-MOF/N-GQDs. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 318, 128219.
- Hatamluyi, B., Rezayi, M., Beheshti, H. R. & Boroushaki, M. T.** (2020). Ultra-sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor for patulin detection based on a novel assembling strategy using Au@Cu-MOF/N-GQDs. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 318.
- He, B. & Dong, X.** (2018). Aptamer based voltammetric patulin assay based on the use of ZnO nanorods. *Microchimica Acta*, 185(10).
- He, B. & Dong, X.** (2018). Aptamer based voltammetric patulin assay based on the use of ZnO nanorods. *Microchimica Acta*, 185(10), 462.
- He, B. & Dong, X.** (2019). Hierarchically porous Zr-MOFs labelled methylene blue as signal tags for electrochemical patulin aptasensor based on ZnO nano flower. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 294, 192-198.
- He, B. & Dong, X.** (2019). Hierarchically porous Zr-MOFs labelled methylene blue as signal tags for electrochemical patulin aptasensor based on ZnO nano flower. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 294, 192-198.
- He, B. & Dong, X.** (2021). Nb.BbvCI powered DNA walking machine-based Zr-MOFs-labeled electrochemical aptasensor using Pt@AuNRs/Fe-MOFs/PEI-rGO as electrode modification material for patulin detection. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126642.
- He, B. & Lu, X.** (2020). An electrochemical aptasensor based on tetrahedral DNA nanostructures as a signal probe carrier platform for sensitive detection of patulin. *Analytica Chimica Acta*, 1138, 123-131.
- Hu, W., Chen, H., Zhang, H., He, G., Li, X., Zhang, X., . . . Li, C. M.** (2014). Sensitive detection of multiple mycotoxins by SPRi with gold nanoparticles as signal amplification tags. *Journal of colloid and interface science*, 431, 71-76.

- Huang, Q., Zhao, Z., Nie, D., Jiang, K., Guo, W., Fan, K., . . . Han, Z.** (2019a). Molecularly imprinted poly (thionine)-based electrochemical sensing platform for fast and selective ultratrace determination of patulin. *Analytical chemistry*, 91(6), 4116-4123.
- Huang, Q., Zhao, Z., Nie, D., Jiang, K., Guo, W., Fan, K., . . . Han, Z.** (2019b). Molecularly Imprinted Poly(thionine)-Based Electrochemical Sensing Platform for Fast and Selective Ultratrace Determination of Patulin. *Analytical chemistry*, 91(6), 4116-4123.
- Jalali, A., Khorasgani, Z., Goudarzi, M. & Khoshlesan, N.** (2010). HPLC determination of patulin in apple juice: a single center study of Southwest area of Iran. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(5), 208-214.
- Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Stela, M., Saluk-Bijak, J., Siadkowski, A. & Bijak, M.** (2020). Molecular Aspects of Mycotoxins—A Serious Problem for Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8187.
- Kang, Y., Gu, H.-X. & Zhang, X.** (2019). A self-referenced method for determination of patulin by surface-enhanced Raman scattering using gold nanobipyramids as the substrate. *Analytical Methods*, 11(40), 5142-5149.
- Khan, R., Aissa, S. B., Sherazi, T. A., Catanante, G., Hayat, A. & Marty, J. L.** (2019). Development of an impedimetric aptasensor for label free detection of patulin in apple juice. *Molecules*, 24(6).
- Khan, R., Ben Aissa, S., Sherazi, T. A., Catanante, G., Hayat, A. & Marty, J. L.** (2019). Development of an impedimetric aptasensor for label free detection of patulin in apple juice. *Molecules*, 24(6), 1017.
- Khan, R., Sherazi, T. A., Catanante, G., Rasheed, S., Marty, J. L. & Hayat, A.** (2020). Switchable fluorescence sensor toward PAT via CA-MWCNTs quenched aptamer-tagged carboxyfluorescein. *Food Chemistry*, 312, 126048.
- Khan, R., Sherazi, T. A., Catanante, G., Rasheed, S., Marty, J. L. & Hayat, A.** (2020). Switchable fluorescence sensor toward PAT via CA-MWCNTs quenched aptamer-tagged carboxyfluorescein. *Food Chemistry*, 312.

- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. & Nehls, I.** (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1595-1612.
- Ku, T.-H., Zhang, T., Luo, H., Yen, T. M., Chen, P.-W., Han, Y. & Lo, Y.-H.** (2015). Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors (Basel)*, 15(7), 16281-16313.
- Lhotská, I., Holznerová, A., Solich, P. & Šatínský, D.** (2017). Critical comparison of the on-line and off-line molecularly imprinted solid-phase extraction of patulin coupled with liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 40(23), 4599-4609.
- Li, F., Jiang, D., Zhou, J., Chen, J., Li, W. & Zheng, F.** (2016). Mycotoxins in wheat flour and intake assessment in Shandong province of China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 9(3), 170-175.
- Li, X., Li, H., Ma, W., Guo, Z., Li, X., Li, X. & Zhang, Q.** (2018). Determination of patulin in apple juice by single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 257, 1-6.
- Llovera, M., Viladrich, R., Torres, M. & Canela, R.** (1999). Analysis of Underivatized Patulin by a GC-MS Technique. *Journal of Food Protection*, 62(2), 202-205.
- Lucci, P., Moret, S., Bettin, S. & Conte, L.** (2017). Selective solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer for the analysis of patulin in apple-based foods. *Journal of separation science*, 40(2), 458-465.
- Ma, L., Guo, T., Pan, S. & Zhang, Y.** (2018). A fluorometric aptasensor for patulin based on the use of magnetized graphene oxide and DNase I-assisted target recycling amplification. *Microchimica Acta*, 185(10).
- Ma, L., Guo, T., Pan, S. & Zhang, Y.** (2018). A fluorometric aptasensor for patulin based on the use of magnetized graphene oxide and DNase I-assisted target recycling amplification. *Microchimica Acta*, 185(10), 487.
- Malecka-Baturo, K., Żółtowska, P., Jackowska, A., Kurzątkowska-Adaszyńska, K. & Grabowska, I.** (2024). Electrochemical Aptasensing Platform for the Detection of Retinol Binding Protein-4. *Biosensors (Basel)*, 14(2).
- Meega, R. & Rupak, K.** (2023). - Response surface methodology (RSM): An overview to analyze multivariate data.

- Morales, H., Marín, S., Ramos, A. J. & Sanchis, V.** (2010). Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control*, 21(7), 953-962.
- Murillo-Arbizu, M., Amézqueta, S., González-Peñas, E. & de Cerain, A. L.** (2009). Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chemistry*, 113(2), 420-423.
- Nan, M., Xue, H. & Bi, Y.** (2022). Contamination, Detection and Control of Mycotoxins in Fruits and Vegetables. *Toxins*, 14(5).
- Ngolong Ngea, G. L., Yang, Q., Castoria, R., Zhang, X., Routledge, M. N. & Zhang, H.** (2020). Recent trends in detecting, controlling, and detoxifying of patulin mycotoxin using biotechnology methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2447-2472.
- Notardonato, I., Gianfagna, S., Castoria, R., Ianiri, G., De Curtis, F., Russo, M. V. & Avino, P.** (2021). Critical review of the analytical methods for determining the mycotoxin patulin in food matrices. 40(1), 144-160.
- Oruç, H.** (2014). Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24, 105-110.
- Paimard, G., Ghasali, E. & Baeza, M.** (2023). Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors*, 11(2).
- Pan, C., Wei, C., Wang, X., Jin, Y. & Tian, F.** (2025). Patulin-degrading enzymes sources, structures, and mechanisms: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 291, 139148.
- Pang, H., Li, H., Zhang, W., Mao, J., Zhang, L., Zhang, Z., . . . Li, P.** (2022). Fullerenol Quantum Dots-Based Highly Sensitive Fluorescence Aptasensor for Patulin in Apple Juice. *Toxins*, 14(4), 272.
- Pedersen, T., Gurevich, L. & Magnusson, N. E.** (2025). Aspects of Electrochemical Biosensors Using Affinity Assays. *Biosensors*, 15(3).
- Pellitero, M. A., Curtis, S. D. & Arroyo-Currás, N.** (2021). Interrogation of Electrochemical Aptamer-Based Sensors via Peak-to-Peak Separation in Cyclic Voltammetry Improves the Temporal Stability and Batch-to-Batch Variability in Biological Fluids. *ACS Sensors*, 6(3), 1199-1207.

- Pennacchio, A., Varriale, A., Esposito, M. G., Staiano, M. & D'Auria, S. (2015).** A near-infrared fluorescence assay method to detect patulin in food. *Analytical Biochemistry*, 481, 55-59.
- Pinhão, M., Tavares, A. M., Loureiro, S., Louro, H., Alvito, P. & Silva, M. J. (2020).** Combined cytotoxic and genotoxic effects of ochratoxin A and fumonisin B1 in human kidney and liver cell models. *Toxicology in Vitro*, 68, 104949.
- Puel, O., Galtier, P. & Oswald, I. P. (2010).** Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*, 2(4), 613-631.
- Qi, S., Dong, X., Hamed, E. M., Jiang, H., Cao, W., Yau Li, S. F. & Wang, Z. (2024).** Ratiometric Fluorescence Aptasensor of Allergen Protein Based on Multivalent Aptamer-Encoded DNA Flowers as Fluorescence Resonance Energy Transfer Platform. *Anal Chem*, 96(18), 6947-6957.
- Rabiee, N., Ahmadi, S., Rahimizadeh, K., Chen, S. & Veedu, R. N. (2024).** Metallic nanostructure-based aptasensors for robust detection of proteins. *Nanoscale Advances*, 6(3), 747-776.
- Radi, A.-E. (2011).** Electrochemical Aptamer-Based Biosensors: Recent Advances and Perspectives. *International Journal of Electrochemistry*, 2011, 863196.
- Ren, C., Li, H., Lu, X., Qian, J., Zhu, M., Chen, W., . . . Wang, K. (2017).** A disposable aptasensing device for label-free detection of fumonisin B1 by integrating PDMS film-based micro-cell and screen-printed carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251, 192-199.
- Riberi, W. I., Zon, M. A., Fernández, H. & Arévalo, F. J. (2020).** Impedimetric immunosensor to determine patulin in apple juices using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide. *Microchemical Journal*, 158, 105192.
- Rong, X., Wang, Y., Ouyang, F., Song, W., Li, S., Li, F., . . . Li, D. (2023).** Combined effects of zearalenone and deoxynivalenol on oxidative stress, hepatotoxicity, apoptosis, and inflammation in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*, 859, 160233.
- Rovira, R., Ribera, F., Sanchis, V. & Canela, R. (1993).** Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(2), 214-216.

- Rozenblum, G. T., Pollitzer, I. G. & Radrizzani, M.** (2019). Challenges in Electrochemical Aptasensors and Current Sensing Architectures Using Flat Gold Surfaces. *Chemosensors*, 7(4).
- Sandhyarani, N.** (2019). Chapter 3 - Surface modification methods for electrochemical biosensors. In Ensafi, A. A. (Ed.), *Electrochemical Biosensors* (pp. 45-75): Elsevier.
- Schmidt, C., Kammel, A., Tanner, J. A., Kinghorn, A. B., Khan, M. M., Lehmann, W., . . . Rödiger, S.** (2022). A multiparametric fluorescence assay for screening aptamer–protein interactions based on microbeads. *Scientific Reports*, 12(1), 2961.
- Shabeer, S., Asad, S., Jamal, A. & Ali, A.** (2022). Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review. *Toxins*, 14(5).
- Shan, H., Li, X., Liu, L., Song, D. & Wang, Z.** (2020). Recent advances in nanocomposite-based electrochemical aptasensors for the detection of toxins. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(27), 5808-5825.
- Sharma, A. K., Kumar, A. & Rijal, R.** (2025). Phylogenetic studies and distinction of aflatoxin-producing *Aspergillus* species in section Flavi, Ochraceorosei and Nidulantes: A review. *Gene*, 937, 149151.
- Shaver, A., Curtis, S. D. & Arroyo-Currás, N.** (2020). Alkanethiol Monolayer End Groups Affect the Long-Term Operational Stability and Signaling of Electrochemical, Aptamer-Based Sensors in Biological Fluids. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(9), 11214-11223.
- Sheraz, M., Sun, X.-F., Wang, Y., Chen, J. & Sun, L.** (2024). Recent Developments in Aptamer-Based Sensors for Diagnostics. *Sensors*, 24(23).
- Song, X., Wang, D. & Kim, M.** (2019). Immunoliposome-based fluorometric patulin assay by using immunomagnetic nanoparticles. *Microchimica Acta*, 186(12).
- Song, X., Wang, D. & Kim, M.** (2019). Immunoliposome-based fluorometric patulin assay by using immunomagnetic nanoparticles. *Microchimica Acta*, 186(12), 1-7.
- Song, X., Wang, D. & Kim, M.** (2021). Development of an immuno-electrochemical glass carbon electrode sensor based on graphene oxide/gold nanocomposite and antibody for the detection of patulin. *Food Chemistry*, 342.

- Song, X., Wang, D. & Kim, M.** (2021). Development of an immuno-electrochemical glass carbon electrode sensor based on graphene oxide/gold nanocomposite and antibody for the detection of patulin. *Food Chemistry*, 342, 128257.
- Stan, D., Mirica, A.-C., Iosub, R., Stan, D., Mincu, N. B., Gheorghe, M., . . . Bocancia Mateescu, A. L.** (2022). What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? *Processes*, 10(4).
- Suleman, S., Anzar, N., Patil, S., Azmi, Z., Parvez, S. & Narang, J.** (2024). Wearable cassette for paper-based aptasensor designed to detection of illicit drug; ketamine- a wearable cassette prototype comparison study. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 18, 100463.
- Şahin, G., Ünüvar, S. & Baydar, T.** (2011). Patulin: toksisitesi ve bebek beslenmesinde kullanılan ürünlerde olası bulaşma. *Türk Pediatri Arsivi*, 46, 275-279.
- Şahin, S., Kaya, Ş., Üstündağ, Z. & Caglayan, M. O.** (2022). An electrochemical signal switch-based (on-off) aptasensor for sensitive detection of insulin on gold-deposited screen-printed electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 26(4), 907-915.
- Tang, H., Li, X., Zhang, F., Meng, X. & Liu, B.** (2019). Biodegradation of the mycotoxin patulin in apple juice by Orotate phosphoribosyltransferase from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Food Control*, 100, 158-164.
- Tomita, Y., Morita, Y., Suga, H. & Fujiwara, D.** (2016). DNA module platform for developing colorimetric aptamer sensors. *BioTechniques*, 60(6), 285-292.
- Tuerk, C. & Gold, L.** (1990). Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science*, 249(4968), 505-510.
- Vasilescu, A., Gáspár, S., Gheorghiu, M., Polonschii, C., Banciu, R. M., David, S., . . . Marty, J.-L.** (2025). Promising Solutions to Address the Non-Specific Adsorption in Biosensors Based on Coupled Electrochemical-Surface Plasmon Resonance Detection. *Chemosensors*, 13(3).
- Verrinder, E., Leung, K., Erdal, M., Sepunaru, L. & Plaxco, K.** (2023). Comparison of voltammetric methods used in the interrogation of electrochemical aptamer-based sensors. *Sensors & Diagnostics*, 3.

- Vidal, A., Ouhibi, S., Ghali, R., Hedhili, A., De Saeger, S. & De Boevre, M.** (2019). The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 249-256.
- Wang, Q., Yang, Q. & Wu, W.** (2020). Graphene-based steganographic aptasensor for information computing and monitoring toxins of biofilm in food. *Frontiers in microbiology*, 10, 3139.
- Wang, Y., Wen, Y. & Ling, Y.-C.** (2017). Graphene Oxide-Based Magnetic Solid Phase Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography for Determination of Patulin in Apple Juice. *Food Analytical Methods*, 10(1), 210-218.
- Wei, C., Yu, L., Qiao, N., Wang, S., Tian, F., Zhao, J., . . . Chen, W.** (2020). The characteristics of patulin detoxification by *Lactobacillus plantarum* 13M5. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111787.
- Welke, J. E., Hoeltz, M., Dottori, H. A. & Noll, I. B.** (2009). Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. *Food Control*, 20(1), 48-52.
- Wu, L., Yan, H., Li, G., Xu, X., Zhu, L., Chen, X. & Wang, J.** (2019). Surface-Imprinted Gold Nanoparticle-Based Surface-Enhanced Raman Scattering for Sensitive and Specific Detection of Patulin in Food Samples. *Food Analytical Methods*, 12(7), 1648-1657.
- Wu, L., Yan, H., Li, G., Xu, X., Zhu, L., Chen, X. & Wang, J.** (2019). Surface-Imprinted Gold Nanoparticle-Based Surface-Enhanced Raman Scattering for Sensitive and Specific Detection of Patulin in Food Samples. *Food Analytical Methods*, 12.
- Wu, S., Duan, N., Zhang, W., Zhao, S. & Wang, Z.** (2016). Screening and development of DNA aptamers as capture probes for colorimetric detection of patulin. *Analytical Biochemistry*, 508, 58-64.
- Wu, W., Zhu, Z., Li, B., Liu, Z., Jia, L., Zuo, L., . . . Luo, S.-Z.** (2018). A direct determination of AFBs in vinegar by aptamer-based surface plasmon resonance biosensor. *Toxicon*, 146, 24-30.
- Wu, Z., Xu, E., Jin, Z. & Irudayaraj, J.** (2018). An ultrasensitive aptasensor based on fluorescent resonant energy transfer and exonuclease-assisted target recycling for patulin detection. *Food Chemistry*, 249, 136-142.

- Xu, J., Qiao, X., Wang, Y., Sheng, Q., Yue, T., Zheng, J. & Zhou, M.** (2019a). Electrostatic assembly of gold nanoparticles on black phosphorus nanosheets for electrochemical aptasensing of patulin. *Microchimica Acta*, 186(4), 1-8.
- Xu, J., Qiao, X., Wang, Y., Sheng, Q., Yue, T., Zheng, J. & Zhou, M.** (2019b). Electrostatic assembly of gold nanoparticles on black phosphorus nanosheets for electrochemical aptasensing of patulin. *Microchimica Acta*, 186(4), 238.
- Xu, Y., Cheng, G., He, P. & Fang, Y.** (2009). A Review: Electrochemical Aptasensors with Various Detection Strategies. *Electroanalysis*, 21(11), 1251-1259.
- Yang, Y., Li, Q., Fang, G. & Wang, S.** (2016). Preparation and evaluation of novel surface molecularly imprinted polymers by sol-gel process for online solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography to detect trace patulin in fruit derived products. *RSC Advances*, 6(59), 54510-54517.
- Yli-Mattila, T. & Sundheim, L.** (2022). Fumonisin in African countries. *Toxins*, 14(6), 419.
- Yu, Y. & Fan, Z.** (2017). Determination of patulin in apple juice using magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(2), 273-281.
- Yuan, R., Cai, J., Ma, H., Luo, Y., Wang, L. & Su, S.** (2023). Recent Progress in Electrochemical Aptasensors: Construction and Application. *Chemosensors*, 11(9).
- Zaki, M. H. M., Mohd, Y. & Chin, L. Y.** (2020). Surface Properties of Nanostructured Gold Coatings Electrodeposited at Different Potentials. *International Journal of Electrochemical Science*, 15(11), 11401-11415.
- Zhang, C., Zhang, W., Tang, X., Zhang, Q., Zhang, W. & Li, P.** (2020). Change of Amino Acid Residues in Idiotypic Nanobodies Enhanced the Sensitivity of Competitive Enzyme Immunoassay for Mycotoxin Ochratoxin A in Cereals. *Toxins*, 12(4), 273.
- Zhang, D., Luo, T., Cai, X., Zhao, N.-n. & Zhang, C.-y.** (2024). Recent advances in nucleic acid signal amplification-based aptasensors for sensing mycotoxins. *Chemical Communications*, 60(36), 4745-4764.
- Zhang, M., Wang, Y., Sun, X., Bai, J., Peng, Y., Ning, B., . . . Liu, B.** (2020). Ultrasensitive competitive detection of patulin toxin by using strand displacement amplification and DNA G-quadruplex with aggregation-induced emission. *Analytica chimica acta*, 1106, 161-167.

- Zhang, Q., Yang, Y., Zhang, C., Zheng, Y., Wu, Y. & Wang, X.** (2021). Development of an aptamer-functionalized capillary monolithic column for the highly-selective and highly-efficient recognition of patulin. *Food Control*, 119, 107461.
- Zhang, Q., Yang, Y., Zhang, C., Zheng, Y., Wu, Y. & Wang, X.** (2021). Development of an aptamer-functionalized capillary monolithic column for the highly-selective and highly-efficient recognition of patulin. *Food Control*, 119.
- Zhang, W., Han, Y., Chen, X., Luo, X., Wang, J., Yue, T. & Li, Z.** (2017). Surface molecularly imprinted polymer capped Mn-doped ZnS quantum dots as a phosphorescent nanosensor for detecting patulin in apple juice. *Food Chemistry*, 232, 145-154.
- Zhong, L., Carere, J., Lu, Z., Lu, F. & Zhou, T.** (2018). Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins*, 10(11), 475.
- Zhu, C., Liu, D., Li, Y., Ma, S., Wang, M. & You, T.** (2020). Hairpin DNA assisted dual-ratiometric electrochemical aptasensor with high reliability and anti-interference ability for simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 174, 112654.
- Zhu, Y., Wu, L., Yan, H., Lu, Z., Yin, W. & Han, H.** (2020). Enzyme induced molecularly imprinted polymer on SERS substrate for ultrasensitive detection of patulin. *Analytica chimica acta*, 1101, 111-119.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C. & Mañes, J.** (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 1-18.
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31(13), 3406-3415.