



T.C.
KONYA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE DDT TAYİNİ
İÇİN APTASENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ

Eren YURTDAS

DOKTORA TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Aralık-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Eren YURTDAS tarafından hazırlanan “Süt ve Süt Ürünlerinde DDT Tayini İçin Aptasensörler Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 26/12/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Mahmut KUŞ
(Konya Teknik Üniversitesi)

.....

Danışman

Prof. Dr. Handan KAMIŞ
(Konya Teknik Üniversitesi)

.....

Üye

Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN
(Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi)

.....

Üye

Prof. Dr. Şerife PARLAYICI
(Konya Teknik Üniversitesi)

.....

Üye

Doç. Dr. Ziya AYDIN
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi)

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mevlüt UYAN
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Eren YURTDAS

Tarih:21.01.2026

ÖZET**DOKTORA TEZİ****SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE DDT TAYİNİ İÇİN APTASENSÖRLER
GELİŞTİRİLMESİ****Eren YURTDAS****Konya Teknik Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Handan KAMIŞ
İkinci Danışman: Doç. Dr. Samet ŞAHİN****2025, 202 Sayfa****Jüri****Prof. Dr. Handan KAMIŞ
Prof. Dr. Mahmut KUŞ
Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN
Prof. Dr. Şerife PARLAYICI
Doç. Dr. Ziya AYDIN**

Süt ve süt ürünleri, insan beslenmesinde temel bir yere sahip olan ve yaygın tüketimi nedeniyle gıda güvenliği açısından titizlikle değerlendirilmesi gereken gıda gruplarındandır. Ancak tarımsal üretimde kullanılan pestisitlerin çevrede kalıcılık göstermesi, uzun mesafe taşınabilmesi ve yağlı dokularda birikebilmesi süt ürünlerinde kalıntı riskini artırmaktadır. Bu risk grupları arasında en dikkat çekenlerden biri de organoklorlu pestisitlerdir. Bu bileşikler biyobirikim, biyomagnifikasyon ve toksikolojik etkileri nedeniyle halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Organoklorlu pestisitlerin süt ve süt ürünlerinde güvenilir bir şekilde belirlenmesi hem gıda güvenliğinin sağlanması hem de yasal limitlere uyumun kontrol edilmesi bakımından zorunludur. Geleneksel analiz yöntemleri (GC-MS, HPLC, LC-MS/MS vb.) yüksek doğruluk sunmakla birlikte maliyet, analiz süresi, uzmanlık gereksinimi ve karmaşık örnek hazırlama süreçleri nedeniyle rutin analizlerde sınırlamalar yaratmaktadır. Bu sebeple daha hızlı, seçici, düşük maliyetli ve yerinde ölçüm yapmaya uygun alternatif tespit platformlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda biyosensör teknolojisindeki gelişmeler, özellikle aptasensörlerin yüksek özgüllük, kararlılık, kolay sentez ve modifikasyon avantajlarıyla öne çıkmasını sağlamıştır. Oligonükleotid yapısındaki aptamerler, hedef moleküle özgün üç boyutlu yapı oluşturabilme yeteneği sayesinde antikora güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. Aptasensör tabanlı sensörler, süt gibi karmaşık matrislerde dahi hızlı ve seçici analiz imkânı sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, süt ve süt ürünlerinde bulunan organoklorlu pestisitlerden biri olan DDT kalıntılarının güvenilir, hızlı ve duyarlı bir şekilde belirlenebilmesi amacıyla yeni nesil bir elektrokimyasal aptasensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, literatürde, daha önce sistematik olarak geliştirilen ligandların eksptansiyel zenginleştirilmesi (SELEX) yöntemiyle DDT'ye özgü seçilen tek zincirli DNA aptameri, Au elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Aptasensörün performansı, aptamer inkübasyon süreleri, süt ile bloklama süreleri ve DDT içeren süt örnekleri ile etkileşim süreleri gibi çeşitli parametreler optimize edilerek izlenmiştir. Aptasensörün yanıtı, döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak izlenmiştir. Sonuçlar, en belirgin sensör yanıtının, 2 saatlik aptamer bağlanması ardından 2 saatlik bloklama ve 1 saatlik DDT içeren süt ile etkileşim sonrası elde edildiğini göstermiştir. Aptasensör, Türk Gıda Güvenliği Yönetmeliği'ne göre süt için belirlenen maksimum kalıntı limitinin (40 µg/kg süt) altında DDT tespit etme yeteneği göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Aptamer, Aptasensör, Dikloro difenil trikloroetan, Gıda güvenliği, Pestisit

ABSTRACT**PhD THESIS****DEVELOPMENT of APTASENSORS for the DETERMINATION of DDT in
MILK and DAIRY PRODUCTS****Eren YURTDAS****Konya Technical University
Institute of Graduate Studies
Department of Chemical Engineering****Advisor: Prof. Dr. Handan KAMIŞ
Second Advisor: Assoc. Prof. Dr. Samet ŞAHİN****2025, 202 Pages****Jury****Prof. Dr. Handan KAMIŞ
Prof. Dr. Mahmut KUŞ
Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN
Prof. Dr. Şerife PARLAYICI
Assoc. Prof. Dr. Ziya AYDIN**

Milk and dairy products are fundamental components of human nutrition and, due to their widespread consumption, must be carefully evaluated in terms of food safety. However, the persistence of pesticides used in agricultural production, their ability to be transported over long distances, and their accumulation in fatty tissues increase the risk of residues in dairy products. Among these risk groups, one of the most concerning is organochlorine pesticides. These compounds pose a significant threat to public health due to their bioaccumulation, biomagnification, and toxicological effects. Reliable determination of organochlorine pesticides in milk and dairy products is essential for ensuring food safety and monitoring compliance with legal limits. Although conventional analytical methods (GC-MS, HPLC, LC-MS/MS, etc.) provide high accuracy, they present limitations in routine analyses because of their cost, long analysis time, requirement for specialized personnel, and complex sample preparation steps. Therefore, there is a need for faster, more selective, cost-effective, and on-site applicable alternative detection platforms. Recent advances in biosensor technology have highlighted aptasensors, particularly due to their high specificity, stability, ease of synthesis, and modifiability. Aptamers, which are oligonucleotide-based molecules, can form unique three-dimensional structures specific to target molecules and are considered strong alternatives to antibodies. Aptasensor-based systems offer rapid and selective analytical capabilities even in complex matrices such as milk.

In this thesis study, a novel electrochemical aptasensor was developed for the reliable, rapid, and sensitive determination of DDT residues—one of the organochlorine pesticides found in milk and dairy products. For this purpose, a single-stranded DNA aptamer previously selected specifically for DDT through the Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) method was immobilized onto a gold electrode surface as reported in the literature. The performance of the aptasensor was monitored by optimizing various parameters including aptamer incubation times, blocking durations with milk, and interaction times with DDT-containing milk samples. The aptasensor response was monitored using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The results demonstrated that the most distinct sensor response was obtained after 2 hours of aptamer immobilization, followed by 2 hours of blocking and 1 hour of interaction with DDT-containing milk. The aptasensor was capable of detecting DDT at levels below the maximum residue limit (0.04 mg/kg milk) specified in the Turkish Food Safety Regulation.

Keywords: Aptamer, Aptasensor, Dichlorodiphenyltrichloroethane, Food safety, Pesticide

ÖNSÖZ

Doktora öğreniminin her aşamasında, her türlü imkânı sağlayan, her ulaşmak istediğimde zaman ayıran ve beni yönlendirerek farklı açılardan bakmamı sağlayan, bilgi ve birikimini benden esirgemeyen, doktora sürecimde yanımda olan danışman hocalarım Prof. Dr. Handan KAMIŞ ve Doç. Dr. Samet ŞAHİN'e,

Tezimin başlangıcında ve ilerleyişinde büyük katkıları olan, hocam Sayın Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN'a

Laboratuvar çalışmalarında desteklerini ve zamanlarını hiçbir zaman esirgemeyen, güler yüzlü sevgili laboratuvar çalışma arkadaşlarım Şevval KAYA ve Netice KÜÇÜK'e,

Tüm hayatım boyunca güzel anılar biriktirmemi ve dönüp baktığımda gülümseyerek hatırlayacak anlar yaşamamı sağlayan sevgili dostlarıma,

Maddi manevi desteklerini hep hissettiğim canım aileme,

Gözlerimizden gönüllerimize intikal eden ama kalbimde ve hatıralarımda yaşamaya devam eden Canım Anneme,

Elini hiçbir zaman üstümden çekmeyen, düştüğümde ayağa kaldıran, mutluluğumu, heyecanımı arttıran; hüznümü, sıkıntımı benimle yaşayarak hafifleten hayat arkadaşım Semih YURTDAS'a,

Varlığıyla beni her yeni güne gülümseterek başlatan, en değerlim, canım kızım, boncuğum Özgür YURTDAS'a, ayrı ayrı, tüm içtenliğimle teşekkür ediyorum.

Eren YURTDAS
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Pestisitler.....	5
2.1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması	5
2.1.2. Pestisitlerin kullanım alanları	10
2.1.3. Süt ürünlerinde belirlenmiş olan pestisitler	10
2.1.4. Pestisit analizinde kullanılan yöntemler	11
2.1.5. DDT	13
2.2. Aptamerler	15
2.3. Biyosensörler	17
2.3.1. Biyosensör çeşitleri.....	20
2.3.2. DDT tayinine yönelik yapılan sensör çalışmaları.....	24
2.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)	26
2.4.1. Empedimetrik aptasensörler	27
2.4.2. Aptamer temelli biyosensörler (Aptasensörler).....	30
2.5. Aptamerlerin Seçiminde <i>In Silico</i> Yaklaşımlar	33
2.6. Biyosensörlerin Yüzey Karakterizasyonu	35
2.6.1. AFM.....	36
2.6.2. Temas açısı ölçümü	37
2.6.3. CV ve EIS yöntemleri.....	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	39
3.1.2. Kullanılan cihazlar	40
3.1.3. Kullanılan çözeltiler.....	40
3.2. Sensör Hazırlama	42
3.2.1. Sensörlerin çalışma koşullarının oluşturulması	43
3.2.2. Elektrot yüzeylerinin temizliğinin yapılması.....	45
3.2.3. Elektrotların stabilizasyonu	46
3.2.4. Elektrot yüzeylerinin aptamer ile kaplanması	47
3.2.5. Elektrot yüzeylerinin bloklanması	48
3.2.6. Elektrot yüzeylerinin DDT çözeltisi ile inkübasyonu.....	49
3.2.7. Hazırlanan sensörlerin performans analizleri	51
3.2.8. Girişim etkisinin incelenmesi	59

3.2.9. Ticari süt ve süt ürünü örneklerinde DDT tayini.....	60
3.2.10. Elektrotların raf ömrü testleri	60
3.2.11. Elektrotların tekrarlanabilirlik testleri	61
3.2.12 Elektrotların yüzey karakterizasyonu	61
3.2.13. Hesaplamalı moleküler modellemenin yürütülmesi	62
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	65
4.1. APT-1 Aptameri ile Yapılan Çalışmalar	65
4.1.1. APT-1 aptameri ile hazırlanan elektrotların stabilizasyonu	66
4.1.2. APT-1 aptameri ile hazırlanan elektrotların elektrokimyasal performanslarının değerlendirilmesi.....	67
4.2. APT-2 Aptameri ile Yapılan Çalışmalar	86
4.2.1. APT-2 aptameri ile hazırlanan elektrotların stabilizasyonu	86
4.2.2. APT-2 aptameri ile hazırlanan elektrotların elektrokimyasal performanslarının değerlendirilmesi.....	87
4.3. <i>In Silico</i> Çalışmalar.....	103
4.3.1. APT-3 aptameri ile hazırlanan elektrotların stabilizasyonu	107
4.3.2. APT-3 aptameri ile hazırlanan elektrot performanslarının karşılaştırılması	107
4.4. Girişim Etkisinin İncelenmesi	111
4.5. Ticari Süt ve Süt Ürünü Örneklerinde DDT Varlığı Tespiti	113
4.6. APT-2 ile Hazırlanan Elektrotların Raf Ömürleri Test Sonuçları	113
4.7 Elektrotların Tekrarlanabilirlik Testleri.....	115
4.8. Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu.....	116
4.8.1. AFM ölçüm sonuçları	117
4.8.2. Temas açısı ölçüm sonuçları.....	118
4.9. PCA Analizi ile Kenetleme ve Seçiciliğin Gösterimi.....	119
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	125
5.1 Sonuçlar	125
5.2 Öneriler	129
6. KAYNAKLAR	130
7. EKLER	143
EK-1. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan CV Grafikleri.....	143
EK 2. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan EIS Nyquist Grafikleri.....	158
EK-3. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan CV Grafikleri.....	170
EK 4. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan EIS Nyquist Grafikleri.....	187
EK-5. APT-1, APT-2 ve APT-3 aptamerlerinin kenetleme ve seçicilik özelliklerini değerlendirmek amacıyla oluşturulan PCA matrisi.....	198

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔE_p	: CV grafiğinde anodik ve katodik tepe potansiyelleri arasındaki fark
ΔG	: Gibbs serbest enerjisi
CV	: Döngüsel voltametri
E_p	: CV grafiğinde tepe potansiyeli
E_{pa}	: CV grafiğinde anodik tepe potansiyeli
E_{pc}	: CV grafiğinde katodik tepe potansiyeli
H	: Entalpi
I_p	: Tepe akımı
I_{pa}	: Anodik pik akımı
I_{pc}	: Katodik pik akımı
K_d	: Ayrışma sabiti
pH	: Çözeltideki hidrojen iyonu derişiminin (mol/L) negatif logaritmasıdır.
R^2	: Determinasyon katsayısı
R_{ct}	: Yük transfer direnci
-SH	: Tiyo grupu
V	: Gerilim
Z'	: Gerçek empedans
Z''	: Sanal empedans

Kısaltmalar

A	: Adenin bazı
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
Au NP	: Altın nanoparçacık
Au	: Altın
AuE	: Altın çalışma elektrodu
C	: Sitozin bazı
CB	: Karbamat
DDD	: Dikloro difenil dikloro etan
DDE	: Dikloro difenil dikloro etilen
DDT	: Dikloro difenil trikloroetan
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EIS	: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
FF	: Ferri-ferro ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$) redoks probu
G	: Guanin bazı
GC	: Gaz kromatografisi
LC	: Sıvı kromatografisi
LOD	: Tespit sınırı
LOL	: Kalibrasyon bölgesinin üst sınırı
LOQ	: Kantitatif ölçüm sınırı
MS	: Kütle spektroskopisi
NP	: Nanoparçacık
OCP	: Organoklorlu pestisit
OPP	: Organofosforlu pestisit
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi

PCA	: Temel Bileşenler Analizi
PCB	: Poli klorinlenmiş bifenil
Pearson's r	: Korelasyon katsayısı
QuEChERS	: Hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli
RNA	: Ribo nükleik asit
SELEX	: Sistematik olarak geliştirilen ligandların eksotansiyel zenginleştirilmesi
SPR	: Yüzey plazmon rezonans
T	: Timin bazı
UPW	: Ultra saf su
UV	: Ultraviyole



1. GİRİŞ

Dünya nüfusundaki hızlı artış, gıda güvenliği ve sürdürülebilir beslenme konularını küresel ölçekte kritik bir sorun hâline getirmiştir. Günümüzde tarıma elverişli alanların sınırlı olması ve mevcut tarım arazilerinin sanayileşme, erozyon ve kontrolsüz kentleşme gibi etkenlerle giderek azalmasına karşın nüfusun hızla artması, birim alandan daha yüksek verim elde edilmesi gerekliliğini kaçınılmaz kılmaktadır. Küreselleşme, kentleşme, aşırı nüfus artışı, küresel ısınma ve iklim değişikliği ile başa çıkabilmek için var olan kaynakları koruyacak sistemler geliştirilmelidir. Bu bağlamda tarımda bitkileri zararlılardan korumak için kullanılan kimyasal veya biyolojik maddeler olan pestisitler modern tarımın vazgeçilmez bileşenlerinden biri hâline gelmiştir; ancak yanlış, bilinçsiz veya aşırı pestisit kullanımı hem çevre hem de insan sağlığı açısından ciddi riskler oluşturmaktadır (Karakaya ve Boyraz, 1992, Boudebbouz ve diğ., 2022).

Pestisitlerin tarımsal üretimde verimi artırdığı bilinse de tavsiye edilen dozların üzerinde kullanılması, hasat öncesi bekleme sürelerine uyulmaması veya farklı kimyasalların gereksiz şekilde karıştırılması gıda ürünlerinde kabul edilebilir seviyelerin üzerinde kalıntı bırakabilmektedir. Ayrıca dünya genelinde kullanımı yasaklanan veya sınırlandırılan bazı pestisit türlerinin hâlâ yasa dışı olarak kullanılmaya devam etmesi de önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bileşikler toprakta uzun süre bozunmadan kalabilmekte ve dolayısıyla tarım ürünleri üzerinden gıda zincirine taşınarak insanlarda akut ya da kronik toksisiteye, endokrin bozukluklara, nörolojik rahatsızlıklara ve kansere kadar uzanan sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Nag ve Raikwar, 2008). Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarına göre, her yıl dünya genelinde yaklaşık 155.488 ölüm ve 7.362.493 engellilik vakasının pestisit maruziyeti ile ilişkilendirilmektedir (Anonim, 2019). Bu veriler, pestisit kalıntılarının izlenmesi ve kontrolü konusunda etkin analitik yöntemlerin gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır (Kesimci, 2021).

Süt ve süt ürünleri, Türkiye'de ve dünya genelinde günlük beslenmede önemli bir paya sahiptir. TÜİK 2024 raporlarına göre Türkiye'de üretilen içme sütü yıllık 1,418,317 ton, tüm süt ve süt ürünlerinin toplamı ise 24,122,508 ton olarak bildirilmiştir (Anonim, 2025a). Süt, üretim aşamasında eklenen katkı maddelerinin yanı sıra hayvanların beslendiği yem ve çevresel maruziyetten kaynaklanan kimyasal bileşenleri de içerebilmektedir. Pestisit içeriği yüksek yemlerle beslenen ya da kirli toprak ve su kaynaklarına sahip bölgelerde yetiştirilen bitkileri tüketen hayvanlar, bu bileşiklere maruz

kalmakta ve maruz kaldıkları pestisitler kan dolaşımı aracılığıyla süte geçebilmektedir. Böylece süt ve süt ürünleri aracılığıyla pestisitler doğrudan insan tüketimine ulaşabilmektedir.

Türkiye’de tarımsal pestisit kullanımı 2006–2024 yılları arasında genel olarak artış eğilimi göstermiştir. Toplam pestisit kullanımı 2006 yılında yaklaşık 45 bin ton iken, 2018 yılında 60 bin ton ile en yüksek seviyesine ulaşmış, 2024 yılında ise 53,5 bin ton olarak gerçekleşmiştir. İncelenen dönemde fungusitler, toplam kullanım içinde en büyük paya sahip pestisit grubu olup, bunu herbisitler ve insektisitler takip etmiştir. Özellikle herbisit ve insektisit kullanımındaki artış, yoğun tarımsal üretim ve zararlı kontrolüne yönelik uygulamaların yaygınlaştığını göstermektedir. Rodentisit ve mollusisit kullanımı ise diğer pestisit gruplarına kıyasla oldukça düşük seviyelerde seyretmiştir. (Anonim, 2025b). Türkiye’de ve farklı ülkelerde yapılan çalışmalar, sütlerde özellikle organoklorlu pestisit (OCP) kalıntılarının yaygın biçimde tespit edildiğini göstermektedir (Bulut ve Akkaya, 2011; Gutierrez ve diğ., 2012; Rego ve diğ., 2019). Bu grupta yer alan pestisitler arasında en çok rastlanan bileşikler dikloro difenil trikloroetan (DDT) ve onun bozunma ürünleri olan dikloro difenil dikloro etilen (DDE) ve dikloro difenil dikloro etan (DDD)’dir. Ayrıca aldrin, dieldrin ve poliklorlu bifeniller gibi diğer OCP türlerinin varlığı da sıkça rapor edilmiştir (John ve diğ., 2001; Darko ve Acquah, 2008). Bu bileşiklerin lipofilik yapıları, yağlı gıdalarda ve özellikle sütte biyoakümülyasyon riskini artırmakta, bu durum maruziyeti daha da kritik hâle getirmektedir.

OCP’lerin analitik olarak belirlenmesi amacıyla uzun yıllardır çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1940’lı yıllardan itibaren başlangıçta daha karmaşık ve zaman alıcı ekstraksiyon işlemleri ile yapılan analizler, 2003 yılında literatürde yer alan QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) yöntemi ile önemli ölçüde hızlanmış ve sadeleşmiştir (Acar, 2015). QuEChERS, hızlı, kolay, ucuz, etkili, sağlam ve güvenli bir yöntem olarak pestisit ekstraksiyonunda yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (AOAC, 2000). Ancak bu yöntem yalnızca örnek hazırlama aşamasını kolaylaştırmakta; örneklerin analizinde hâlen GC-MS/MS (gaz kromatografisi-ikili kütle spektrometrisi) veya LC-MS/MS (sıvı kromatografisi-ikili kütle spektrometrisi) gibi yüksek teknolojiye cihazlara ve deneyimli personele ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar hem maliyetli hem de saha uygulamaları için uygun olmayan yöntemlerdir. Bu nedenle taşınabilir, hızlı, düşük maliyetli ve yüksek duyarlılığa sahip alternatif sensör teknolojilerine olan ihtiyaç giderek artmaktadır.

Son yıllarda biyosensör teknolojilerindeki ilerlemeler, özellikle aptamer tabanlı sensörlerin (aptasensörlerin) pestisit tespitinde umut vadeden bir alternatif olarak ortaya çıkmasını sağlamıştır. Aptamerler, nükleik asitlerden oluşan ve hedef moleküllere yüksek özgüllükle bağlanabilen sentetik biyomoleküllerdir. Antikorlara kıyasla kimyasal kararlılıkları daha yüksek, üretimleri daha ucuz, modifikasyonları daha kolay ve raf ömürleri daha uzundur (McKeague ve DeRosa, 2011). Elektrokimyasal aptasensörler ise hızlı yanıt süreleri, düşük dedeksiyon limitleri ve kompakt cihaz entegrasyonuna uygun yapıları sayesinde gıda güvenliği alanında son derece cazip bir seçenek olarak değerlendirilmektedir (Hianik ve Wang, 2009; Wang ve diğ., 2015). Literatürde organofosforlu pestisitlerin (OPP) aptamer temelli tespiti üzerine geniş bir çalışma birikimi bulunmasına rağmen, OCP'lerin aptamer aracılığıyla tespit edildiği çalışmalar oldukça sınırlıdır (Cheng ve diğ., 2018; Wu ve diğ., 2016; Yan ve diğ., 2015). Bu durum, OCP tayini için yeni aptamer dizilerinin ve sensör mimarilerinin geliştirilmesine duyulan ihtiyacı artırmaktadır.

Bu tez çalışmasında, OCP grubuna ait önemli bir bileşik olan DDT'nin tespiti için yüksek duyarlılığa sahip bir elektrokimyasal aptasensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde daha önce DDT için seçilmiş ve bağlanma özellikleri deneysel olarak karakterize edilmiş olan aptamer dizileri temel alınmış hem primer bölgelerini içeren hem de primer bölgeleri çıkarılmış iki farklı aptamer dizisi kullanılarak empedimetrik aptasensörler hazırlanmıştır. Böylece primer dizilim bölgelerinin aptamerin katlanma davranışı, hedef bağlanma etkinliği ve dolayısıyla sensör performansı üzerindeki etkisinin deneysel olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmanın bir diğer önemli bileşenini ise bilgisayar destekli (*in silico*) modelleme çalışmaları oluşturmaktadır. Literatürde bildirilen aptamer dizileri, üç boyutlu (3B) yapıları açısından yeniden modellenmiş, stabil ikincil yapı tahminleri yapılmış ve aptamer-hedef etkileşim mekanizmaları, moleküler kenetleme ve bağlanma enerjisi analizleri ile detaylandırılmıştır. Bu analizler, aptamer dizilerinin bağlanma bölgeleri, yapısal kararlılığı ve hedef moleküle uyumluluğu hakkında derinlemesine bilgi sağlamıştır. Literatürde DDT'ye bağlandığı bildirilen aptamerler arasından, çalışmanın ilk aşamasında aptasensör üretiminde kullanılan aptamerle yapısal açıdan benzerlik ve farklılıklar gösterdiği ve bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu değerlendirilen aptamer seçilmiştir. Seçilen bu aptamer laboratuvar ortamında elektrokimyasal tekniklerle test edilmiş ve deneysel sonuçlar *in silico* çalışmaları olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma hem primerli ve primersiz aptamer dizilerinin karşılaştırılması açısından literatürde eksikliği hissedilen bir boşluğu doldurmakta, hem de DDT gibi kalıcı organik kirleticilerin tespitine yönelik yeni bir aptasensör yaklaşımı geliştirerek çevresel analiz ve gıda güvenliği alanlarına önemli katkılar sunmaktadır. Geliştirilen APT-1 ve APT-2 olarak isimlendirilen aptamerlerden üretilen aptasensörde 1 saatlik bir sürede, DDT'nin bulunmasına izin verilen maksimum yasal sınırı da içerisine alan geniş bir DDT konsantrasyonu aralığında, süt ve süt ürünü içerisindeki DDT'nin kantitatif tayini yapılabilmektedir. Her iki aptamerin K_d değerlerinin birbirine çok yakın ve ve düşük değerlerde çıkması primerli ve primersiz biyoreseptörlerin hedef moleküle olan ilgisinin benzer seviyede korunduğunu ortaya koymaktadır

Aptamerin primersiz formu olan APT-2 modifikasyonunun hem daha yüksek korelasyon katsayısı hem de daha düşük LOD değeri sayesinde süt örneklerinde DDT tayini için APT-1 sistemine göre çok daha üstün ve güvenilir analitik parametreler sunduğu sonucuna varılmaktadır.

Aptamer tabanlı bu sensör tasarımının hızlı, hassas, seçici ve düşük maliyetli bir alternatif olarak gelecekte pestisit izleme uygulamalarına entegre edilebilecek potansiyele sahip olduğu değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Pestisitler

Pestisitler, zararlı organizmaları önlemek, ortadan kaldırmak, uzaklaştırmak veya etkilerini azaltmak amacıyla kullanılan, bitki gelişim düzenleyicisi, yaprak dökücü ya da kurutucu işlevi görebilen kimyasal maddeler veya madde karışımlarıdır. Tarımsal ürünlerin zararlılar tarafından tahrip edilmesini veya yok edilmesini engellemek amacıyla dünya genelinde 1000'den fazla pestisit çeşidi yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonim, 2022a).

Pestisitler doğaları gereği toksik bileşiklerdir ve çevreye kasıtlı olarak uygulandıkları için üretimlerinden kullanımına kadar tüm süreçlerin sıkı yasal düzenlemelere ve kontrollere tabi tutulması gereklidir. Bununla birlikte, pestisitlerin önemli bir kısmı kimyasal kararlılıkları ve çevresel kalıcılıkları nedeniyle uygulandıkları ortamda tamamen parçalanamamakta, gıda ürünleri ve çevresel matrislerde kalıntı (rezidü) bırakabilmektedir. Bu nedenle, gıdalarda ve çevresel ortamlarda oluşabilecek pestisit kalıntılarının düzenli olarak izlenmesi büyük önem taşımaktadır. Pestisitlere yüksek düzeyde maruz kalınması; akut zehirlenmelerin yanı sıra, kanserojen etki ve üreme sistemi üzerine olan olumsuz etkiler gibi çeşitli uzun vadeli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Aktar ve diğ., 2009).

Dikloro difenil trikloroetan (DDT) ve lindan gibi eski nesil, patent koruma süresi sonlanmış ve görece düşük maliyetli pestisitlerin büyük bir kısmı, çevresel koşullara son derece dirençli olup toprak ve su ortamlarında yıllarca kalıcılığını sürdürebilmektedir. Bu kalıcı kimyasallar, çevre ve insan sağlığına yönelik oluşturdukları riskler nedeniyle, 2001 yılında imzalanan ve kalıcı organik kirleticilerin üretim ve kullanımını yasaklamayı veya ciddi şekilde kısıtlamayı hedefleyen Stockholm Sözleşmesi kapsamında, sözleşmeye taraf ülkeler tarafından yasaklanmıştır (Anonim, 2022a).

2.1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitler; kimyasal bileşimleri, fiziksel özellikleri, formülasyon biçimleri, hedef zararlılar üzerindeki etkileri, içerdiği aktif madde miktarı, toksisite düzeyleri ve uygulama yöntemlerine göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmaktadır (Manap ve diğ., 2023). Bu sınıflandırmalar, pestisitlerin çok yönlü özellikleri göz önünde bulundurularak

yapılmakta olup, oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Özellikle kimyasal temelli ya da etken madde gruplarına göre yapılan sınıflandırmalar, pestisitlerin çeşitliliği nedeniyle detaylı ve kapsamlı bir yaklaşım gerektirmektedir (Kaur ve diğ., 2019).

Genel olarak modern pestisitler, organik yapılı bileşiklerden oluşmakta olup hem sentetik kökenli hem de bitkisel kaynaklı maddeleri içermektedir. Bununla birlikte, bazı inorganik bileşikler de pestisit olarak kullanılabilir. Pestisit sınıflandırmaları zaman içerisinde güncellenmekle birlikte, günümüzde kimyasal yapılarına göre pestisitleri altı ana grupta toplamak mümkündür. Bu gruplar; OCP, OPP, karbamatlar (CB'ler), neonikotinoidler, triazinler ve diğer bazı özel gruplarda yer alan pestisitlerdir (Manap ve diğ., 2023).

2.1.1.1. OCP'ler

OCP'ler; yapılarında genellikle beş veya daha fazla klor atomu içeren organik bileşiklerdir. Tarımda ve halk sağlığında yaygın olarak kullanılan ilk sentetik organik pestisit grubu olarak bilinmektedirler. Bu bileşikler beyaz renkli, kristal yapıda, yarı uçucu özellikte olup organik çözücülerde ve yağ ortamlarında çözünürler. Özellikle çevresel ortamlarda ve tarımsal ürünlerde birikme eğilimleri yüksektir (Barragan-Huerta ve diğ., 2007). Enzimatik yollarla hızla parçalanamazlar, kolaylıkla uzaklaştırılmazlar ve lipofilik özelliklerinden dolayı canlıların yağ dokularında birikme eğilimi gösterirler. OCP'ler, sodyum kanallarının ve merkezi sinir sisteminin en önemli inhibitörü olan gamma-amino bütirik asit reseptörlerinin fonksiyonunu bozarak sinir iletimini kesintisiz hâle getiren, lipofilik yapıları nedeniyle biyobirikim ve biyomagnifikasyona uğrayan kalıcı organik kirleticilerdir (Melis ve diğ., 2025).

Bu grubun en bilinen üyesi olan DDT, ilk olarak 1873 yılında Alman kimyager Othmar Zeidler tarafından sentezlenmiş; insektisit özelliği ise 1939 yılında İsviçreli kimyager Paul Hermann Müller tarafından keşfedilmiştir (Müller, 1948). DDT, keşfedildiği ilk yıllarda geniş etki spektrumu, yüksek biyolojik aktivitesi, çevresel kalıcılığı, suda çözünmezliği, düşük maliyeti ve uygulama kolaylığı nedeniyle adeta bir "mucize pestisit" olarak değerlendirilmiştir (Zacharia, 2011). Ancak daha sonra çevre ve insan sağlığı üzerindeki kalıcı olumsuz etkileri nedeniyle yoğun tartışmalara konu olmuştur.

Çevresel ve toksikolojik etkileri dikkate alınarak, başta DDT, dieldrin, heptaklor, mireks, klordekon ve klordan olmak üzere birçok OCP kullanımı, Amerika Birleşik

Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından yasaklanmış veya ciddi şekilde kısıtlanmıştır (Waxman, 1998).

2.1.1.2. OPP'ler

OPP'ler, karbon, hidrojen ve klor elementlerinden oluşan, yabancı otlar, böcekler, bakteriyel ve fungal patojenlerin kontrol altına alınması amacıyla yaygın olarak kullanılan geniş bir kimyasal pestisit grubudur (Jayaraj ve diğ., 2017). Bu gruba dahil olan malation, paration, diazinon, forat, terbufos, fentiyon ve klorpirifos gibi insektisitler; temas, sindirim ya da inhalasyon (solunum) yoluyla etki göstererek hedef organizmalar üzerinde toksik etkiler oluşturmaktadır. OPP'ler, asetilkolinesteraz enziminin (AChE) aktif bölgesindeki serin hidroksil grubuna kovalent olarak bağlanarak enzimi inhibe eder. Normal koşullarda AChE, sinaptik aralıkta biriken asetilkolini hızla hidroliz ederek sinir iletiminin sonlanmasını sağlar (Eddleston ve diğ., 2008).

Organofosfor bileşikleri yalnızca tarımsal mücadele kapsamında değil, aynı zamanda sarin, soman ve tabun gibi maddeler aracılığıyla kimyasal savaş sinir ajanları olarak da kullanılmışlardır. Tarımsal üretkenliği artırma potansiyeli nedeniyle bu pestisit grubunun kullanımı özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren önemli ölçüde artış göstermiştir. Bununla birlikte, OPP'lerin geniş çaplı ve kontrolsüz kullanımı, başta toprak ve su kaynakları olmak üzere çevresel kirlilik oluşturmuş; insan sağlığı ve sucul ekosistemler üzerinde ciddi tehditler yaratmıştır (Bilal ve diğ., 2019).

2.1.1.3. CB'ler

CB'ler, karbamik asidin esterlerinden türetilmiş insektisitler olup, OCP ve OPP pestisitlere kıyasla daha küçük bir kimyasal grubu temsil ederler. Bu gruba örnek olarak aldikarb, karbaril, karbofuran, oksamil ve pirimikarb gibi bileşikler verilebilir. Özellikle karbaril, tarımda kullanılan ilk karbamat bazlı insektisit olarak bilinmekte ve geniş bir zararlı spektrumuna karşı etkinlik göstermektedir. Diğer birçok pestisite kıyasla insanlara olan akut toksisitesi nispeten daha düşüktür (Hayatsu ve diğ., 2001). Karbamatlar, organofosfat bileşiklerle benzer şekilde AChE'ni inhibe ederek etki gösterirler; bu da sinir iletiminde bozulmalara yol açarak hedef organizmaların ölümünü sağlar. Ancak, bu bileşikler yalnızca hedef zararlılar için değil, yem yoluyla evcil ve yabanî hayvanlara bulaşarak insan sağlığını da tehdit edebilmektedir. Özellikle bazı karbamat türevlerinin

toksik etkileri, çevresel yayılım ve biyobirikim potansiyeli nedeniyle çeşitli ülkelerde yasaklanmasına yol açmıştır.

Nitekim, aldikarb ve karbofuran, pek çok ülkede yasaklanmış pestisitler arasında yer almakla birlikte, bu maddeler hâlen hayvan zehirlenmeleriyle ilişkili vakaların önemli bir bölümünde tespit edilmektedir (Gallocchio ve diğ., 2021). Bu durum, karbamat pestisitlerin çevresel etkilerinin ve kalıcılığının hâlâ önemli bir sorun olarak varlığını sürdürdüğünü göstermektedir.

2.1.1.4. Neonikotinoidler

İmidakloprid, tiyametoksam, klotianidin gibi neonikotinoid pestisitler, 1990'lı yıllardan itibaren bitki koruma ve veterinerlik uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Geniş etki spektrumları ve bitkinin kök, yaprak ve gövde dokuları tarafından emilebilme özellikleri nedeniyle tarımsal üretimde önemli avantajlar sağlarken, aynı zamanda hedef dışı organizmalar üzerinde potansiyel olumsuz etkiler doğurabileceğine dair ciddi endişeler gündeme gelmiştir. Özellikle yararlı böcekler (örneğin arılar) ve böcekçil kuşlar gibi türler üzerindeki toksik etkileri, bu pestisit grubunun çevresel güvenliği açısından tartışmalara neden olmuştur. Bu nedenle Avrupa Birliği'nde bazı neonikotinoidlerin kullanımı sınırlandırılmıştır (Matsuda ve diğ., 2020). Neonikotinoidlerin etkili olmasındaki temel etken, böcek sinir sistemi nikotinik asetilkolin reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanmalarıdır. Buna karşılık, memeliler ve insanlar da dahil olmak üzere omurgalı canlılardaki reseptörlere olan bağlanma eğilimleri oldukça düşüktür. Bu özellikleri sayesinde neonikotinoidler, böceklere karşı yüksek selektivite gösterirken, omurgalılarda görece daha düşük toksisite profili sergilemektedir.

Bununla birlikte, bu bileşiklerin çevrede birikimi, yoğun ve kontrolsüz kullanımı ile birleştiğinde maruziyet ve toksisite risklerini artırabilmektedir. Ayrıca bazı neonikotinoid metabolitlerinin kendilerinden daha toksik olabileceği gösterilmiştir (Manavi ve diğ., 2024). Bu durum, neonikotinoidlerin yalnızca aktif formları değil, çevresel bozunma ürünlerinin de dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

2.1.1.5. Triazin pestisitler

Atrazin, simazin gibi triazin grubu pestisitler, fotosentezde yer alan elektron taşıma zincirini seçici biçimde inhibe etme yeteneğine sahip herbisitlerdir. Bu özgül etki mekanizması, hedef alınmayan fotosentetik organizmalar açısından çevresel bir risk faktörü oluşturmaktadır. Her ne kadar OCP, OPP ve CB bileşikleri, yaygın kullanılan pestisitlerin büyük çoğunluğunu oluştursa da triazin türevlerinin de tarımda kullanımı oldukça yaygındır (Gonçalves ve diğ., 2017). Triazin bileşikleri çevresel açıdan dikkat çeken pestisitler arasında yer alır. Bu bileşikler, toprakta uzun yarı ömürlere sahip olup, aylarca kalıcılığını sürdürebilirler. Uygulama alanlarından yer altı ve yüzey sularına taşınma riski, bu pestisitlerin ekosistemler üzerindeki potansiyel etkilerini artırmaktadır. Nitekim, triazinlerin yalnızca hedeflenen yabancı otları değil, aynı zamanda yeşil algler, diatomlar ve siyanobakteriler gibi fotosentetik mikroorganizmaları da etkileyebildiği bildirilmiştir (Manap ve diğ., 2023).

2.1.1.6. Diamid pestisitler

Diamid grubu insektisitler, belirli hedef bölge aktivitesine sahip olmaları, geniş spektrumlu zararlılara karşı yüksek etkililik göstermeleri ve uygun toksikolojik profilleri sayesinde, günümüzde geliştirilen en yeni ve yenilikçi insektisit sınıflarından biri olarak öne çıkmaktadır. Bu gruptaki bileşikler, özellikle tarımsal üretimde böcek yönetiminde etkili ve seçici çözümler sunmaktadır (Teixeira ve Andaloro, 2013). Hâlihazırda piyasada bulunan başlıca diamid insektisitler arasında klorantraniliprol ve flubendiamid yer almakta olup, siyantraniliprol gibi yeni bileşikler de bazı ülkelerde kullanım onayı alarak piyasaya sürülmeye başlanmıştır. Bu insektisitler, kas kasılmalarını düzenleyen ryanodin reseptörlerine bağlanarak hedef böceklerde felce ve ölüme neden olur.

Diamid bileşiklerinin dikkat çeken bir diğer özelliği ise, ekotoksikolojik açıdan görece güvenli olmalarıdır. Bu bileşiklerin, faydalı böcekler ve doğal düşmanlar üzerindeki olumsuz etkilerinin sınırlı olduğu bildirilmiştir (Brugger ve diğ., 2013). Bu yönüyle diamid insektisitler, entegre zararlı yönetimi stratejilerinde kullanılmaya elverişli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir.

2.1.2. Pestisitlerin kullanım alanları

Pestisit kullanımı, haşere baskılarındaki değişimler, yasal düzenlemeler, yeni bileşiklerin geliştirilmesi ile sağlık ve çevresel kaygılara yanıt olarak sürekli bir evrim içindedir. 1900'lü yılların başlarında, tarımda yaygın olarak kullanılan arsenikli insektisitler (birinci nesil pestisitler), 1960 ve 1970'li yıllarda yerini DDT ve diğer organoklorlu bileşiklere (ikinci nesil pestisitler) bırakmıştır. Bu dönemde sentetik organik pestisitler, yüksek etkinlik ve geniş spektrumları sayesinde pazarda ön plana çıkmıştır.

Aldrin, dieldrin, klordan, heptaklor, lindan, endrin, toksafen ve DDT gibi organoklorlu insektisitler, kullanıldıkları dönemde oldukça düşük dozlarla bile etkili olmuş, ancak çevresel kalıcılıkları ve biyobirikim potansiyelleri nedeniyle zamanla kullanım dışı bırakılmıştır. 1990'lı yıllarda, bu bileşiklerin yerini, fosfor içeren OPP insektisitler almıştır. OPP'ler, tarım alanlarının yanı sıra evlerde, bahçelerde ve veterinerlik uygulamalarında da geniş kullanım alanı bulmuştur.

2000'li yıllarla birlikte, organofosfatların aşamalı olarak kullanımdan kaldırılması, neonikotinoidler, sentetik piretroidler, fenilpirazoller ve daha yakın dönemde diamid grubu gibi yeni nesil pestisitlerin geliştirilmesine öncülük etmişti (Sandstroma ve diğ., 2022). Bu gelişmeler hem etkinlik hem de insan ve çevre sağlığı açısından daha güvenli bileşiklerin kullanımını teşvik etmiştir.

Pestisitlerin kullanım alanları oldukça geniştir. Tarım uygulamaları başta olmak üzere; bahçecilik, su ürünleri yetiştiriciliği, ormancılık, peyzaj düzenlemeleri (park, bahçe ve oyun alanları), sanayi alanlarında haşere kontrolü, ev içi ve çevresel zararlı mücadeleleri, denizcilikte böcek kontrolü, hayvancılıkta hayvan sağlığının korunması ve toplum sağlığının/hijyeninin sağlanması gibi çok çeşitli amaçlarla pestisitlerden yararlanılmaktadır (Anonim, 2024).

2.1.3. Süt ürünlerinde belirlenmiş olan pestisitler

Literatürde, farklı ülkelerde süt ve süt ürünlerinde bulunan pestisit kalıntılarının belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda OCP, OPP ve piretroid grubu pestisitlerin varlığına sıklıkla rastlanmıştır. Türkiye, Hindistan, Meksika, Çin, Brezilya, Mısır ve Etiyopya gibi ülkelere toplanan süt ve süt ürünleri örneklerinde, özellikle OCP kalıntılarının yaygın olarak tespit edildiği raporlanmıştır. Analiz edilen ürünlerde, çoğunlukla kullanımı yasaklanmış olan OCP'lere rastlanması

dikkat çekicidir (Bulut ve Akkaya, 2011; Gutierrez ve diğ., 2012; Rego ve diğ., 2019; John ve diğ., 2001; Nag ve Raigwar, 2008; Darko ve Acquah, 2008).

Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'ne göre, süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen OCP'lerin maksimum kalıntı limitleri Çizelge 2.1.'de belirlenmiştir (Anonim, 2022b):

Çizelge.2.1. Süt ürünlerinde bulunmasına izin verilen OCP'lerin maksimum kalıntı limitleri (Anonim, 2022b)

Pestisit Grubu	Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri (µg/kg süt)
Heptaklor ve heptaklor epoksit toplamı (heptaklor cinsinden)	4
Endosülfan (α ve β) ile endosülfat toplamı (endosülfan cinsinden)	5
Aldrin ve dieldrin kombinasyonu (dieldrin cinsinden)	6
DDT, DDE ve DDD toplamı (DDT cinsinden)	40

Yapılan çalışmalarda tespit edilen pestisit kalıntı düzeyleri, ilgili ülke mevzuatlarında yer alan yasal sınır değerlerle karşılaştırıldığında, bazı ülkelerde bu sınırların aşıldığı belirlenmiştir (Bulut ve Akkaya, 2011, Ayoub ve diğ., 2012, Dervişoğlu ve diğ., 2013, Deti ve diğ., 2014, Kaushik ve diğ., 2014, Shaker ve Elsharkawy, 2015, Bu durum, hem tüketici sağlığı açısından potansiyel risklere işaret etmekte hem de pestisit denetim ve kontrol mekanizmalarının güçlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

2.1.4. Pestisit analizinde kullanılan yöntemler

Pestisitlerin analiz yöntemleri zaman içerisinde gelişmiş, değişmiş ve daha uygulanabilir hâle gelmiştir. 1940'lı yıllarda pestisit analizlerinde kolorimetrik yöntemler kullanılmış, bu dönemde yüzlerce farklı aktif madde farklı matrislerde eş zamanlı olarak analiz edilmeye çalışılmıştır. İlk analizler, sebzelerde DDT üzerine yoğunlaşmış olup diğer pestisitlerin analizinde istenilen başarı sağlanamamıştır. 1950'li yılların başında ise ince tabaka kromatografisi teknikleri kalıntı analizlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Takip eden yıllarda, GC ve çeşitli seçici detektörlerin geliştirilmesi ile bu yöntem yaygınlaşmıştır. 1960'ların sonlarına doğru yüksek ayırma gücüne sahip kolonların geliştirilmesi ile GC tekniği hem performans avantajları hem de maliyet etkinliği sebebiyle pestisit analizlerinde en yaygın tercih haline gelmiş ve pestisitlerin %60'ından fazlası bu yöntemle tespit edilebilir olmuştur (Hogendoorn ve Zoonen, 2000).

1980’li yıllarda pestisit çeşitlerinin artması, GC ile analiz edilmeye uygun yapıda olmayan; polar, uçuculuğu düşük ve/veya ısıya karşı duyarlı pestisitlerin analizlerinde yaşanan problemler ve kullanım şekillerinin farklılaşması sonucunda, daha düşük dozlarda kullanılan pestisitlerin analizlerinde GC tekniği yetersiz kalmaya başlamış, bu aşamada GC/MS teknolojisi önemli bir alternatif olarak benimsenmiştir (Acar, 2015). Sıvı kromatografisi (LC) ile pestisitlerin analiz edilmesi, UV ve floresans dedektörlerin kullanımı ile mümkün olmuş ve LC teknikleri tamamlayıcı bir yöntem olarak yerini almıştır. MS teknolojisinin gelişmesi ile ayırım, tanımlama ve kantitatif analizlerde önemli ilerlemeler sağlanmış, GC/MS ve LC/MS sistemleri ile pestisitler 10 ppb seviyelerine kadar tespit edilebilir hale gelmiştir (Alder ve diğ., 2005). 2000’li yıllarda ise ikili kütle spektrometrisi (MS/MS) sistemleri ile seçicilik ve hassasiyet artırılmış, LC/MS/MS teknikleri ile tespit sınırları 1 ppb’ye kadar düşürülmüştür (Alder ve diğ., 2005).

2003 yılından itibaren QuEChERS adı verilen hızlı, kolay, ekonomik ve güvenli ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş, bu yöntemle solvent ve malzeme tüketimi azaltılmış, analiz süresi %90 oranında kısaltılmıştır. QuEChERS yöntemi ile hazırlanan örnekler, günümüzde GC/MS/MS ve LC/MS/MS sistemleri ile yüksek hassasiyetle analiz edilmektedir. Bu çerçevede, Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi tarafından pestisit analizleri QuEChERS ekstraksiyonu sonrası GC/MS(/MS) ve LC/MS(/MS) sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Acar, 2015).

Bunun yanı sıra, belirli pestisitlerin veya pestisit gruplarının özellikle organoklorlu ve organofosforlu bileşiklerin tayinine yönelik pek çok akademik çalışma da mevcuttur. Örneğin, Raman spektroskopisi kullanılarak aldrin, endosülfan, lindan ve dieldrin gibi pestisitlerin tayini yapılmıştır (Kubackova ve diğ., 2015). Ayrıca, kâğıt şerit sensörleri ile aldrin, dieldrin, endosülfan ve DDT’nin belirlenmesi (Dasriya ve diğ., 2021) ve amperometrik immunosensör teknikleriyle atrazin tespiti gerçekleştirilmiştir (Campanellaa ve diğ., 2011).

He ve Aga, yüzey sularında hormonlar ve pestisitlerin analizi için GC-MS/MS ve LC-MS/MS teknikleri karşılaştırılmış, her iki yöntemin avantajları ve sınırlamaları değerlendirilmiştir. Özellikle DDT ve diğer OCP’ler gibi hidrofobik, yarı uçucu ve termal olarak kararlı bileşiklerin analizinde GC-MS/MS’nin yüksek seçicilik ve 8,9 - 66,1 ng/g gibi düşük tespit limitleri sunduğu gösterilmiştir. DDT gibi apolar bileşiklerde iyonlaşma veriminin düşük olması ve matris etkilerinin belirginleşmesi nedeniyle sınırlamalar gösterdiği ve tespit limiti (LOD) değerinin 0,018ng/mL olduğu belirtilmiştir. Çalışma

sonuçları, DDT ve benzeri OCP'lerin analizinde GC-MS/MS'nin daha uygun bir teknik olduğunu, kapsamlı çevresel izleme çalışmalarında ise iki yöntemin tamamlayıcı olarak kullanılmasının daha doğru sonuçlar sağlayacağını ortaya koymuştur (He ve Aga, 2019).

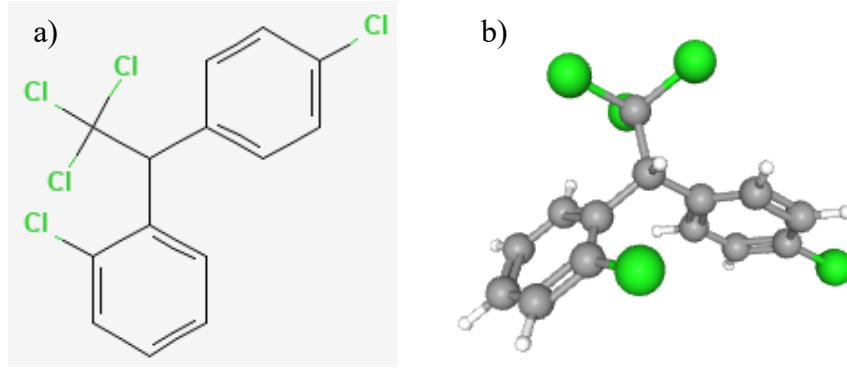
DDT tayinine yönelik başka bir çalışmada, DDT ve ana metabolitlerinin (özellikle DDE ve DDD) analizi için araştırmacılar, bis(trifluorometilsülfonil)imid bazlı donmuş iyonik sıvıyı, içi boş fiber katı faz mikroekstraksiyonu tekniğinde ekstraksiyon fazı olarak kullanmıştır. DDT ve metabolitlerinin hidrofobik yapıları sayesinde iyonik sıvı fazına yüksek afiniteyle adsorbe olduğu gösterilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında geliştirilen yöntem, 0,5-50 µg/L konsantrasyon aralığında yüksek doğrusal bir yanıt göstermiş ($R^2 > 0,9965$), LOD değerleri 0,33–0,38 µg/L, LOQ ise 1,00–1,25 µg/L aralığında bulunmuştur (Pang ve diğ., 2017)

Akyüz ve diğ. yaptığı başka bir çalışmada, pestisitlerin elektrokimyasal olarak tayini amacıyla elektropolimerize edilmiş metallofitalosiyeninler tabanlı sensörler geliştirilmiştir. Çalışma sonuçları, geliştirilen sensörlerin pestisitler için 110 ng/mL LOD, 0,01-5µg/L aralıkla yüksek tekrarlanabilirlik sunduğunu ortaya koymuştur.

Morou ve diğ. (2008) yaptığı çalışmada püskürtülmüş yüzeylerde bulunan DDT'nin tayini amacıyla dehidroklorinaz enzimi temel alınarak pH değişimine dayalı bir biyolojik analiz yöntemi geliştirilmiştir. Araştırmacılar, DDT'nin dehidroklorinaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyon sonucunda HCl açığa çıkardığını ve bunun ortam pH'ında ölçülebilir bir değişime neden olduğunu göstermiştir. Bu pH değişimi, uygun bir pH indikatörü veya pH elektrodu yardımıyla izlenerek DDT miktarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada tespit edilecek minimum DDT miktarını 3,8 mg/ml olarak, tespit için doğrusal aralığın ise 12-250 mg/mL arası olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.5. DDT

DDT, trikloroetan merkez karbon atomuma bağlı iki adet para-klorifenil halkası ve üç adet klor atomu içeren, aromatik halkaları sayesinde stabil ve yağda çözünebilen bir kimyasaldır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. DDT'nin a: kimyasal yapısı ve b: üç boyutlu moleküler yapısı

DDT, başlangıçta sıtma etmeni sivrisinekler ve tifüs etmeni bitler gibi hastalık taşıyıcı böceklerin kontrol altına alınması amacıyla etkili bir insektisit olarak uluslararası ölçekte kullanılmış, daha sonra ise tarımsal üretimde ve evsel uygulamalarda yaygın biçimde benimsenmiştir (Burr, 2005). Ancak, 1970'li yıllardan itibaren DDT ve diğer klorlu hidrokarbon bileşikleri, çevresel ortamda uzun süre kalıcı olmaları ve yüksek lipofilik özellikleri (lipidler ile su arasındaki yüksek dağılım katsayısı) nedeniyle ekosistemlerde ve hedef dışı organizmaların lipid dokularında kronik birikimlere yol açmaları sebebiyle, birçok ülkede tarımsal amaçlı kullanımları kısıtlanmış veya tamamen yasaklanmıştır (Anonim, 2022c).

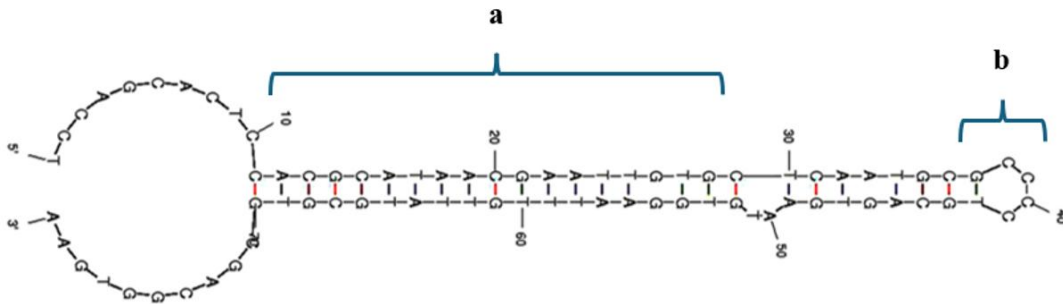
Organoklorlu bileşiklerin kullanımı Türkiye'de yasaklanmış olmasına rağmen, ilerleyen yıllarda düşük düzeylerde de olsa yasa dışı kullanımlarının devam ettiği bildirilmiştir (Dervişoğlu ve diğ., 2013). Ayrıca, DDT'nin halk sağlığı amaçlı böcek kontrolünde sınırlı miktarlarda kullanımının sürdüğü belirtilmektedir (Davies, 2007). Literatürde, süt ve süt ürünlerinde pestisit kalıntılarının tespiti amacıyla çeşitli ülkelerde çok sayıda çalışma yapılmış olup, bu çalışmalarda OCP, OPP ve piretroid grubu pestisitlerin varlığı saptanmıştır. Türkiye (Bulut ve Akkaya, 2011), Hindistan (Bedi ve diğ., 2018), Meksika (Gutierrez ve diğ., 2013), Çin (Zhong ve diğ., 2003), Brezilya (Santos ve diğ., 2014), Mısır (Ayoub ve diğ., 2012), Uganda (Kampire ve diğ., 2011), Slovenya (Khaniki., 2000) ve Etiyopya (Deti ve diğ., 2014) gibi farklı ülkelere temin edilen süt ve süt ürünlerinde yapılan analizler, özellikle OCP'lerin yaygın şekilde bulunduğunu göstermektedir. Analiz edilen örneklerde, tamamı kullanımı yasaklanmış OCP kalıntısına rastlanmıştır. Bu durum, özellikle süt ve süt ürünlerini tüketen bebek ve küçük çocuklar için sağlık riski oluşturabilmektedir (Coşkun ve Şanlı, 2019).

DDT'nin mikrobiyal ve fotokimyasal bozunmasının yavaş bir süreç olduğu ve bu süreç sonucunda DDT kadar kalıcı ve toksik olan DDD ve DDE kalıntılarının oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle, DDT ve bozunma ürünlerine ait kalıntılar olan DDE ve DDD, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan birçok ülkede göl, içme suyu, toprak gibi çeşitli ekosistemlerde tespit edilmiştir (Umulisa ve diğ., 2020). Bu metabolitlerin kalıcılığı ve biyobirikimi, birden fazla maruziyet yolu ve uygunsuz kullanım/elleçleme uygulamaları ile birleştiğinde, düşük dozlarda bile uzun vadeli sağlık risklerini artırabilmektedir. Çoğu gıda kategorisinde DDT metabolit düzeylerinin önerilen sınırların üzerinde olduğu, bunun da tüketiciler için ciddi sağlık riskleri oluşturduğu bildirilmektedir (Mengistu ve diğ., 2025).

Gıdalarda bulunabilecek en yüksek DDT içerikleri Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'ne göre belirlenmiştir. Bu yönetmeliğe göre sütlerde bulunabilecek maksimum DDT kalıntı miktarı 40 µg/kg süt olarak sınırlandırılmıştır (Anonim, 2022b).

2.2. Aptamerler

Aptamerler, ilk olarak 1990 yılında Gold ve Ellington tarafından birbirinden bağımsız olarak geliştirilen (Ellington ve Szostak, 1990, Tuerk ve Gold, 1990), *in vitro* koşullarda seçilen ve çoğaltılan kısa, tek sarmallı DNA veya RNA dizileridir (Şekil 2.2). Bu oligonükleotidler, hedef moleküllerine karşı yüksek özgüllük ve bağlanma afinitesi, benzersiz yapılar özel katlanmaları nedeniyle afinitelerini belirli hedeflerine gösteren özgün üç boyutlu yapılar oluşturabilmektedirler (Famulok, 1994 Proske ve diğ., 2005).



Şekil 2.2. Kendi üzerine kıvrılarak(a) heliks ve (b) saç tokası yapısı oluşturmuş tek sarmallı DNA aptameri (Zhang, 2020)

"Aptamer" terimi, Latince "aptus" (uyum sağlamak) kökünden türetilmiş olup, bu moleküllerin hedeflerine yapısal olarak uyum sağlayabilme özelliklerine atıfta bulunur.

Aptamerler, SELEX yöntemi ile çeşitli avantajlarına dayanarak, terapötik uygulamalarda ve biyolojik analizlerde avantajlı olarak kullanımını sağlamaktadır. (Ellington ve Szostak, 1990, Tuerk ve Gold, 1990, Song, 2008). Antikorların tüm avantajlarına sahip olmalarının yanında, aynı zamanda termal stabilite, düşük maliyet ve tekrar tekrar uygulama potansiyeli gibi kendilerine özgü üstünlükler taşımalarına dayanarak, aptamerler birçok bilim insanının dikkatini çekmektedir (Song, 2012).

Son yıllarda pestisit tayininde kullanılması amacıyla çeşitli aptamer geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bunlar arasında DDT (Zhang ve diğ., 2020), atrazin (Abraham ve diğ., 2018) gibi OCP'ler; isocarbophos, phosalone, methamidophos, acephate, trichlorfon, dursban (Bai ve diğ., 2015); diazinon (Hassani ve diğ., 2018), paraokson (Belinskaia ve diğ., 2019), malathion (Hong ve Jang, 2020; Nie ve diğ., 2018) gibi OPP'ler için; acetamiprid (Fei ve diğ., 2015; Shi ve diğ., 2013; Qi ve diğ., 2020), imidochloropid (Bor ve diğ., 2020) gibi neonikotinois grubu pestisitler için ya da çeşitli PCBler için (Mehta ve diğ., 2012; Verdian ve diğ., 2019) aptamer tasarımları yapılmıştır.

1990'lı yıllardan bu yana, aptamer seçimi için hedef molekül yelpazesi büyük ölçüde genişlemiştir. Literatürde, iyonlar ve amino asitler gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden başlayarak; peptitler, proteinler, virüs partikülleri ve hatta tüm hücreler (bakteriyel, bitkisel veya hayvansal) gibi makromoleküllere kadar çok çeşitli hedefler için DNA veya RNA temelli aptamerlerin geliştirildiği bildirilmektedir. Bu kapsamda, aptamerler küçük moleküller, toksinler, biyolojik makromoleküller ve patojen organizmalar gibi geniş bir hedef yelpazesine karşı yüksek özgüllük ve afiniteleriyle seçilmiş ve başarıyla uygulanmıştır (Sefah ve diğ., 2010).

Genel olarak aptamer üretimi hidrofobik bileşenleri (özellikle hidrofobik küçük molekülleri veya organik kirleticileri) hedef almak için sınırlı kalmaktadır çünkü aptamerlerin doğası ve seçilme süreci bu tür hedeflerle etkileşimi zorlaştırmaktadır. Aptamerlerin yapısı doğası gereği hidrofobik etkileşimlere uygun olmadığı bildirilmiştir. Standart bir DNA ya da RNA aptamerinin hidrofilik, negatif yüklü moleküller olduğu ve hidrofobik bağlanma yüzeyleri oluşturma kapasitesinin sınırlı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle hidrofobik moleküllerle güçlü ve özgül etkileşim kurmaları zorlaşmaktadır. Bundan dolayı, literatürde hidrofobik yapıdaki DDT bileşeninin tespiti için hidrofilik etkileşimlere girmeye yatkın aptamer dizisinin belirlenmesini zorlaştırmıştır (Hasegawa ve diğ., 2016). Bunun yanında SELEX sürecinde kullanılan rastgele oligonükleotid

kütüphaneleri, yalnızca dört temel nükleotidden oluşur ve kimyasal çeşitlilikleri sınırlıdır. Bu da hidrofobik hedeflerle etkileşim için gerekli farklı fonksiyonel grupların eksikliğine yol açmasından dolayı, hidrofobik bağlanmayı desteklemez (Mulholland ve diğ., 2023).

Aptamerler, kimyasal olarak modifiye edilebilen yapılar olmaları sayesinde fonksiyonel özelliklerinin iyileştirilmesine olanak tanıyan esnek biyomoleküllerdir. Bu modifikasyonlar aracılığıyla, doğal yapılarına özgü bazı sınırlamaların aşılması mümkündür (Lakhin ve diğ., 2013). Aptamer geliştirme süreci genel olarak iki temel aşamada gerçekleşir. İlk aşamada, hedef moleküle yüksek bağlanma afinitesi gösterebilecek oligonükleotid dizileri, SELEX yöntemiyle geniş bir kütle içerisinde seçilir. İkinci aşamada ise, seçilen aptamer dizileri daha kısa, daha kararlı ve biyolojik olarak daha dayanıklı formlara dönüştürülmek üzere optimize edilir. Bu süreçte hem DNA hem de RNA tabanlı aptamerlerin tasarımı ve sentezi gerçekleştirilebilmektedir (Antipova ve diğ., 2018).

2.3. Biyosensörler

Sensör kelimesi, Latince “*sensorium*” (duyumsal yetenek) veya “*sensus*” (duyu) sözcüklerinden türetilmiş olup, çevresel bir değişimi algılayarak ölçülebilir bir sinyale dönüştüren sistemleri ifade etmektedir. Bu kavramsal köken, teknik sensörler ile insan duyu organları arasındaki işlevsel benzerliği ortaya koymaktadır. Sensörler, mikroelektronik ve kısmen bilgi işlem alanlarındaki gelişmelerin etkin bir biçimde kullanıldığı sistemler olup, fiziksel veya kimyasal uyarıların algılanması ve değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Turner, 2013).

Bu genel çerçeve içerisinde biyosensörler, algılama elemanı olarak enzim, antikor, nükleik asit, hücre veya aptamer gibi biyolojik bileşenleri kullanan sensör sistemleri olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörlerde, biyolojik tanıma olayı bir dönüştürücü (transdüser) yardımıyla elektriksel, optik veya kütleli bir sinyale çevrilerek analitin hızlı, seçici ve hassas bir şekilde tespit edilmesi sağlanır. Yüksek özgüllükleri, kısa analiz süreleri ve taşınabilir sistemlere entegre edilebilme potansiyelleri sayesinde biyosensörler; çevresel izleme, gıda güvenliği, klinik tanı ve pestisit kalıntı analizleri gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Mehrotra- 2016).

Sensörler bir arayüzey ile elektronik kontrol sisteminden oluşmuştur, diğer yandan çevre, prosedür, işlem veya makine gibi diğer bileşenlerde bulunabilir. Biyolojik moleküller ve biyolojik süreçler; biyoloji, kimya, biyokimya, tıp, gıda güvenliği, çevresel

izleme ve biyoteknoloji gibi pek çok bilimsel alanda temel bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda biyosensörler, kimyasal sensörler sınıfında yer alan, tanıma mekanizması olarak biyokimyasal bir bileşeni kullanan sistemler olarak tanımlanmaktadır. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği tarafından yapılan tanıma göre, biyosensörler, belirli bir substratı tanıyabilen biyolojik bir eleman (enzim, antikor, nükleik asit vb.) ile bu tanımayı ölçülebilir bir sinyale dönüştüren fiziksel bir transdüserin entegrasyonu ile oluşturulan cihazlardır (Cammann, 1977).

Biyosensör kavramı ilk olarak 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından ortaya atılmış; glikoz oksidaz enziminin bir oksijen elektrodu ile birlikte kullanılmasıyla kandaki glikoz konsantrasyonunun ölçülmesi mümkün hale getirilmiştir. Bu çalışma, modern biyosensör teknolojisinin temelini oluşturmuş ve sonraki yıllarda geliştirilen çok sayıda biyo algılama platformuna öncülük etmiştir (Clark ve Lyons, 1962).

İdeal bir biyosensörün taşınması gereken başlıca özellikler; aşağıdaki gibi özetlenebilir (Thévenot ve diğ., 2001; Gupta ve diğ., 2015).

Seçicilik: Biyosensörlerin en temel özelliği, yalnızca hedef analite özgü bir yanıt üretmeleri, bunun dışındaki girişim oluşturan bileşenlere karşı tepki vermemeleridir. Yüksek seçicilik, özellikle kompleks biyolojik örneklerde doğru tayin açısından kritik öneme sahiptir.

Duyarlılık ve Algılama Sınırı: **Duyarlılık**, biyosensörün analit konsantrasyonundaki küçük değişimlere verdiği sinyal yanıtını ifade ederken; **algılama sınırı** (veya tespit sınırı: LOD) sensörün güvenilir biçimde ayırt edebildiği en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Yüksek duyarlılığa sahip biyosensörler, özellikle toksikolojik açıdan kritik öneme sahip bileşiklerin eser miktarlarda dahi tespit edilebilmesine olanak sağlamakta; düşük LOD değerleri ise sensörün iz seviyesindeki analitlere karşı yüksek performans sergilediğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. LOD genellikle kör (boş çözelti) sinyalinin standart sapmasının belirli bir katsayısı (çoğunlukla 3σ) esas alınarak hesaplanmaktadır.

Tepki Süresi: Hedef analitin biyosensöre uygulanmasından itibaren kararlı bir sinyal elde edilmesine kadar geçen süreyi ifade eder. Kısa tepki süresi, biyosensörlerin hızlı analiz yapma kabiliyetini artırır ve özellikle saha uygulamaları için önemlidir.

Doğrusal Çalışma Aralığı: Biyosensörün analite verdiği yanıt ile analit konsantrasyonu arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu aralık, doğrusal çalışma aralığı olarak tanımlanır. Bu aralık, tayin sınırından başlayarak kalibrasyon eğrisinin doğrusal yapıdan sapmaya başladığı konsantrasyona kadar olan bölgeyi kapsar. Bir diğer deyişle

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı tayin edilebilen en düşük derişimden, kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği (doğrusallık sınırı) derişime kadar olan aralığını kapsar. Sıcaklık, pH, tampon çözeltisinin türü ve iyonik kuvveti gibi çevresel parametrelerden etkilenmektedir.

Sinyal Kararlılığı: Sabit ortam koşulları altında biyosensörden elde edilen sinyalin zamana karşı kararlılık göstermesi, güvenilir ölçüm açısından önemlidir. Sinyaldeki dalgalanmalar, analit konsantrasyonunun yanlış değerlendirilmesine yol açabilir.

Doğruluk ve Hassasiyet: Ölçümlerin gerçek değerlere yakınlığı (doğruluk) ve aynı koşullarda yapılan tekrar ölçümlerin birbiriyle tutarlılığı (hassasiyet), biyosensörün güvenilirliği açısından temel kriterlerdir.

Yeniden Kullanılabilirlik: Biyosensörün, analit ile etkileşimden sonra yeniden çalışabilir duruma gelebilme kapasitesidir. Yeniden kullanılabilirlik, ekonomik açıdan avantaj sağladığı gibi analiz tekrarlanabilirliğini de artırmaktadır.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün performansında kayda değer bir bozulma olmaksızın etkin bir şekilde çalışabildiği toplam süredir. Uzun raf ömrü, depolama ve taşıma kolaylığı açısından tercih edilir.

Çevresel Koşullara Dayanıklılık: Sıcaklık, pH ve nem gibi çevresel değişkenler karşısında biyosensör performansının stabil kalması, farklı uygulama alanlarında güvenilir veri üretimi için önemlidir.

Ekonomiklik: Biyosensörlerin üretim ve kullanım maliyetlerinin düşük olması, yaygın ve sürdürülebilir kullanım açısından belirleyici bir faktördür. Özellikle düşük kaynaklı ortamlarda uygulanabilirlik açısından bu özellik kritik önemdedir.

Her ne kadar biyosensörler; özgüllük, hassasiyet, hızlı analiz süresi ve düşük maliyetli kullanım gibi çeşitli avantajlarıyla öne çıksa da biyosensörlerin üretimi ve uygulamasına ilişkin bazı kısıtlılıklar da mevcuttur. Öncelikle, biyosensörlerde kullanılan biyolojik bileşenlerin temini ve saflık düzeyleri önemli bir sorun teşkil edebilmektedir. Bu biyolojik türlerin (enzimler, antikorlar, DNA parçaları vb.) izole edilmesi hem maliyetlidir hem de yüksek saflıkta üretimleri teknik olarak güç olabilir. Ayrıca bu bileşenlerin immobilizasyon (sabitleme) süreçlerinde biyolojik aktivitenin kaybı sıkça karşılaşılan bir problemdir (Thévenot ve diğ., 2001).

Bununla birlikte, analiz sırasında test ortamında bulunan çeşitli kimyasal maddeler, özellikle enzim gibi biyolojik elementlerin aktivitesini olumsuz etkileyebilir. Örneğin, ağır metaller enzimlerin aktif bölgelerini inhibe ederek sensör performansında

düşüşe neden olabilir. Diğer yandan, biyolojik örnekler (kan, tükürük gibi) içerisinde yer alan elektrokimyasal olarak aktif türler, hedef analitin algılanmasını engelleyebilir. Bu fizyolojik sıvılarda bulunan proteinler ve diğer moleküller, sensör yüzeyine bağlanarak sensörün kirlenmesine yol açabilir; bu durum ise sensör sinyalinin zayıflamasına ve doğruluk ile tekrarlanabilirliğin azalmasına neden olur (Turner, 2013).

Biyosensörler genel olarak üç temel bileşenden oluşmaktadır:

Biyoreseptör: Hedef analit ile özgül (spesifik) bağlanmayı sağlayan biyolojik tanıma elemanıdır. Enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve hücre reseptörleri gibi bileşenlerden oluşabilir. Biyoreseptörün stabilite göstermesi ve immobilize edilebilir yapıda olması gereklidir.

Transdüser (Dönüştürücü): Biyoreseptörde gerçekleşen biyokimyasal etkileşim sonucunda oluşan fiziksel ya da kimyasal değişimi ölçerek bunu elektriksel bir sinyale dönüştüren ara birimdir. Böylece analit varlığı veya miktarı, ölçülebilir bir sinyal olarak ifade edilebilir.

Dedektör (İşlemci ve Gösterge Ünitesi): Transdüser tarafından üretilen elektriksel sinyalleri alarak bunları güçlendiren, işleyen ve analiz eden bileşendir. İşlenen veriler konsantrasyon birimi gibi anlamlı çıktılara dönüştürülerek bir ekran aracılığıyla kullanıcıya sunulur ya da dijital veri tabanlarına aktarılır.

Bu üç temel bileşenin birbiriyle uyumlu çalışması, biyosensörün genel performansı üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Sensör tasarımında bu bileşenler arasındaki etkileşimlerin dikkatle optimize edilmesi, sistemin doğruluğu, hassasiyeti ve güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir (Gupta, 2015).

2.3.1. Biyosensör çeşitleri

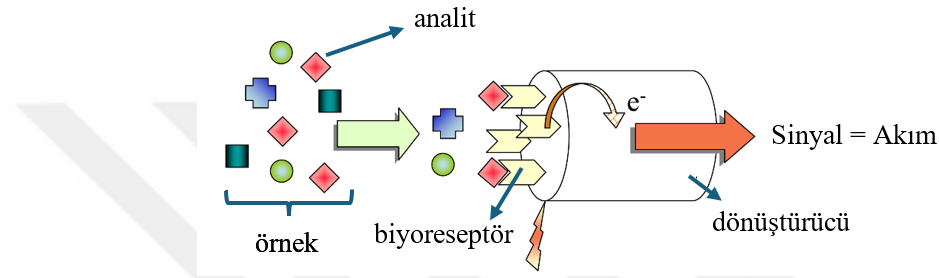
Kullanılan bioelemente veya algılama mekanizmasına göre farklı biyosensör türleri geliştirilmiştir (Kamış, 2021).

2.3.1.1. Elektrokimyasal biyosensörler:

En yaygın olarak kullanılan biyosensörlerdir. Algılayıcı moleküller ya elektrot yüzeyine kaplanır ya da kovalent olarak bağlanır. Algılayıcı moleküller, tespit edilecek bileşiklerle özgül olarak reaksiyona girerek, analitin konsantrasyonu ile orantılı bir elektriksel sinyalin oluşmasına neden olur (Şekil 2.3). Elektrokimyasal biyosensörlerde

en yaygın algılama yöntemi; akım, gerilim (voltaj), iletkenlik, kapasitans ve empedans ölçümüdür. Glukoz, tümör belirteçleri, hormonal analizler, pestisit, nitrit, nitrat amonyum iyonları miktarlarının belirlenmesi, su kirliliği ve endüstriyel atıkların izlenmesi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Thévenot, 2001, Mehrotra, 2016, Wang, 2006).

Elektrokimyasal biyosensörlerde, sistemin verdiği analitik yanıt; gerilim, akım, gerilime bağlı akım, iletkenlik ve empedans gibi elektriksel parametrelerin ölçülmesi ve bu parametrelerde meydana gelen değişimlerin analiz edilmesiyle elde edilen sinyaller, biyolojik tanıma olayına karşılık gelen kantitatif verilerin elde edilmesine olanak sağlar.



Şekil 2.3. Elektrokimyasal biyosensörün şematize gösterimi

Elektrokimyasal biyosensörlerin; kullanılan biyolojik tanıma elemanı, sinyal dönüştürme mekanizması ve ölçüm tekniğine bağlı olarak farklı çeşitleri bulunmaktadır.

1) Konduktometrik biyosensörler

Bir enzim tepkimesi, elektrot çevresindeki çözeltinin iletkenliğinde bir değişikliğe yol açar ve bu değişiklik konduktometrik dönüştürücü tarafından kaydedilir. Konduktometrik biyosensörler, hücre çözeltisinin elektriksel iletkenliğindeki değişimi ölçebilir. Çoğu reaksiyon, çözeltinin bileşiminde bir değişikliğe neden olur. Bu nedenle, konduktometrik biyosensörler, bir çözeltide meydana gelen herhangi bir tepkisel değişikliği tespit edebilir. Konduktometrik dönüştürücü, elektrot yüzeyine bitişik ince bir elektrolit tabakasının iletkenliğini ölçmek üzere tasarlanmış, iki elektrotlu minyatür bir cihazdır. Konduktometrik biyosensörler, glukoz, sakkaroz, laktat, etanol, üre, nitrit, formaldehit, ağır metal iyonları ve pestisitler dahil olmak üzere birçok farklı maddenin tespiti için kullanılmaktadır (Dzyadevych, 2004, Jaffrezic-Renault ve Dzyadevych, 2008).

2) Potansiyometrik biyosensörler:

Bir çözeltiye yerleştirilen iki elektrot arasındaki potansiyel farkını ölçerek çalışır. Bu sistemde bir elektrot ölçüm yaparken, diğeri sabit potansiyele sahip referans elektrottur. Ölçüm elektrodunda potansiyel, redoks reaksiyonlarının gerçekleştiği katı-sıvı ara yüzeyinde oluşur. Potansiyometrik biyosensörlerde genellikle iyon-seçici elektrotlar kullanılır. En yaygın örneği, pH metre probunu çevreleyen immobilize enzim membranıdır (Thévenot, 2001). Enzimatik reaksiyonlar sırasında oluşan hidrojen iyonları, cam membran yüzeyinde pH değişimine neden olur ve bu değişim yüksek empedansla gerilim olarak ölçülür. Bu sayede, biyolojik reaksiyon herhangi bir elektriksel müdahale olmadan izlenebilir. Kan elektrot düzeylerinin ölçülmesinde, pH ölçümünde, gıdalarda iyon içeriğinin belirlenmesinde, metabolitlerin analizinde ve pestisit kalıntılarının belirlenmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Ronkainen ve diğ., 2008).

3) Amperometrik biyosensörler:

İki elektrot arasına potansiyel uygulandığında oluşan akımı ölçerek çalışır. Bu sensörler hızlı yanıt süresi, geniş dinamik aralık ve yüksek hassasiyete sahiptir. En yaygın örneklerinden biri Clark oksijen elektrodudur. Bu sensörler, biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin elektrot yüzeyinde oluşturduğu akım değişimini ölçer. Genellikle ölçüm sonucu elde edilen akım, analit konsantrasyonu ile doğrusal ilişkilidir. Özellikle oksijen ve hidrojen peroksit gibi maddeler bu yöntemle belirlenebilir (Prodromidis ve Karayannis, 2001). Amperometrik biyosensörler, redoks aracılı ya da aracısız elektron transferi prensibine dayanır. Ferrosen, ferrisiyanür ve metilen mavisi gibi maddeler sıkça kullanılan redoks araçlarındandır (Roy ve diğ., 2022). Bu biyosensörler; güvenilirlikleri, düşük maliyetleri ve seçicilikleri sayesinde klinik, çevresel ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Song ve diğ., 2006).

4) Empedimetrik biyosensörler:

Empedimetrik biyosensörler, biyolojik tanıma elemanı (enzim, antikor, aptamer vb.) ile hedef analit arasındaki etkileşimin, elektrot/çözelti arayüzündeki elektriksel empedans değişimleri üzerinden izlendiği elektrokimyasal sensörlerdir. Bu sensörlerde

ölçüm, genellikle Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) tekniği kullanılarak gerçekleştirilir. EIS, geniş bir frekans aralığında uygulanan küçük genlikli alternatif akım sinyaline karşı sistemin verdiği yanıtın analizine dayanır. (Lisdar ve Schafer, 2008)

Hedef analitin elektrot yüzeyine bağlanması, genellikle yük transfer direncinde (R_{ct}), çift tabaka kapasitansında veya difüzyon kontrollü parametrelerde değişime yol açar. Bu değişimler Nyquist veya Bode diyagramları üzerinden değerlendirilerek analit varlığı ve konsantrasyonu belirlenebilir.

2.3.1.2. Kalorimetrik biyosensörler

Kalorimetrik biyosensörler, biyolojik reaksiyon sırasında oluşan ısı değişimini ölçerek çalışır. Bu yöntem, numunenin optik özelliklerinden bağımsız genel bir tayin prensibine dayanır. Geçmişte hassas ısı ölçüm cihazlarının sınırlı olması, bu tekniğin biyolojik analizlerde kullanımını kısıtlamıştır. Ancak, son yıllarda geliştirilen düşük maliyetli ve gelişmiş kalorimetrik cihazlar, bu yöntemin yeniden ilgi görmesini sağlamıştır. Bu biyosensörler, immobilize edilmiş enzimlerin özgüllüğünü kalorimetrik ölçüm prensibiyle birleştirir. Tıbbi alanda glukoz tespiti, üre, laktat gibi metabolit ölçümü, enzim aktivitelerinin izlenmesi, gıdalarda enzimatik bozulma süreçlerinin takibi, çevre analizlerinde pestisit gibi kirleticilerin tespiti gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır.

2.3.1.3. Piezoelektrik biyosensörler

Analiz edilen maddenin (analitin) sensör yüzeyindeki piezoelektrik kristale bağlanmasıyla oluşan kütle değişimini rezonans frekansındaki değişiklik olarak ölçer. Bu değişim, kristalin titreşim frekansında düşüşe neden olur ve kütle miktarıyla orantılıdır. Bu sensörler, doğal elektrik dipolüne sahip kristallerden (örneğin kuartz) yapılır. Enzim immobilizasyonu ile çalışan piezoelektrik enzim sensörlerinde, substratların enzimlere bağlanması sonucu kütledeki artış, kristalin titreşim frekansında değişiklik oluşturur. Bu sayede analit miktarı belirlenir. Bu teknoloji; amonyum, hidrojen, metan, karbon monoksit, nitroz oksit ve organofosfor bileşikler gibi maddelerin ölçümünde, DNA, RNA, aptamer temelli tanı sistemlerinde, ilaç molekül etkileşim analizinde, su ve hava kalitesinin izlenmesinde, yüzey modifikasyonlarının doğrulanmasında yaygın olarak kullanılır.

2.3.2. DDT tayinine yönelik yapılan sensör çalışmaları

İnsan sağlığı ve ekosistem üzerinde oluşturduğu potansiyel riskler nedeniyle DDT'nin hızlı, duyarlı ve seçici bir şekilde tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla geliştirilen sensör teknolojileri, özellikle biyosensör temelli yaklaşımlar, geleneksel analiz yöntemlerine kıyasla daha kısa sürede, düşük maliyetle ve yerinde (*in-situ*) analiz imkânı sunmaktadır. Son yıllarda, DDT'nin tayinine yönelik çeşitli biyosensör sistemleri geliştirilmiş olup, bu sistemler farklı biyoreseptör ve transdüser mekanizmalarına dayanmaktadır.

Literatür incelendiğinde DDT tespiti üzerine çeşitli sensör çalışmalarına rastlanmıştır. Baghban ve Hasanzadeh (2023), raktopaminin gerçek numunelerde (sulu çözeltilerde) hızlı ve yerinde tespiti için tek damlacık mikroakışkanlı, optik temelli çok fonksiyonlu bir kemosensör sistemi geliştirilmiştir. 1 nM LOD değerinde, 0,1 µM-01 M doğrusal sınır içinde tayin yapılabileceği belirlenmiştir.

DDT'yi şablon molekül olarak kullanarak polidopamin temelli moleküler baskılanmış polimer MIP sentezlenen bir çalışmada, manyetik ferroferrik oksit nanoparçacıkları ile birleştirilerek DDT'ye karşı 1×10^{-11} ile 1×10^{-3} mol/L doğrusal sınır aralığında, LOD değeri 6×10^{-12} mol/L olan ve geri kazanımı %89-102 olan bir nanokompozit yapı oluşturularak, turp örneklerinde DDT miktar analizine gidilmiştir (Miao ve diğ., 2020).

Borah ve diğ (2018) yaptığı çalışmada ise DDT dâhil olmak üzere geniş bir pestisit grubunun tayini için glutatyon S-transferaz (GST) enzimi esaslı amperometrik bir biyosensör geliştirilmiştir. GST enzimi, grafen oksit-jelatin (GO-jelatin) matrisi üzerine immobilize edilerek 40 ppm lik bir LOD değeri ile 40–150 ppb doğrusal sınırında tespit yapabilen bir sensör geliştirilmiştir.

Prasad ve Jauhari (2015), DDT ve diğer OCP'ler çok düşük derişimlerde tayini amacıyla çift şablonlu (dual-template), biyomimetik moleküler baskılanmış dendrimer (MIP-dendrimer) tabanlı bir piezoelektrik sensör geliştirmiştir. Sensörün seçiciliğini artırmak için iki farklı OCP molekülünü şablon (template) olarak kullanmış ve dendrimer yapısı içinde bu moleküllere özgü tanıma boşlukları oluşturmuştur. Böylece DDT gibi yapısal olarak benzer OCP'lerin sensör yüzeyine yüksek seçicilikle bağlanması sağlanmıştır. Sensörün DDT için 5,0-150,0 ng/mL doğrusal aralıkta, LOD 0,75ng/ml olacak şekilde, %98,2–103,7'lük bir geri kazanımla çalıştığı gösterilmiştir.

Lisa ve diğ. (2009) yaptığı çalışmada üzüm, mango suyu, süt, karnabahar gibi ürünlerle, DDT'nin hızlı ve yerinde tespiti amacıyla Au NP tabanlı bir şerit immünosensör geliştirilmiştir. DDT varlığında antijen–antikor etkileşimi gerçekleşmiş ve bu etkileşim renk oluşumu ile tespit edilmiştir. LOD değeri 27 ppb LOD değerinde doğrusal aralıkta 1×10^{-3} mol/L çalışan ve geri dönüşüm oranı %87–94 olan immünosensör stratejisi sunulmuştur.

Morou ve arkadaşları ise glutathione S-transferaz enziminin kullanıldığı, dekolorizasyon sonucu pH değişimine dayanan kolorimetrik ve potansiyometrik ölçümlerle en düşük ölçüm düzeyinde 12 mg DDT/mL sonucuna ulaşabilmişlerdir (Morou ve diğ., 2008). Lisa ve diğ., DDT gibi OCP'leri nanogram seviyesinde tespit etmek için Au NP ile derin daldırma bazlı rekabetçi immünolojik test geliştirmişlerdir. Minimum belirleme sınırını DDT için 27 ppm olarak bulmuşlardır (Lisa, 2009).

Bir başka çalışmada, çevresel örneklerde pestisitlerin eşzamanlı (multi-analyte) tespiti amacıyla yüzey plazmon rezonansı tabanlı immünoassayler geliştirilmiştir. DDT'ye özgü antikorlar sensör yüzeyine immobilize edilerek etiketsiz ve gerçek zamanlı algılama sağlanmıştır. Çalışma, DDT gibi kalıcı OCP'lerin, diğer pestisitlerle birlikte tek bir ölçüm platformunda 0,015 ppb LOD değerinde ve 18-50 ng/L doğrusal tespit sınırı ile analiz edilebildiğini göstermiştir (Mauriz ve diğ., 2007).

Mauriz ve diğ. (2007a) yaptığı bir başka çalışmada ise nehir suyu örneklerinde DDT ve yapısal olarak ilişkili bileşiklerin (DDE, DDD gibi) hızlı ve hassas tespiti için optik tabanlı bir immünosensör geliştirilmiştir. DDT'ye özgü antikorları optik bir algılama yüzeyine immobilize etmiş ve DDT–antikor etkileşimi sonucunda oluşan optik sinyal değişimini (örneğin absorbans, floresans veya yansıma değişimi) ölçerek analit tayinini sağlamışlardır. LOD değeri 15 ng/L olan bu immünosensörün doğrusal tespit sınırı 5–150ng/mL olarak belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada çevresel ortamlarda bulunan organik kirleticilerin (özellikle pestisitler ve benzeri kalıcı organik bileşiklerin) hızlı ve yerinde tayini için antikor–antijen etkileşimi esasına dayalı olarak, LOD değeri 0,018 µg/L, doğrusal tespit sınırı 15-60 ng/ml olan ve geri dönüşüm oranı %70-120 arası olan taşınabilir optik bir immünosensör geliştirilmiştir. Hedef analite özgü antikorlar optik algılama yüzeyine immobilize edilmiş, DDT'nin bağlanmasıyla oluşan optik sinyal değişimi (ışık şiddeti/yansıma/absorpsiyon) ölçülerek kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir (Mauriz ve diğ., 2007b).

2.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

(EIS), elektrota bağılı materyallerin, DNA, RNA, proteinler ve diğer biyomoleküller dahil, hem direnç hem de kapasitif özelliklerini ayrıntılı bir şekilde analiz etmeye olanak tanır. Empedans, bir sistemin alternatif akıma gösterdiği toplam direnç olarak tanımlanabilir ve hem gerçek (rezistif) hem de hayali (kapasitif) bileşenleri içerir. Gerçek kısım, elektronların akışına doğrudan karşı gösterilen dirençtir ve elektrot yüzeyindeki çözeltinin direnci veya bağılı biyomoleküllerin oluşturduğu fiziksel engeller bu bileşeni belirler. Hayali kısım ise enerji depolama ve serbest bırakma davranışlarından kaynaklanır; örneğin elektrot ile çözeltideki iyonlar arasındaki kapasitif etki, elektron akışını geciktirir ve akım ile voltaj arasında faz farkı oluşturur. EIS ölçümleri sırasında sistemin toplam empedansı, bu iki bileşenin birleşimi olarak değerlendirilir ve her bir bileşen, elektrot arayüzündeki fiziksel ve kimyasal özellikler hakkında bilgi sağlar. EIS'in temel prensibi, sistem dengedeysen küçük genlikli sinüzoidal bir uyarı sinyali uygulanarak elektrot arayüzündeki cevapların ölçülmesine dayanır.

Sistemin empedansının geniş bir alternatif akım frekans aralığında taranabilmesi EIS'in önemli bir avantajıdır. Genellikle 100 kHz ile 10 MHz arasındaki frekanslar, modifiye elektrotların arayüzey özelliklerinin baskın olarak kontrol edildiği empedans spektrumlarının elde edilmesinde kullanılmıştır. Yüksek frekanslarda empedans daha çok çözeltinin ve elektrot arayüzünün kapasitif davranışını yansıtırken, düşük frekanslarda elektron transferi ve yüzey ile ilgili direnç özellikleri baskın hale gelir.

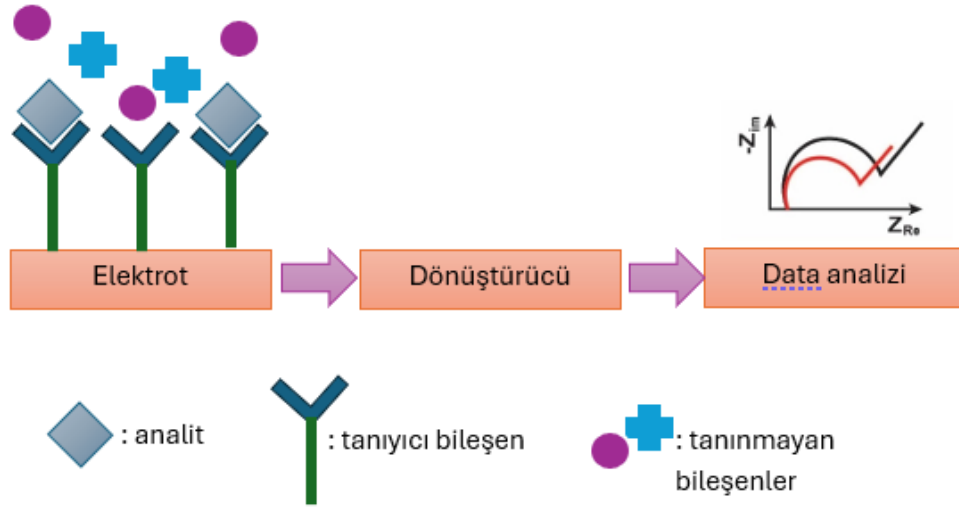
EIS özellikle nükleik asit-elektrot arayüzünde elektron transfer direnci (R_{ct}) ölçümleri için uygulanır. R_{ct} , elektrot yüzeyinden çözeltideki redoks çiftine elektron geçişine karşı gösterilen dirençtir ve elektrot yüzeyinde yalıtkan veya engelleyici bir katman oluştuğunda artar. Örneğin, DNA veya RNA moleküllerinin elektrota bağlanması, yüzeyde elektron transferini sınırlayarak R_{ct} 'de belirgin bir artışa yol açar. Bu özellik, empedimetrik sensörlerde sinyal oluşturmak için yaygın olarak kullanılır. Daha yaygın bir strateji, hibritleşmeden sonra R_{ct} 'yi test etmek için ferrisiyanür/ferrosiyanür redoks çiftleri gibi bir gösterge kullanmaktır.

Yüksek duyarlılık elde etmek için genellikle sinyalin yükseltilmesi gerekir. Bu genellikle çeşitli yüzey modifikasyonlarıyla ya da DNA'ya nanoparçacıklar, kuantum noktaları veya lipozomlar gibi ek "katman oluşturan" işaretleyiciler bağlanarak sağlanır. Ancak, ek katman içeren bu yaklaşım kesin anlamda etiketsiz olarak değerlendirilemez. EIS yöntemi, DNA örneğinde yalıtkan bir katman oluşturabilecek safsızlıkların

bulunmadığı varsayımına dayanır. Bu varsayım, sentetik oligonükleotitler kullanıldığında kolaylıkla sağlanabilir.

2.4.1. Empedimetrik aptasensörler

Aptamerler, belirli bir hedef moleküle (örneğin DNA, protein veya küçük molekül) çok güçlü ve seçici şekilde bağlanabilen kısa tek zincirli nükleik asit dizileridir. Bu özellikleri sayesinde sensör yalnızca hedef analiti algılar ve diğer moleküllerden etkilenmez. Öte yandan, EIS, elektrot arayüzündeki elektron R_{ct} ve kapasitif özelliklerdeki çok küçük değişimleri ölçebilme yeteneğine sahiptir. Bu sayede, aptamer ile hedef molekül arasında oluşan bağlanma, elektrot yüzeyindeki empedans değişimi olarak tespit edilebilir. Empedimetrik aptasensörler, hedef molekülün aptamerle bağlanması sonucu elektrot yüzeyindeki R_{ct} 'de meydana gelen değişiklikleri ölçerek analit tespiti yaparlar (Şekil 2.4). Aptamerlerin yüksek özgüllüğü ile EIS hassasiyetini birleştiren, etiket gerektirmeyen diğer bir deyişle aptamer ve hedef molekül doğal etkileşimleri sayesinde ek bir floresan veya elektroaktif işaretleyiciye ihtiyaç duymadan doğrudan ölçüm yapılabilen elektrokimyasal biyosensörlerdir.



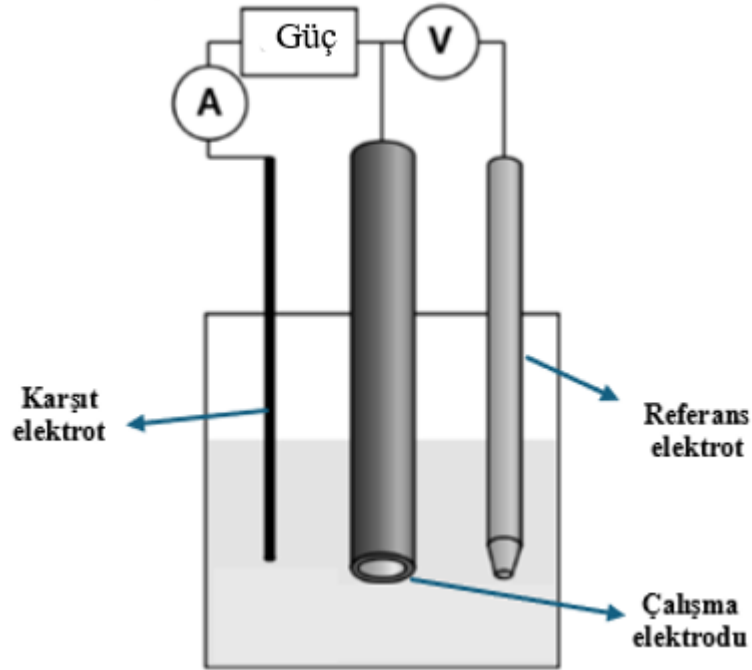
Şekil 2.4. Empedimetrik biyosensör ile analitin bağlanması ve alınan sinyalin şematize gösterimi

Elektrokimyasal olarak aktif olmayan analitlerin tespitinde EIS çok daha kullanışlı ve güçlü bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Nitekim, altın elektrotların kaplanması sonrası yapılan karşılaştırmalarda, döngüsel voltametri (CV) ve

amperometrik yöntemlerle kıyaslandığında, EIS'in yüzey modifikasyonlarını izleme açısından çok daha yüksek duyarlılık sağladığı çeşitli araştırma grupları tarafından rapor edilmiştir (Amin, 2024). CV, elektrot yüzeyindeki redoks aktif türlerin voltaj taraması sırasında oluşturduğu akım yanıtlarını ölçerek, elektrot yüzeyindeki reaksiyonların kinetik ve termodinamik özelliklerini değerlendiren bir elektro analitik tekniktir. Ancak, elektrokimyasal olarak aktif olmayan analitler söz konusu olduğunda, CV ve amperometri sınırlı bilgi sağlarken, EIS hem direnç hem de kapasitif değişimleri hassas şekilde tespit ederek yüzey modifikasyonlarını daha doğru biçimde izleyebilir. Bu üstün duyarlılık ve seçicilik özellikleri sayesinde, EIS tabanlı biyosensörler tıbbi tanı, gıda güvenliği ve çevre izleme gibi alanlarda geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. Empedimetrik aptasensörler, özellikle düşük maliyetli, hızlı ve yüksek hassasiyetli analizler gerektiren uygulamalar için umut verici bir teknolojidir. Gelişen nanomalzeme teknolojileri ve aptamer mühendisliği ile, bu sensörlerin performansı ve uygulama alanları daha da genişlemektedir.

2.4.1.1. Empedimetrik aptasensörlerin yapısal bileşenleri

Empedimetrik aptasensörler, hedef analitin tespiti için biyospesifik tanıma elementi olarak aptamerleri, sinyal dönüşümü için elektrokimyasal sistemleri ve ölçümün gerçekleştiği iletken elektrot yüzeylerini içeren çok bileşenli sistemlerdir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Aptasensör ölçümlerinin gerçekleştiği ortam

Bu sensörlerin yapısı başlıca beş temel bölümde incelenebilir:

a) Elektrot Yüzeyi (Transdüser Platformu): Elektrot, hedef analitin tespiti sürecinde elektriksel sinyalin oluştuğu temel bileşendir. Bu amaçla sıklıkla camyünü karbon elektrot, Au elektrot ve ekran baskılı karbon elektrotlar gibi yüzeyleri düzenlenebilir iletken malzemeler tercih edilmektedir. Elektrot yüzeyinin aptamerlerin stabil ve etkili bir şekilde immobilize edilebilmesine uygun yapıda olması, sensörün duyarlılığı açısından kritik öneme sahiptir (Radi, 2011).

Sensör performansını belirleyen en önemli parametrelerden biri, elektrot yüzeyinin iletkenliği ve aktif yüzey alanıdır. Bu özellikleri geliştirmek amacıyla yüzey genellikle Au NPLer, karbon nanotüpler veya grafen oksit gibi nanomalzemelerle fonksiyonlandırılır. Bu modifikasyonlar sayesinde hem yüzey alanı artırılır hem de biyotanıma elemanlarının immobilizasyon verimliliği yükselterek sinyal aktarımı daha etkin hale getirilir (Zhu ve diğ., 2015).

b) Yüzey Modifikasyon Katmanı: Elektrot yüzeyi, aptamerlerin stabil şekilde bağlanabilmesi için genellikle bir kimyasal modifikasyon işleminden geçirilir. Bu modifikasyon, elektrostatik etkileşim, kovalent bağlanma veya afiniteli bağ sistemleri üzerinden gerçekleştirilebilir. Au elektrotlarda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, tiyol (-SH) grubu içeren aptamerlerin Au yüzeye kovalent bağlanmasıdır. Bu güçlü bağ sayesinde sensör stabilitesi artırılır (Ferapontova, 2010). Alternatif olarak, elektroaktif moleküllerle (örneğin ferrosen) aptamerler fonksiyonlandırılabilir ve redoks tepkimeleri kolaylaştırılabilir.

c) Tanıma Elemanı Aptamer: Aptamerler, empedimetrik sensörlerde hedef moleküle özgün ve seçici bir şekilde etkileşim kuran temel bileşenlerdir. DNA veya RNA tabanlı bu kısa nükleotid dizileri, SELEX yöntemi kullanılarak, hedef moleküle yüksek özgüllük ve bağlanma afinitesi gösterecek şekilde seçilir. Özellikle pestisit gibi küçük moleküller için geliştirilen aptamerler, hedef moleküle etkileşime girdiklerinde konformasyonlarını değiştirirler; bu yapısal değişim ise elektrot yüzeyindeki elektriksel iletkenliği doğrudan etkileyerek ölçülebilir bir sinyal oluşturur.

d) Ölçüm Ortamı (Elektrolit ve Redoks Probu): Empedimetrik analizler, çoğunlukla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redoks çiftini içeren bir elektrolit çözeltisi içerisinde gerçekleştirilir. Bu redoks probu, elektrot yüzeyine etkileşimli erişim sağlayarak yük transfer direncini (R_{ct}) değerinin ölçülmesine olanak tanır. Aptamerin hedef molekül ile özgül bağlanması, elektrot yüzeyinde kütle transferini ve elektron hareketini sınırlayan bir tabaka oluşmasına neden olur. Bu durum, redoks çiftinin elektrot yüzeyine ulaşmasını

kısmen engelleyerek, EIS ölçümlerinde gözlemlenebilir nitelikte bir empedans artışı şeklinde kendini gösterir (Radi, 2011).

e) Sinyal Okuma ve Veri Analizi: Empedimetrik sensörlerde elde edilen elektrokimyasal veriler, çoğunlukla Nyquist diyagramı aracılığıyla değerlendirilir. Bu diyagramda yatay eksen gerçek empedansı (Z'), dikey eksen ise sanal empedansı (Z'') temsil eder. Diyagram üzerinde yarım daire biçiminde gözlemlenen eğri, R_{ct} değerine karşılık gelir. Aptamer ile hedef analit arasındaki özgül etkileşim, elektrot yüzeyindeki yük transferini etkileyerek bu eğrinin yarıçapında belirgin bir değişikliğe neden olur. Bu değişiklik, hedef molekülün varlığı ve konsantrasyonu hakkında kantitatif bilgi sağlar (Hianik ve Wang, 2009).

Empedans verileri, sıklıkla eşdeğer devre modelleri kullanılarak matematiksel olarak analiz edilir ve bu sayede daha hassas ve sayısal sonuçlar elde edilir. Sensör performansı ise; algılama limiti, dinamik aralık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik açısından kapsamlı şekilde değerlendirilir.

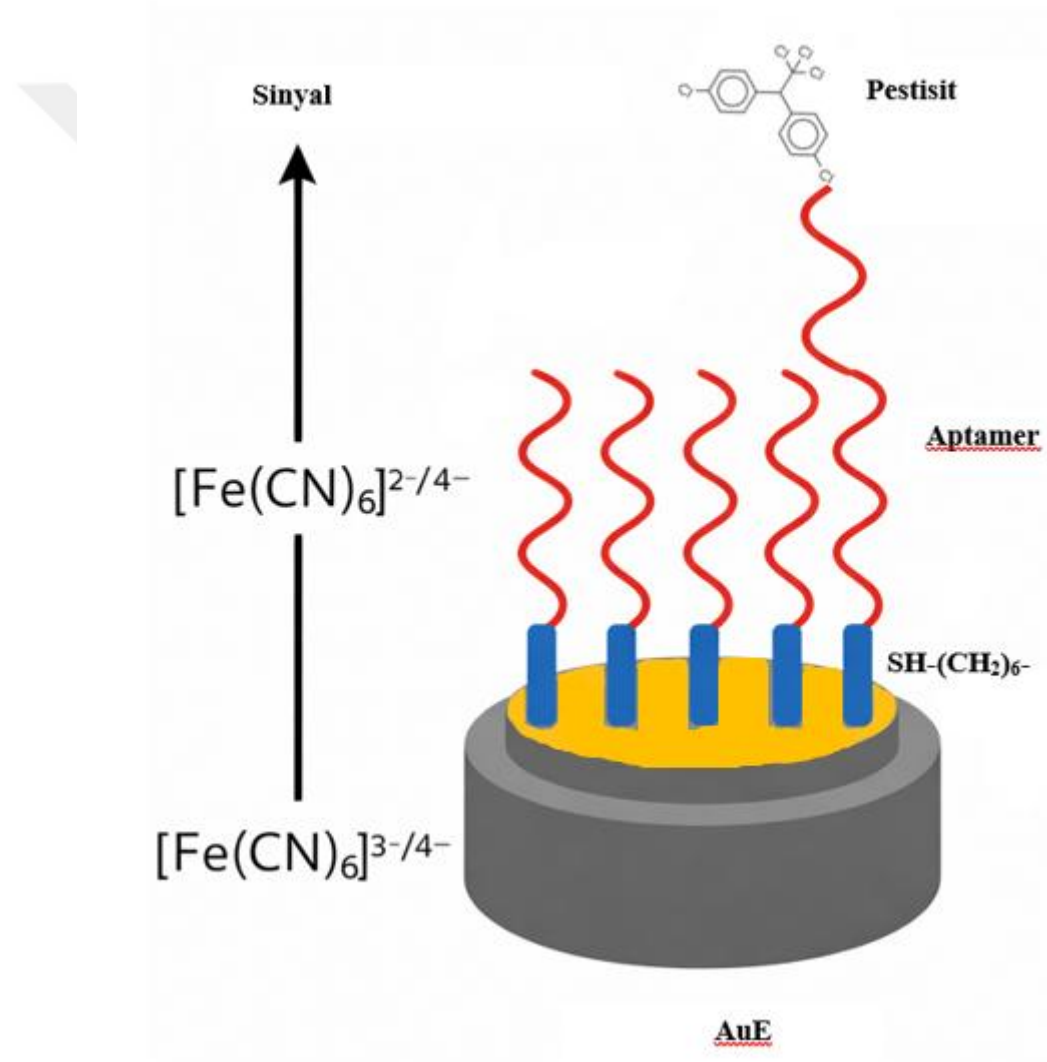
2.4.2. Aptamer temelli biyosensörler (Aptasensörler)

Aptasensörler, geleneksel olarak yaygın şekilde kullanılan antikorlara kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir; bunlar arasında yüksek özgüllük, daha düşük üretim maliyeti ve kimyasal/fiziksel stabilitelerinin yüksek oluşu öne çıkmaktadır (Hianik ve Wang, 2009). Bu sensörlerde, afiniteye dayalı bağlanma mekanizmaları ile metilen mavisi gibi redoks aktif problemlerin sinyal anahtarı olarak kullanılması, analit tespiti için etkili bir yöntem sunmaktadır. Aptasensör performansını etkileyen temel üretim parametreleri arasında; aptamerin, bloklayıcı ajanların ve hedef molekülün inkübasyon sürelerinin optimizasyonu, yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından kritik öneme sahiptir. Ancak bu parametrelerin sistematik değerlendirmesi, özellikle Au yüzeyler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar açısından literatürde hâlâ sınırlı kalmaktadır. Farklı inkübasyon sürelerine yönelik geniş bir deneysel değişkenlik bulunmakta olup, bu durum standardizasyonun önemini daha da artırmaktadır (Şahin ve diğ., 2022).

Aptasensör üretiminde en yaygın kullanılan elektrot malzemelerinden biri Au olup, aptamerlerin bu yüzeylere etkin bir şekilde immobilizasyonu, sensör performansı açısından kritik öneme sahiptir (Song ve diğ., 2008). Bu amaçla, aptamer dizilerinin 5' ucuna -SH grubu içeren kimyasal modifikasyonlar eklenmesi yaygın bir uygulamadır (Oberhaus ve diğ., 2020). Tiyohexsillenmiş aptamerler, Au yüzeylerle güçlü ve özgül

kovalent bağlar oluşturarak molekülün yüzeye stabil şekilde tutunmasını sağlar. Bu kovalent bağ, Au ve SH grubu arasındaki yüksek afiniteye dayanmakta olup, yüzey kaplamalarında yüksek kararlılık ve tekrarlanabilirlik sağlar (Zeng ve diğ., 2011).

Ayrıca, aptamerin 5' ucuna eklenen $(CH_2)_6$ gibi esnek alkil zincirlerinden oluşan aralayıcılar, moleküler konformasyon üzerinde önemli etkiler gösterir. Bu tür esnek bağlantı elemanları, aptamerin yüzeye çok yakın bir şekilde katlanmasını engelleyerek üç boyutlu yapısal esnekliğini artırır. Böylece, hedef moleküle bağlanma bölgesi daha serbest hareket edebilir hale gelir ve bu durum bağlanma verimliliğini ve sensörün duyarlılığını artırır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Au yüzeye tiyoheksillenmiş aptamer formunun immobilize edilmesinin şematik gösterimi

2.4.2.1 Pestisit analizine yönelik aptamer temelli sensör çalışmaları

OCP'lerin tayininde aptamer temelli çalışmalar sınırlı olup literatürde DDT'ye özgü aptamer geliştirilmesine yönelik yalnızca tek bir çalışma rapor edilmiştir. Bunların yanında DDT tayinine yönelik Zhang ve diğ. tarafından Au NP'lerin agregasyonuna dayalı aptasensör tasarımı dışında, literatürde DDT analizi için hazırlanmış bir aptasensör çalışmasına rastlanmamıştır (Zhang ve diğ., 2020). Bunun yanında süt ve süt ürünlerinde OCP'lerin belirlenebilmesi için geliştirilmiş herhangi bir aptasensör çalışmasına da rastlanmamıştır. Poliklorlu bifeniller için ise çeşitli aptamer geliştirme ve aptamer tabanlı sensör çalışmalarına rastlanmıştır (Yan ve diğ., 2015; Wu ve diğ., 2016; Mehta ve diğ., 2016).

Sularda bulunan çeşitli PCB'lerin belirlenmesi için Au NP ile modifiye edilmiş elektrokimyasal aptasensör (Wu ve diğ., 2017), elektrot tabanlı elektrokimyasal aptasensör (Liang – 2019), Nikel heksasiyanoferrat NP'lere dayalı elektrokimyasal aptasensör (Fan ve diğ., 2019), DNA mikrokapsüllerine dayalı elektrokimyasal aptasensör (Han ve ark., 2020) tasarımları yapılmıştır.

Yine sularda bulunabilecek atrazin tayini için Pt NP'lerle kaplanmış mikrotellere dayalı elektrokimyasal aptasensör (Medianos ve diğ., 2018), etiketsiz elektrokimyasal aptasensör (Fan ve diğ., 2019) tasarlanmıştır. Chlorpyrifos analizi için çok duvarlı karbon nanotüpler tabanlı elektrokimyasal aptasensör (Jiao ve diğ., 2016), nanoyapılı elektrokimyasal aptasensör (Jiao ve diğ., 2017), nanokompozit tabanlı elektrokimyasal aptasensör (Xu ve diğ., 2018), aptamerlerin immobilize edildiği mikroelettrot (Ruankham, 2022) gibi tasarımlar literatürde bulunmaktadır. *In vitro* testlerde kullanılan ve bilgisayar destekli modelleme ile kolorimetrik ölçüme dayalı apta-nanosensör tasarımı (Jokar ve diğ., 2017) ve voltametrik ve empedimetrik aptasensör (Khosropour ve diğ., 2020) ile diazinon tayini metodları bulunmaktadır. Malathion tayini için polimer-Au NP kompozit mikrokürelerine dayalı aptasensör (Barahona ve diğ., 2013) geliştirilmiştir. Phoratin kolorimetrik tespiti için Au NP tabanlı aptasensör (Bala ve diğ., 2016), karbon nanoboyunzumsu yapılar/Au NP'ler kompozitine dayalı carbendazim tespiti için aptasensör (Zhu ve diğ., 2019) çalışmaları yapılmıştır. Sebzelerde asetamiprid tespiti için geliştirilen birbirinden farklı özellikteki elektrokimyasal aptasensörler (Hongxia ve diğ., 2019; Chu ve diğ., 2019), tek kullanımlık elektrokimyasal DNA aptasensörü (Rapini ve diğ., 2016), elektrokimyasal empedans spektroskopisi tabanlı aptasensör (Fan ve diğ., 2013), kemilüminesans aptasensör (Qi, 2016) literatürde rastlanan çalışmalar arasındadır.

DDT tayinine yönelik Zhang ve diğ. tarafından Au NP'lerin agregasyonuna dayalı aptasensör tasarımı dışında, literatürde DDT analizi için hazırlanmış bir aptasensör çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada ise üzerinde çalışılan aptasensör üretimine K_d değerine sahip aptamerler elde edilememiştir

2.5. Aptamerlerin Seçiminde *In Silico* Yaklaşımlar

Aptamerler, yüksek özgüllük ve afiniteleri sayesinde proteinler, küçük moleküller ya da toksinlere bağlanabilen nükleik asit bazlı bioreseptörlerdir. Geleneksel olarak SELEX yöntemiyle seçilirler. Ancak SELEX; zaman alıcı, maliyetli ve birden çok döngü gerektiren bir yaklaşımdır (Lee ve diğ., 2023). Bu nedenle, *in silico* (bilgisayar destekli) yöntemler, aptamer seçim sürecini hızlandırmak ve daha verimli hale getirmek amacıyla giderek yaygınlaşmaktadır (Afshar ve diğ., 2021).

In silico araçlar, bir araştırmacıya çok çeşitli yöntemler sunar. Aptamerleri hedef olarak basit bileşiklerin yanı sıra proteinler gibi karmaşık biyopolimerler kullanarak tasarlamalarına da olanak sunar. Moleküler modelleme yöntemlerini kullanarak, hedefe karşı afinitesi geliştirilmiş yeni aptamerler bulmak ve aptamer/hedef etkileşiminden sorumlu yapısal kalıpları belirlemek mümkündür. Nokta mutasyonları ile aptamer afinitesi de iyileştirebileceğinden faydalı araçlar olarak karşımıza çıkar (Buglak ve diğ., 2020).

Bir aptamerin en önemli özelliklerinden biri, belirlenmiş hedefine ne kadar iyi bağlandığı ve onu biyolojik bir karışımda diğerlerinden ne kadar iyi ayırt ettiğidir. Göz önünde bulundurulması gereken anahtar parametreler, bağlanma afinitesi ve özgüllüğüdür. Bağlanma afinitesi, tipik olarak, yüksek bir bağlanma afinitesine karşılık gelen düşük bir K_d değeriyle olarak rapor edilir. Özgüllük ise hedef için K_d 'ye karşı aynı kökenli olmayan bir hedef için K_d oranının nicel ölçümüdür. Spesifiklik genellikle ya genel olarak nükleik asitler için geniş afinitelere sahip olan ya da hedef proteinin homologlarını temsil eden birkaç hedef dışı protein için rapor edilmiştir (Dunn ve diğ., 2017).

In silico yaklaşımı ile aptamer tasarlamak için temel adımlar şu şekildedir;

Sekans Taraması ve Yapısal Tahmin:

DNA/RNA dizileri sanal olarak gelişigüzel tahmini bir şekilde oluşturulur. Bu yapısal tahmin için Mfold, RNAstructure, ViennaRNA gibi araçlar kullanılabilir. Bu araç,

nükleik asit dizilerinin en kararlı konformasyonlarını ve alternatif katlanma yapılarıyla birlikte minimum serbest enerji (ΔG) değerlerine göre olası ikincil yapılarını tahmin etmektedir. Analizlerde, dizilerin saç tokası, sap-halka gibi yapılar oluşturma eğilimleri değerlendirilerek, düşük serbest enerjiye sahip yapı modelleri seçilmesi sonrası, daha ileri yapısal analizlerde 3D modelleme ve moleküler simülasyonu kullanılır.

Ardından aptamerin ikincil yapısı tahmin edilerek saç tokası, sap-halka gibi yapılar belirlenir.

3D yapı modellemesi:

Seçilen aptamer dizilerinin üç boyutlu (3D) yapıları, ikincil yapı tahminlerine dayalı olarak RNAComposer, Rosetta, 3dRNA, SimRNA gibi araçlarla oluşturulur (Afshar ve diğ., 2021). Bu yazılımlar, nükleik asitlerin termodinamik olarak en olası konformasyonlarını tahmin ederek, aptamerin hedef moleküle etkileşime girebilecek uzaysal düzenini ortaya koymaktadır. Elde edilen 3D modeller, aptamer-hedef molekül etkileşimlerinin değerlendirilmesi, bağlanma bölgelerinin belirlenmesi ve moleküler kenetlenme çalışmalarına altlık oluşturmaları açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca, farklı konformasyonların karşılaştırılması yoluyla aptamerin yapısal stabilitesi ve bağlanma potansiyeli *in silico* olarak ön değerlendirmeye tabi tutulabilmektedir.

Moleküler bağlanma simülasyonu:

Aptamer ve hedef molekül (örneğin DDT, protein, toksin) arasındaki bağlanma modeli analiz edilir. Bu yöntemle bir molekülün (örneğin bir aptamerin) başka bir hedef moleküle (örneğin bir protein, toksin veya ilaç) nasıl ve ne şekilde bağlanabileceğini bilgisayar ortamında (*in silico*) modellemeye yarar. Modelleme amacıyla AutoDock, AutoDock Vina, HADDOCK, Molecular Operating Environment (MOE) araçları kullanılabilir (Soon ve Nordin, 2019).

Enerji ve Afinite Analizi:

Serbest bağlanma enerjileri (ΔG), hidrojen bağları ve etkileşim yüzeyleri analiz edilerek en güçlü bağlanan diziler seçilir. Temel Bileşenler Analizi (PCA) bu işlem için kullanılabilen analiz yöntemleri arasındadır.

In silico yaklaşımlar; laboratuvar öncesi aday seçimi, bağlanma mekanizmasının anlaşılması, afinitenin artırılması ve deneysel tekrarların azaltılması gibi avantajlar sunar.

Docking ve MD simülasyonları, aptamer geliştirme sürecinin güvenilir ve tasarruflu bir ön adımı haline gelmiştir.

2.6. Biyosensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

Herhangi bir katı materyalin fiziksel ve kimyasal yüzey özelliklerinin belirlenmesi, söz konusu malzemenin hedef uygulamalar için uygunluğunu değerlendirmede temel adımlardan biridir. Yüzey kimyasal bileşimi çoğunlukla çeşitli spektroskopik teknikler kullanılarak tanımlanmaktadır. Ancak kapsamlı bir yüzey karakterizasyonu, tek bir yöntemin sağlayabileceği bilgiden daha fazlasını gerektirdiğinden, farklı tekniklerin bir arada kullanılması gerekmektedir.

Bu amaçla kullanılan başlıca yöntemler arasında temas açısı ölçümleri, kimyasal analiz için Elektron Spektroskopisi, Azalan Tam Yansımali Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR) ve taramalı prob teknikleri yer almaktadır. Taramalı prob yöntemlerine örnek olarak Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM), Taramalı Elektron Mikroskopisi, İkincil İyon Kütle Spektrometresi ve İyon Saçılma Spektroskopisi verilebilir. Bu yöntemlerin birlikte kullanılması, yüzey topografisi, morfolojisi, kimyasal bileşim ve bağ yapıları gibi çok yönlü bilgilerin elde edilmesine olanak sağlayarak yüzeyin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini mümkün kılar.

Sensör tasarımının ardından elde edilen sensör yüzeylerinin farklı karakterizasyon teknikleri kullanılarak incelendiği çalışmalara literatürde sıklıkla rastlanmaktadır.

Pestisit tayinine yönelik olarak, nanopartiküllerle duyarlılığı artırılmış moleküler baskılama temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerin hazırlandığı bir çalışmada; klorpirifos baskılı nanopartiküllerin yüzeyinde oluşan spesifik bağlanma bölgeleri AFM analizleri ile ortaya konulmuştur. Ayrıca, temas açısı ölçümleri yardımıyla sensör yüzeyindeki hidrofobisite artışı gösterilerek, yüzey modifikasyonunun başarıyla gerçekleştirildiği doğrulanmıştır (Çakır ve diğ.,218).

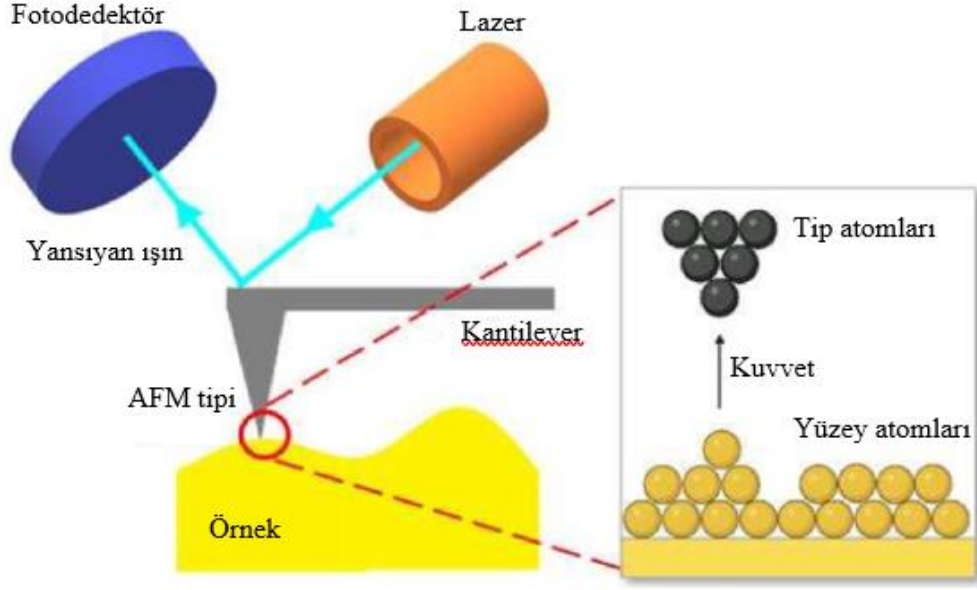
IgG belirlenmesine yönelik olarak geliştirilen SPR temelli bir nanosensörün üretiminde, yüzeye immobilize edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu amacıyla AFM, temas açısı ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. AFM ölçümleri ile nanopartikül bağlanması sonucunda sensör yüzeyinde meydana gelen pürüzlülük artışı ortaya konulurken, temas açısı ölçümleri ile yüzey özelliklerindeki değişimler değerlendirilmiştir. FTIR analizleri ise yüzeye bağlanan nanopartiküllerin oluşturduğu bağ yapılarının doğrulanmasında kullanılmıştır (Türkoğlu ve diğ.,2012).

Ürik asit tayini için tanıma aracı olarak moleküler baskılanmış nanopartiküllerin kullanıldığı yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerinin hazırlandığı bir çalışmada, hazırlanan SPR sensör AFM, temas açısı ve optik profilometre analizleri ile karakterize edildi. Hazırlanan SPR sensörün yüzey modifikasyonu FTIR ile doğrulanmıştır. Sensör yüzeyine nanopartikül kaplanması sonrası AFM ölçümleri ile yüzey morfolojisi incelenmiş, temas açısı ölçümleri ile de modifikasyon sonrası yüzey hidrofilik/hidrofobik özellikler değerlendirilmiştir (Sarıkaya ve diğ, 2017).

2.6.1. AFM

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), ince film yüzeylerinin ayrıntılı şekilde analiz edilmesinde kullanılan yüksek çözünürlüklü bir görüntüleme yöntemidir. Bu teknikte, atomik ölçekte sivri bir probun yüzeyle etkileşimi izlenerek topografik bilgi elde edilir. Yüzeydeki yapı ve düzensizlikler, probun hareketine yansıyan kuvvet değişimleri üzerinden belirlenir. AFM, hem iki boyutlu hem de üç boyutlu yüzey haritalarının oluşturulmasına olanak tanıyarak nanometre ölçeğinde detaylı bir inceleme sunar.

Aşağıdaki Şekil 2.7’de gösterildiği gibi, keskin bir uç (yarıçap <10 nm) bir lazer-optik sisteme bağlı bir kantileverin ucuna yerleştirilmiştir. Uç genellikle V-şeklindedir. Bir lazer ışını, kantileverin düz üst yüzeyinden yansıtılır. Uç numuneyle temas ettiğinde kantileverin sapması, lazer ışınının yansıma açısını değiştirir. Uç yüzey boyunca ilerledikçe, hem yüksekliğin hem de kantilever sapmasının kaydedilmesi, yüzeyin hassas bir şekilde ölçülmesini sağlar ve böylece topografik bir harita veya yükseklik görüntüsü elde edilir. Elde edilen görüntü, yüzeyin doğru bir topografisini sunar ve atomik çözünürlüğe kadar görselleştirme yapılmasına olanak tanır.



Şekil 2.7. AFM yüzey analizinin şematik gösterimi (Amin, 2024)

2.6.2. Temas açısı ölçümü

Elektrotların yüzeyinde yapılan modifikasyonlar yüzeyin ıslanabilirlik ölçülerini de değiştirmektedir. Yüzeylerin ıslanabilirlik derecesi, temas açısı ölçümü ile belirlenir. Teorik olarak, temas açısı 0 ile 180° arasında olur. Eğer temas açısı 90°'den küçük ise yüzeyler hidrofilik; eğer 90°'den büyükse hidrofobik olarak adlandırılır. Bu değer, 0°'ye yaklaştıkça süper hidrofilik, 180°'ye yaklaştığında ise süper hidrofobik olarak adlandırılır (Gürsoy, 2018).

Analiz, numune üzerine bir damla suyun damlatılması ile gerçekleştirilir. Cihazın sol tarafında bir ışık kaynağı sağ tarafında ise bir kamera bulunmaktadır. Numune üzerine düşürülen damlanın görüntüsü kamera yardımı ile büyütülerek yüzey ile yaptığı açı belirlenmektedir.

2.6.3. CV ve EIS yöntemleri

Elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen modifikasyon adımlarının doğrulanması ve bu işlemlerin elektrokimyasal davranış üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla CV ve EIS yaygın olarak kullanılmaktadır. CV ölçümleri, elektrot/çözelti arayüzünde gerçekleşen redoks süreçlerine ilişkin genel bilgi sunarak yüzeyin elektrokimyasal aktifliğindeki değişimlerin izlenmesine olanak tanır. Buna karşın EIS, özellikle biyomolekül immobilizasyonu ve bloklama gibi yüzey işlemleri sonrasında elektron

transferine karşı oluşan direnç değişimlerini yüksek hassasiyetle ortaya koymaktadır. Bu nedenle, yoğun şekilde fonksiyonelleştirilmiş elektrot yüzeylerinin karakterizasyonunda EIS tamamlayıcı ve çoğu durumda daha duyarlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Lisdat ve Schafer, 2008).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. 100 µg/mL derişimde 2,4'-DDT çözeltisi, 2-propanol ve H₂SO₄ (Sigma Aldrich), asetonitril (Honeywell), potasyum ferrisiyanür (K₃Fe(CN)₆) ve potasyum ferrosiyanür (K₄Fe(CN)₆) (Fluka Analytical); potasyum klorür (Emsure); potasyum monobazik, potasyum dibazik (Acros Organics) , atrazin, aldrin, dieldrin ve β-endosülfan kimyasalları içeren çözelti (Merck) ilgili firmaların yerel temsilcisinden temin edilmiştir ve ilave saflaştırma işlemine tabi tutulmadan kullanılmıştır. Elektrot yüzeylerinin mekanik temizliği ve parlatılması için kullanılan 0,3 µm ve 0,05 µm alümina süspansiyonlar Metkon firmasından temin edilmiştir.

Belirlenen sekanslarına sahip tek sarmallı DNA aptamerleri, APT-1(80 baz), APT-2 (40 baz) ve APT-3 (40 baz) olarak adlandırılmış ve Ella Biotech (Almanya) firmasının yerel temsilcisinden temin edilmiştir.

APT-1 aptameri:

5'-SH-(CH₂)₆-TCCAG CACTC CACGC ATAAC GAAGA CATGC CCGCC AATGG ATGTT GTTGG ACCTG TTTGA GTTAT GCGTG CGACG GTGAA-3'

APT-2 aptameri:

5'-SH-(CH₂)₆- GAAGA CATGC CCGCC AATGG ATGTT GTTGG ACCTG TTTGA-3'

APT-3 aptameri:

5'-SH-(CH₂)₆- GAATT GTGCT CAATG CGCCC CTGCA GTGAA TGTGG AATTT-3'

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Hazırlanan çözeltiler ve diğer işlemlerde kullanılan ultra saf su (UPW) Minipure Dest Plus (Türkiye) cihazından elde edilmiştir. Deneylerin hazırlık ve gerçekleştirilme aşamalarında; katı malzemelerin tartımında hassas terazi Radwag/AS 220.R2 (Polonya), çözeltilerin pH ölçümünde pH metre olarak Mettler-Toledo (İsviçre), ultrasonik banyo Bandelin RK 100 H (Almanya) kullanılmıştır. Aptamer çözeltileri -20 °C sıcaklıktaki derin dondurucuda, +4 °C’de saklanması gereken maddeler ise buzdolabında muhafaza edilmiştir. Diğer kimyasallar karanlık kimyasal dolabında saklanmıştır.

Tüm elektrokimyasal ölçümlerde Metrohm marka Autolab IMP PGSTAT204 potentiostat/galvanostat (İsviçre) kullanılmış ve voltammogramlar ile empedans grafiklerinin alınmasında ve analizinde NOVA 2.1.7 arayüzü kullanılmıştır.

Aptamer dizilerinin ikincil yapılarının tahmini için, Zuker tarafından geliştirilen ve termodinamik modellemeye dayanan Mfold Web Server (<http://unafold.rna.albany.edu/>) kullanılmıştır. Verilerin çok değişkenli istatistiksel analizi için PCA uygulanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen özdeğerler, varyans yüzdeleri ve bileşen yükleri değerlendirilmiştir.

Yüzey analizi için AFM ölçümleri TT-2 AFM (Nanoscience Instruments, USA) ile yapılmıştır. Temas açısı ölçümleri Biolin Scientific Theta Lite TL 101 marka kontak açıcı cihazı (İsveç) ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

0,1 M fosfat tamponu çözeltisi (PBS), monobazik (sodyum fosfat monobazik) ve dibazik (sodyum fosfat dibazik) tuzu ile. 0,1 M monobazik ve 0,1 M dibazik çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan dibazik çözeltisi içerisine monobazik çözeltisi kontrollü olarak eklenerek pH değeri 7,4’e ayarlanmıştır. Hazırlanmış olan tampon çözelti 1 gün karanlık ve serin ortamda bekletildikten sonra pH değeri tekrar ölçülerek sabit pH’a gelmesi sağlanmıştır. Bu tez çalışması boyunca kullanılan 0,1 M PBS çözeltisinin pH değeri ayda bir ölçülerek, değişiklik olması durumunda pH 7,4 olacak şekilde ayarlanarak kullanılmıştır, 6 ayda bir de yenilenmiştir.

Temin edilen aptamerler, konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde PBS içerisinde çözdürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılmak üzere bu çözeltiden 10 µM aptamer çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışmanın ilk kısmında primerli hali

sipariş edilen APT-1 aptameri (80 baz) kullanılarak çalışma yapılmıştır. Sonrasında primeri olmadan sipariş edilen APT-2 aptameri (40 baz) ile aynı koşullar çalışılmıştır. PCA analizi ile APT-1 aptamerine yapısal olarak benzerliği belirlenen APT-3 aptameri (40 baz) de alınarak, aynı koşullarda denemeler yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda DDT çözeltisi kullanılmıştır. Bu sebeple her çalışma günü, buzlukta eppendorf tüplerde dondurulan süt numunelerinden çıkarılıp, 0,08 mg DDT/kg süt konsantrasyonuna eşdeğer olan 0,082 µg DDT/mL süt olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden süt ile seri seyreltme işlemleri yapılarak, kullanılacak diğer konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

1:1 (v/v) oranında karıştırılan asetonitril- 2-propanol çözeltisi, elektrotların ultrasonik su banyosunda temizliği aşamasında kullanılmıştır.

3,726 g KCl tartılarak balon jode bulunan 500 mL 0,1 M PBS içerisinde karıştırılmış ve hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır. Ferri-Ferro redoks probu çözeltisini hazırlamak için kullanılmıştır.

Ferri-ferro ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$) redoks probu (FF) hazırlamak için 0,329 g potasyum ferrisiyanür ve 0,4225 g potasyum ferrosiyanür balon jode bulunan 500 mL 0,1M KCl çözeltisinin içerisine eklenerek karıştırılmış ve hacim çizgisine kadar tamamlanmıştır. Tüm çalışmada hem dönüşümlü voltammogram hem de empedans ölçümlerinde redoks probu olarak kullanılmıştır.

0,1 M H_2SO_4 çözeltisi hazırlamak için, %95-97 H_2SO_4 çözeltisinden 1,39 mL alınarak 250 mL UPW içerisinde karıştırılmış ve elektrotların CV tekniği ile elektrokimyasal temizliğinde kullanılmıştır.

Üniversite dışında, gıda analizi yapan bir laboratuvardan; atrazin, aldrin, dieldrin, β-endosülfan pestisitlerinin her birinin konsantrasyonu 100 µg/L süt olacak şekilde karışım halinde temin edilmiştir. Bu numuneden, DDT ile çalışılan konsantrasyonlar ile aynı olacak şekilde, deney günü süt içerisinde hazırlanan çözeltiler ile girişim deneyleri yapılmıştır.

3.1.4. Yağsız ve yarım yağlı sütler

Piyasadan alınan UHT %1,5 yağlı (yarım yağlı) süt DDT çözeltileri hazırlamak için kullanmak amacıyla, 2 mL'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Yine aynı markanın UHT %0,01 yağlı (yağsız süt ya da skim-milk) sütü ise bloklama amacıyla kullanılmak üzere 0,5mL'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Süt numuneleri içeren eppendorflar derin

dondurucuda -18°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Deney günü süt içeren eppendorflardan gerektiği kadar süt alınarak çözündürülmüş ve kullanılmıştır.

3.2. Sensör Hazırlama

Aptasensörlerin üretimi için kullanılacak altın çalışma elektrotları (AuE'ler) farklı temizlik ve kaplama basamaklarından geçirilerek, her adımda yapılan işlemin etkinliği CV ve EIS ölçümleri ile kontrol edildi. Üretim için AuE'lerin tabi tutulduğu hazırlık basamakları;

- 1) **Yüzeylerin Temizlenmesi:** Elektrot yüzeylerinde bulunabilecek kirliliklerden arındırılması amacıyla farklı boyutlarda alümina süspansiyonları ile mekanik olarak parlatılmıştır. Ardından yüzeyde bulunabilecek kalıntıların uzaklaştırılması için önce asetonitril:2-propanol (1:1, v/v) karışımı içerisinde, sonra da UPW içerisinde ultrasonik temizleme işlemi yapılmıştır. H_2SO_4 çözeltisi içerisinde, CV ile elde edilen Au'ya ait piklerin kontrolü yapılarak etkin temizlik yapıldığına karar verilmiştir. Mekanik parlatma ile yüzeydeki fiziksel kirleticiler, oksit tabakaları ve önceki ölçümlerden kaynaklanan kalıntılar uzaklaştırılırken, sülfürik asit ortamında uygulanan elektrokimyasal temizlik işlemi yüzeydeki organik safsızlıkların giderilmesini sağlar. Bu işlemler sayesinde altın yüzeyinde homojen ve reaktif Au bölgeleri açığa çıkarılır. Böylece aptamer immobilizasyonu ve elektrokimyasal ölçümler için daha güvenilir ve tekrarlanabilir bir yüzey elde edilir (Bard ve Faulkner, 2001).
- 2) **Aptamer bağlaması:** Temizlenmiş altın elektrotlar üzerine aptamer çözeltisi damlatılarak belirlenen inkübasyon süreleri boyunca bekletilmiştir. Temizlenmiş altın elektrotlara aptamer bağlanması genellikle Au-S etkileşimine dayanmaktadır. Tiyol uçlu aptamerler, temiz ve aktif Au yüzeyine güçlü ve özgül bir şekilde bağlanarak düzenli bir tek tabaka oluşturur. Bu immobilizasyon, aptamerlerin hedef analite erişilebilir ve fonksiyonel bir konformasyonda yüzeye tutunmasını sağlar. Böylece elektrot yüzeyi biyoseçici hâle getirilerek elektrokimyasal algılama için uygun bir platform elde edilir (Love ve diğ., 2005)

- 3) **Bloklama:** Aptamer bağlanmış yüzeyler, PBS ve UPW ile temizlendikten sonra yağsız süt AuE yüzeye damlatılarak optimizasyon için belirlenen süre kadar (1 saat ya da 2 saat) inkübe edilmiştir. Elektrotların süt ile bloke edilmesi, yüzeyde oluşabilecek analite spesifik olmayan bağlanmaları engelleyerek sensörün hedef karşı seçiciliğini artırmak amacıyla uygulanmaktadır. Aptamer immobilizasyonu sonrasında elektrot yüzeyinde açıkta kalan aktif bölgeler, kazein proteinleri ile kaplanarak elektrot yüzeyinde bir tabaka oluşturur. Bu tabaka, redoks probunun elektrotta erişimini sınırlandırırken aptamer–analit etkileşimi artırır.
- 4) **DDT çözeltileri ile inkübasyon:** Farklı konsantrasyonlarda DDT içeren süt örnekleri, elektrodun Au ucuna damlatılarak optimizasyon için belirlenen süre (yarım saat, 1 saat ya da 2 saat) boyunca inkübe edilmiştir. DDT moleküllerinin elektrot yüzeyindeki aptamerlere özgül olarak bağlanması hedeflenmiştir. İnkübasyon sonrasında elektrot yüzeyi PBS ve UPW ile uygun şekilde durulanarak zayıf veya spesifik olmayan bağlanmalar uzaklaştırılmış ve böylece elektrokimyasal ölçümlerde gözlenen sinyal değişimlerinin esas olarak aptamer–DDT etkileşiminden kaynaklanması sağlanmıştır.

3.2.1. Sensörlerin çalışma koşullarının oluşturulması

Bu çalışmada, Au elektrot yüzeylerinin aptamer bazlı tanıma elementleri ile fonksiyonelleştirilmesi ve DDT tespiti için optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Elektrot yüzey modifikasyonunun ilk adımı olan aptamer immobilizasyon süresi, bloklama işlemi için kullanılan süt ile bekletme süresi ve DDT içeren süt örnekleriyle etkileşim süresi olmak üzere üç temel parametre, değişken koşullar olarak belirlenmiş ve bu parametrelerin etkileri sistematik olarak incelenmiştir.

Aptamer bağlanma süresi, sensör performansı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla 1 sa.ve 2 sa. olacak şekilde iki farklı düzeyde uygulanmıştır. Elektrot yüzeyinde aptamerin bağlanmadığı bölgelerin kapatılması ve spesifik olmayan adsorpsiyonun önlenmesi amacıyla, ticari olarak temin edilen yağsız süt kullanılarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyinin süt ile bloke edilmesi, spesifik olmayan adsorpsiyonların önlenmesi ve biyosensör performansının iyileştirilmesi amacıyla uygulanan yaygın bir yöntemidir. Aptamer immobilizasyonu sonrasında elektrot yüzeyinde hâlâ reaksiyona açık Au bölgeleri bulunabilmekte ve bu bölgeler, özellikle süt

gibi karmaşık biyolojik matrislerde yer alan proteinler, lipidler ve diğer makromoleküller tarafından kontrolsüz şekilde kaplanabilmektedir. Bu durum, ölçümlerde sensör yanıtının güvenilirliğinin azalmasına yol açmaktadır.

Bloklama aşamasında süt kullanılmasıyla, kazein proteinleri açıkta kalan elektrot bölgelerine adsorbe olarak yüzeyde homojen bir kaplama oluşturur. Bu tabaka, elektrot-çözelti arayüzünde rastgele molekül bağlanmalarını böylece sensör yanıtı esas olarak analite özgül bağlanma olaylarından kaynaklanır ve seçicilik ile tekrarlanabilirlik önemli ölçüde artar (Villalonga, 2022).

Bloklama işlemi genellikle redoks probunun elektrot yüzeyine erişimini kısmen engelleyerek yük transfer direncinde (R_{ct}) artışa ve pik akımlarında azalmaya neden olur. Bu değişimler, yüzey modifikasyonunun başarılı olduğunu ve elektrot arayüzünde etkin bir bariyer oluşturulduğunu göstermesi açısından önemli göstergeler olarak kabul edilmektedir (Dorozhko ve diğ., 2026). Bu nedenle süt ve kazein gibi protein bazlı bloklama ajanları, özellikle gıda örnekleriyle çalışan aptasensör ve immünosensör çalışmalarında tercih edilmektedir (Rao ve diğ., 1998, Gupta, ve diğ, 2016).

Buna dayanarak bloklama işlemi için elektrodun Au ucuna damlatılan yağsız süt ile 1 ve 2 sa. süresince inkübasyon yapılmıştır.

Ayrıca, hedef analit olan o,p'-DDT'nin aptamer modifiye yüzeye bağlanma süresinin sensör yanıtı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, DDT içeren süt örnekleri ile temas süresi 0,5 sa., 1 sa. ve 2 sa. olarak farklılaştırılmıştır.

Sensör hazırlama aşamasında, aptamer immobilizasyon süresi, bloklama süresi ve DDT ile inkübasyon süresi gibi temel parametreler sistematik olarak değiştirilerek farklı hazırlama koşulları oluşturulmuştur. Böylece, deneysel koşulların optimizasyonu sağlanarak en yüksek duyarlılık ve seçiciliği sağlayan fonksiyonel yüzey koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm sensör hazırlık koşullarına ait değişken parametreleri ait ayrıntılar Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Koşullar S(apramer bağlanma süresi – bloklama süresi-DDT ile inkübasyon süresi) şeklinde adlandırılmıştır.

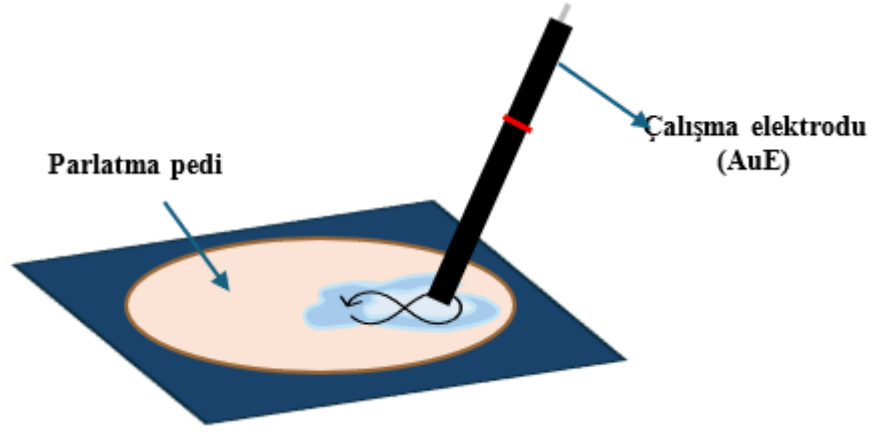
Çizelge 3.1. Sensör hazırlık koşullarına ait değişken parametreleri

Sensör Hazırlık Koşulu	Aptamer ile Bağlanma Süresi (saat)	Bloklama Süresi (saat)	DDT ile Etkileşim Süresi (saat)
S(1-1-0,5)	1	1	0,5
S(1-1-1)	1	1	1
S(1-1-2)	1	1	2
S(1-2-0,5)	1	2	0,5
S(1-2-1)	1	2	1
S(1-2-2)	1	2	2
S(2-1-0,5)	2	1	0,5
S(2-1-1)	2	1	1
S(2-1-2)	2	1	2
S(2-2-0,5)	2	2	0,5
S(2-2-1)	2	2	1
S(2-2-2)	2	2	2

Tüm çalışmalarda aynı koşullarda üç elektrot hazırlanmış, deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış ve grafiklerde üç ölçümün ortalama değerleri verilmiştir. ΔE_p , I_{pa} , R_{ct} değerleri bu 3 elektrottan elde edilen değerlerin ortalaması hesaplanarak ve standart sapma değerlerini de içerecek şekilde değerlendirilmiştir.

3.2.2. Elektrot yüzeylerinin temizliğinin yapılması

Aptamer immobilizasyonundan önce, Au elektrot sırasıyla 0,3 ve 0,05 μm boyutunda alümina süspansiyonu ile parlatılmıştır. Bu işlem için petri kabı içerisinde sabitlenmiş olan parlatma pedinin temiz bir bölgesine 100 μL UPW damlatılmış, sonrasında 0,3 μm boyutunda alümina süspansiyonundan yaklaşık 100 μL aktarılmıştır. Ardından elektrodun Au yüzeyi, damlatılan süspansiyon içerisinde, bir miktar basınç uygulayarak 20 defa 8 çizcek şekilde döndürülmüştür. Sonra 90° çevrilerek aynı işlem tekrar edilmiştir (Şekil 3.1) (Engrishi ve diğ., 2018). 4 kez parlatma yapıldıktan sonra elektrodun Au ucu UPW ile yıkanmış ve aynı uygulama 0,05 μm boyutunda alümina süspansiyonu ile, farklı bir ped üzerinde tekrarlanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma elektrotlarının elektrotların temizliği sırasındaki parlatma işlemi

Parlatma işlemi biten elektrot, önce asetonitril:2-propanol (1:1, v/v) karışımı içerisinde, sonra da UPW içerisinde 3'er dakika ultrasonik temizleme işlemine tabi tutulmuştur.

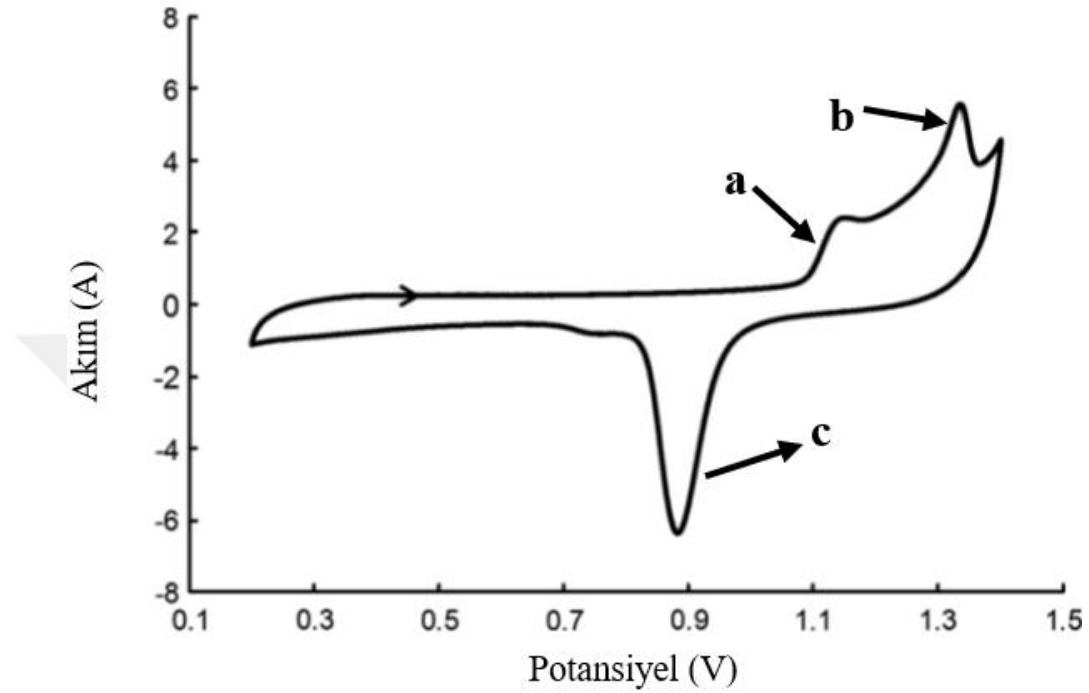
3.2.3. Elektrotların stabilizasyonu

Alümina süspansiyonuyla mekanik olarak parlatıldıktan sonra ultrasonik su banyosunda kalan kalıntıları uzaklaştırılan elektrotlar, 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi içerisinde, -0,4 V ile +1,5 V potansiyel aralığında, 0,1 V/s tarama hızı ve 0,01 V potansiyel adımı kullanılarak, 15 döngü boyunca CV tekniğiyle elektrokimyasal olarak temizlenmiştir. Bu süreçte 1,13 V ve 1,33 V potansiyellerinde gözlemlenen anot pikleri, Au yüzeyinde meydana gelen oksidasyon olaylarına işaret ederken; ters tarama esnasında 0,89 V potansiyelinde ortaya çıkan katodik pik, daha önce oluşan Au oksit türlerinin indirgenmesini yansıtmaktadır (Hezard ve diğ., 2012).

CV ile elde edilen voltammogramlarda görülen, elektrot yüzeyine özgü ve “parmak izi” niteliği taşıyan karakteristik piklerin literatürde belirtilen potansiyel konumlarında gözlemlenmesi hedeflenmiştir (Wang ve diğ., 2013). Voltammogramlarda anomali oluşturan piklerin saptanması ya da Au'a özgü piklerin standart aralıklar dışında görülmesi üzerine, yüzeyde kalıntı ihtimali değerlendirilmiş ve elektrokimyasal temizlik aşaması tekrarlanmıştır. Böylece, Au ile ilişkili piklerin uygun potansiyel değerlerine gelmesi sağlanmıştır. Her deney öncesinde, elektrot yüzeyinin yeterli şekilde temizlenip temizlenmediğini doğrulamak amacıyla H_2SO_4 ortamında elde edilen voltammogramlar

incelenmiş ve grafiklerin literatürle uyumluluğu teyit edildikten sonra çalışmalara geçilmiştir.

Tüm Au elektrotlarda, dönüşümlü voltammogramı üzerinde de Au'a özgü pikler belirgin şekilde gözlemlendikten sonra çalışmalara başlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Altın yüzeylerinin H_2SO_4 içerisinde CV tekniğiyle elektrokimyasal olarak temizlenmesi sonrasında elde edilmesi gereken anodik (a ve b) ile katodik pikler (c) (Hezard ve diğ., 2012)

UPW ve PBS ile temizlenen AuE'lerin CV ve EIS diyagramları alınarak başlangıç koşulları oluşturulmuştur. Bu aşamada elde edilen elektrokimyasal ölçüm sonuçları, başlangıçta Au elektrodun kaplanmamış durumunu temsil edecek şekilde "Blank" olarak adlandırılmıştır. Sonrasında UPW ve PBS ile yıkanan elektrotlar ile aptamer kaplama aşamasına geçilmiştir.

3.2.4. Elektrot yüzeylerinin aptamer ile kaplanması

Elektrokimyasal temizliği yapılmış ve modifikasyona başlanmamış AuE'lerin, CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Ardından elektrotlar UPW ve PBS ile yıkandıktan sonra elektrotların yüzeylerine aptamer kaplanması için, daha önce hazırlanıp derin dondurucuda saklanan $10 \mu M$ aptamer çözeltisinden $5 \mu L$ Au yüzeyine damlatılmış ve üzeri beherle kapatılarak, belirlenen süre boyunca sarsıntısız bir ortamda bekletilmiştir (Şekil 3.3). Tiyohexsillenmiş aptamerlerin bu bekleme süresinde Au yüzeylerle yüksek

afiniteleri sayesinde güçlü kovalent bağlar oluşturarak molekülün yüzeye stabil şekilde tutunması amaçlanmıştır (Herne ve diğ., 1997).



Şekil 3.3. SH-Aptamerin Au uçlarına bağlanması amacıyla, inkübasyona bırakılan çalışma elektrotları

Elektrot yüzeyinin kurummasını engellemek ve düzgün aptamer dağılımının sağlanması amacıyla, her 45 dakikada bir 2,5 μL aptamer çözeltisi elektrot yüzeyine damlatılarak inkübasyona devam edilmiştir (Bizinti ve diğ., 2025).

İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından elektrotların altın yüzeyleri PBS ve FF çözeltisi ile dikkatlice yıkanmış, bunu takiben CV ve EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada elde edilen elektrokimyasal ölçüm sonuçları, aptamer immobilizasyonunu temsil edecek şekilde “APT” olarak adlandırılmıştır.

3.2.5. Elektrot yüzeylerinin bloklanması

AuE yüzeyindeki aktif olmayan bölgelerin kapatılması ve hedef analit olan DDT’nin yalnızca aptamer aracılığıyla spesifik etkileşim göstermesinin sağlanması amacıyla gerçekleştirilen bloklama aşamasında, elektrot yüzeyinde yağ bileşenlerinin tabaka oluşturarak analitik performansı olumsuz etkilemesini azaltmak için bloklama ajanı olarak yağsız süt tercih edilmiştir. Literatürde 6-merkapto-1-heksanol ve sığır serum albümini gibi çeşitli bloklayıcı ajanların kullanıldığı bilinmekle birlikte, yağsız süt de etkili bir bloklama matriksi olarak rapor edilmiştir (Shen ve diğ., 2012; Villalonga ve diğ., 2022).

Daha önce eppendorf tüplerinde derin dondurucuda saklanan ticari yağsız süt, deney günü derin dondurucudan çıkarılarak 20°C sıcaklıkta çözöldükten sonra bloklama işlemi için kullanılmıştır. Bu işlem için elektrotların Au uçları saf su ve PBS ile

yıkandıktan sonra, üzerine 5 μL süt damlatılmış ve üzeri beherle kapatılarak sarsıntısız bir ortamda, belirlenen süre boyunca bekletilmiştir (Şekil 3.4). Süre sonunda, elektrotların Au uçları PBS ve FF ile yıkanarak CV ve EIS ölçümleri alınmış ve bu aşamada elde edilen elektrokimyasal ölçüm sonuçları, bloklama aşamasını temsil edecek şekilde “Blokla” olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 3.4. Yağsız süt ile Au uçları kapatılmasının amaçlandığı bloklama işlemi için inkübasyona bırakılan çalışma elektrotları

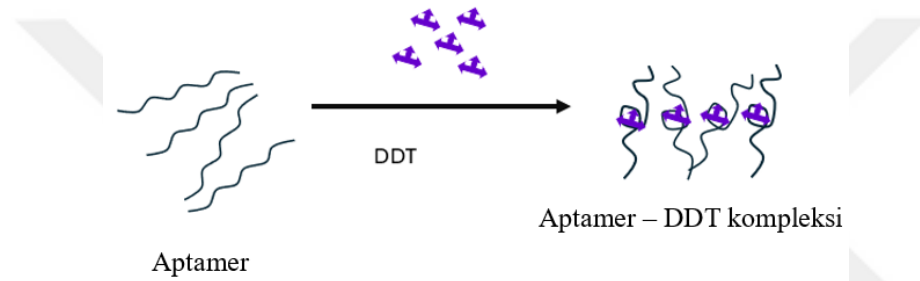
Bu işlem sonucunda, altın yüzeye $-\text{SH}$ grubu üzerinden bağlanmış aptamer tabakası ile bloklama işlemi sayesinde kaplanarak etkileşime kapatılmış açık Au bölgelerinden oluşan yüzey yapısı elde edilmiştir. Böylece elektrotlar, DDT’nin özgül olarak bağlanmasına ve güvenilir elektrokimyasal ölçümlerin yapılmasına uygun hâle getirilmiştir (Yousef ve diğ., 2022).

3.2.6. Elektrot yüzeylerinin DDT çözeltisi ile inkübasyonu

Bloklama işleminden sonra, elektrotların Au uçları UPW ve PBS ile yıkanmıştır. DDT içeren süt çözeltisinden 5 μL , elektrotların Au yüzeylerine damlatılmıştır. Üzeri beherle kapatılarak, sarsıntısız bir ortamda belirlenen süre boyunca bekletilmiştir. Bu aşamada, 5’ ucunda bulunan $-\text{SH}$ grubu aracılığıyla altın yüzeye immobilize edilen ve DDT moleküllerine yüksek afinite gösteren aptamerlerin, hedef analit olan DDT’yi özgün şekilde bağlaması beklenmiştir. Süre sonunda, elektrotların Au yüzeyleri PBS ve FF ile

yıkanmış ve CV ile EIS ölçümleri alınmıştır. Bu aşamada elde edilen elektrokimyasal ölçüm sonuçları, elektrotların inkübasyonu için hazırlanmış olan sütlerin DDT konsantrasyonlarını temsil edecek şekilde “5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 ya da 80 μg DDT/kg süt” olacak şekilde adlandırılmıştır.

Zhang ve diğ. (2020), DDT için aptamer hazırlanması üzerine yaptıkları çalışmada, aptamerlerin yapı değiştiren-SELEX protokolü ile izole edildiği ve aptamerlerin hedef molekül ile bağlanırken yapı-değiştiren bir özellik sergilemek üzere tasarlandığı belirtilmiştir. Aptamerler o,p'-DDT hedefi ile bağlandığında üç boyutlu yapısında bir değişim meydana geldiğini (Şekil 3.5) ve bu konformasyonel değişimin floresans şiddetindeki artış üzerinden tespit edilebildiğini göstermişlerdir.

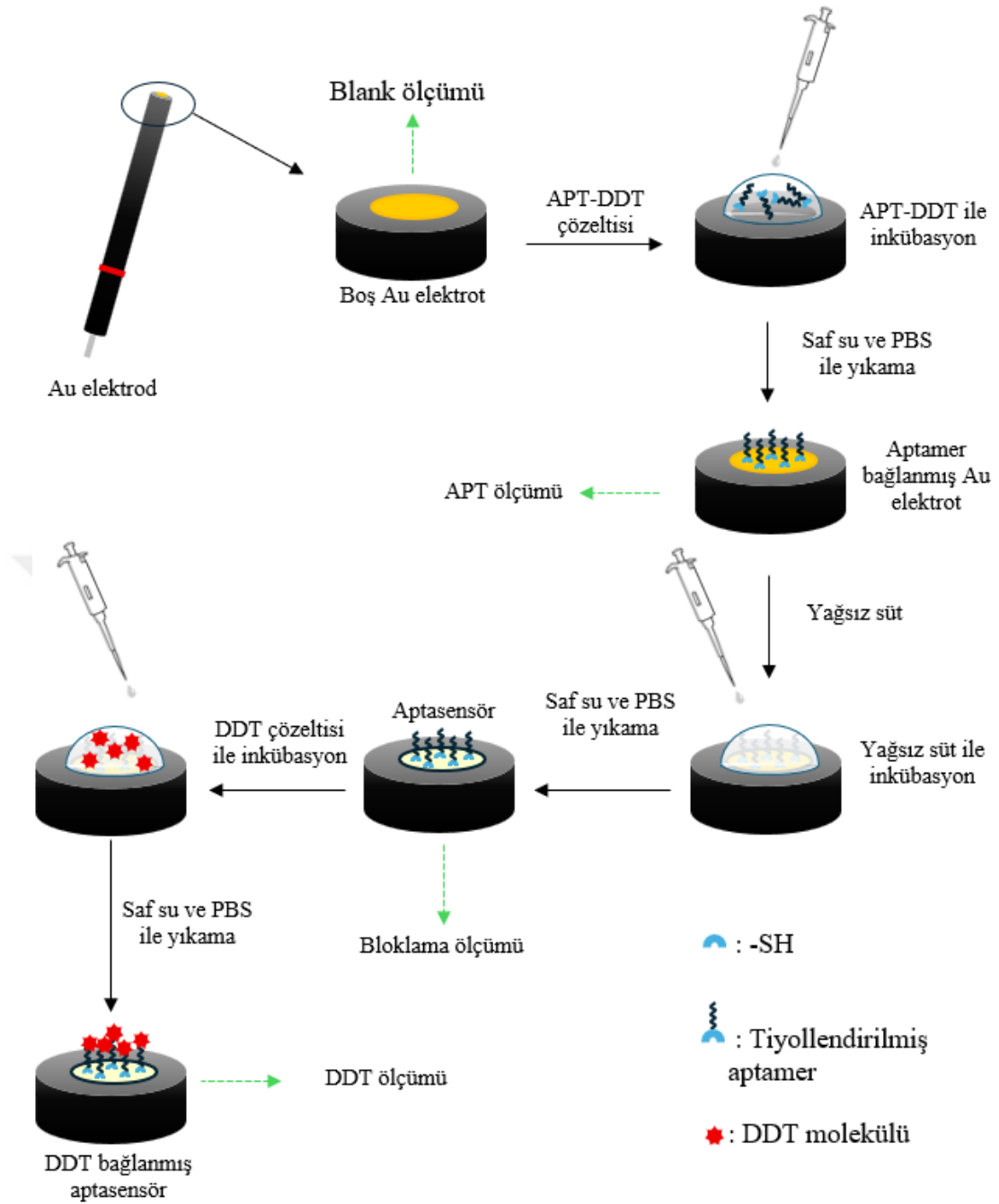


Şekil 3.5. Aptamerlerin DDT ile reaksiyona girmesi sırasında 3 boyutlu yapısının değişimi

En düşük DDT konsantrasyonuna sahip süt ile ölçümler alındıktan sonra CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Ardından elektrotların Au yüzeyleri UPW ve PBS ile yıkanmıştır. Devamında derişim arttırılarak aynı işlemler yapılmıştır.

APT-1 aptameri ile çalışırken alınan EIS ölçümleri sonrası belirlenen R_{ct} değerleri ile hazırlanan kalibrasyon grafikleri incelendiğinde, sensör ölçümünde lineer sonuç alınan DDT konsantrasyon aralığının, çalışılan konsantrasyonlardan (15, 30, 40, 60, 80 μg DDT/kg süt) düşük olduğu belirlenmiştir. Performansı en iyi olarak belirlenmiş koşul için aynı deneyler, daha düşük konsantrasyonlarda DDT içerecek şekilde tekrar edilmiştir. Böylece R_{ct} değerinin doğrusal artış gösterdiği bölgenin daha hassas analiz edilmesi sağlanmıştır. Bu amaçla DDT konsantrasyonu 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 μg DDT/kg süt olacak şekilde ayarlanan süt örnekleri kullanılarak sensörden empedans ölçümleri alınmıştır. APT-2 ve APT-3 ile de bu konsantrasyonlarla çalışılmıştır.

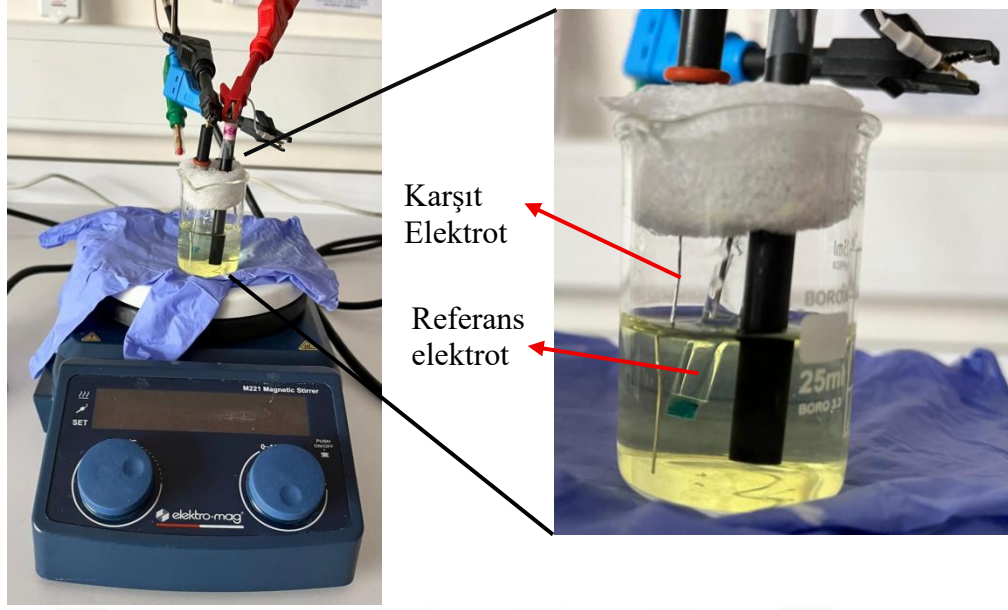
Sensörün hazırlanma sürecine ait tüm basamaklar Şekil 3.6’da şematize edilmiştir.



Şekil 3.6. Empedimetrik aptasensörlerin hazırlanması ve örnek ölçümlerinin yapılması adımları

3.2.7. Hazırlanan sensörlerin performans analizleri

Aptamerin elektrot üzerindeki düzenlenme ve bağlanma süreçlerini doğrulamak için CV ve EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Au elektrotlardan CV ve EIS ölçümü için elektrokimyasal hücre

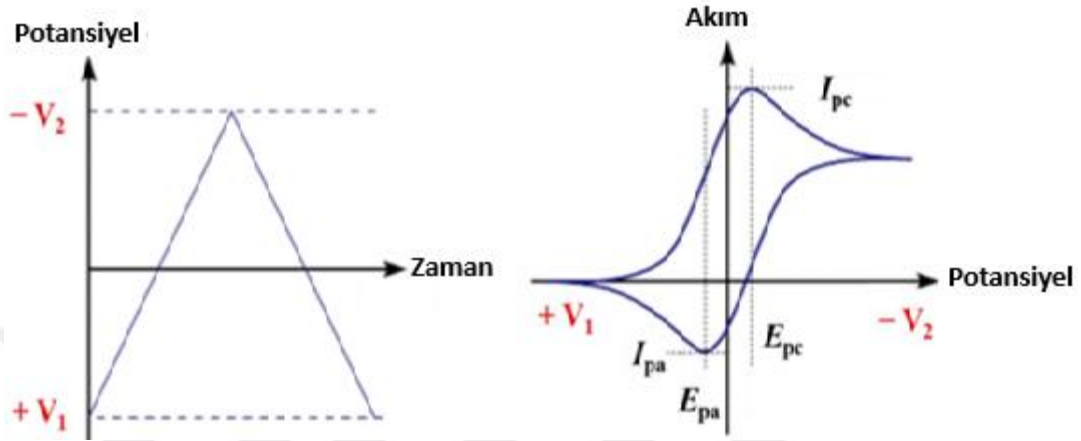
Au yüzeyleri stabil hale getirildikten sonra aptamer kaplanan, bloklama yapılan ve ardından DDT çözeltisi ile inkübe edilen elektrotlar, elektrokimyasal hücreye yerleştirilerek (Şekil 3.7) her adımda dönüşümlü voltammogramları ve EIS spektrumları alınmıştır. Her adımdaki dönüşümlü voltammogramları karşılaştırılmıştır. EIS grafikleri ise devre oluşturma amacıyla fit edildikten sonra kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması için kullanılmıştır.

Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında, aptasensörün DDT'ye verdiği yanıt; bloklama adımından sonra ölçülen R_{ct} değeri ile DDT varlığında inkübasyon sonrasında elde edilen R_{ct} değeri arasındaki fark esas alınarak hesaplanmıştır.

3.2.7.1. CV tekniği ile elektrokimyasal performans değerlendirmesi

Au elektrotların elektrokimyasal performansları, yapılan her yüzey modifikasyonu sonrası ve DDT ile aptamer bağlanma aşamalarından sonra CV tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bu kapsamda AuE'ler 2 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks probu içerisinde 50 mV/s tarama hızında test edilmiştir. Her elektroda ait anodik ve katodik akım değerleri benzer başlangıç özelliklerine sahip olacak şekilde çalışmaya başlanmıştır. Çalışmanın devamında alınan dönüşümlü voltammogramlarının anodik akım değerlerindeki değişimler konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek elektron transferi dolayısıyla elektrokimyasal performansları hakkında değerlendirme yapılmıştır.

Dönüşümlü voltammogramlarda anodik tepe akımı (I_p) değerleri, elektrot-çözeltide gerçekleşen redoks süreçlerinin kinetik ve termodinamik özelliklerini değerlendirmek için temel parametrelerdir (Şekil 3.8). Her biri sensör performansı ve elektron transfer davranışı hakkında önemli bilgiler sağlar. (Caglayan ve diğ., 2022).



Şekil 3.8. Döngüsel voltametrinin üçgen dalga formundaki potansiyel profili: (A) Zamanın bir fonksiyonu olarak voltaj, (B) dönüşümlü voltametrinin bir fonksiyonu olarak akım

ΔE_p değeri reaksiyonun tersinirlik düzeyi, elektron transfer hızı ve sensörün modifikasyonunun etkisi gibi parametreler hakkında bilgi verir. ΔE_p 'nin artması, sistemin ideal tersinirlikten uzaklaştığını ve elektron transfer kinetiğinin yavaşladığını göstermektedir. Bu davranış, elektrot yüzeyinde bir bariyer oluşması, yüzeyin modifiye edilmesi veya moleküler adsorpsiyon gibi süreçlerin elektron transferini sınırlamasının tipik bir göstergesidir (Wang, 2014).

I_p , elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks sürecine katılan elektrokimyasal olarak aktif türlerin miktarını ve elektron transfer hızını yansıtan temel bir parametredir. Analit konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, difüzyon veya yüzey kontrollü süreçler kapsamında elektrotla ulaşan redoks türlerinin sayısı arttığından, I_p değerinde buna paralel bir değişim gözlenmektedir. Bu bağlamda I_p , sistemin analit konsantrasyonuna verdiği elektrokimyasal yanıtı nicel olarak ifade etmektedir (Bard ve Faulkner, 2001).

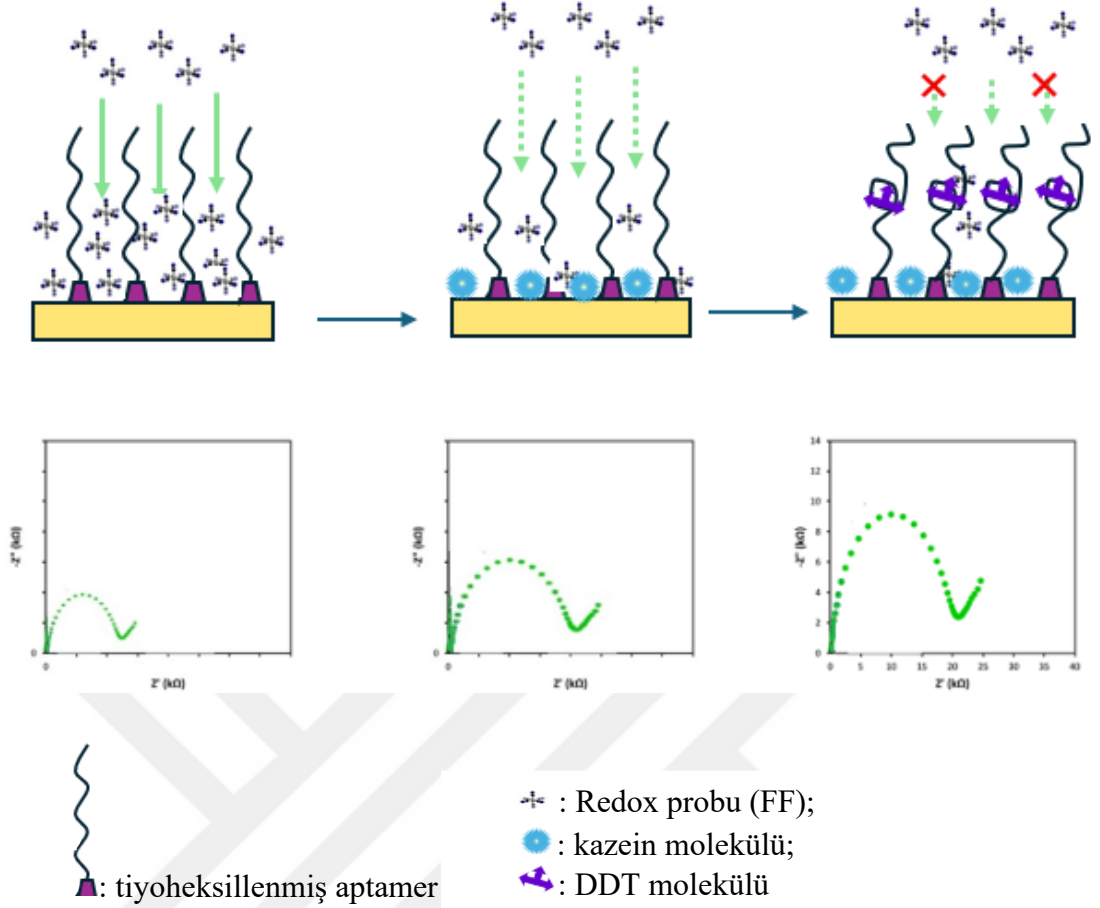
Döngüsel voltametri tekniğinde, bir redoks çiftine ait oksidasyon ve indirgenme süreçleri sırasında gözlenen maksimum akım değerleri sırasıyla anodik pik akımı (I_{pa}) ve katodik pik akımı (I_{pc}) olarak tanımlanır. I_{pa} , potansiyelin pozitif yönde taranması sırasında elektroaktif türün oksidasyonu sonucu oluşan maksimum akımdır. I_{pc} ise potansiyelin ters yönde taranması sırasında oksitlenmiş türün indirgenmesi sonucu oluşan

minimum (negatif yöndeki) akımdır (Aristov ve Habekost, 2015). Aptamer immobilizasyonu ve hedef analit (örneğin DDT) bağlanması sonrası elektrot yüzeyinde elektron transfer direnci artar, redoks probunun elektrota erişimi kısıtlanır. Bunun sonucu olarak I_{pa} ve I_{pc} değerlerinde düşüş gözlenir. Bu pik akımları, elektrot yüzeyindeki elektron transfer kinetiği, elektroaktif türün derişimi, difüzyon katsayısı ve elektrot yüzey özellikleri hakkında doğrudan bilgi verir. Ferri/ferrosiyanür çifti, elektrot yüzeyinde çok hızlı elektron alışverişi yapar. Bu nedenle denge, CV taraması sırasında kolayca sağlanır. $[Fe(CN)_6]^{-4}/[Fe(CN)_6]^{-3}$ redoks çifti, hızlı elektron transfer kinetiği nedeniyle elektrokimyasal çalışmalarda yaygın olarak tersinir bir sistem olarak kabul edilmekte ve elektrot yüzey modifikasyonlarının değerlendirilmesinde prob olarak kullanılmaktadır. Tersinir sistemlerde de $I_{pa} \sim I_{pc}$ benzerliği sağlanır (Bard ve Faulkner, 2001).

Öte yandan, elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen aptamer immobilizasyonu ve bloklaya gibi yüzey modifikasyonları, elektrot-çözelti arayüzünde ek bir bariyer oluşturarak elektron transferini kısmen sınırlandırmaktadır. Bu durum, redoks probunun elektrot yüzeyine erişiminin azalmasına ve dolayısıyla I_p değerinde düşüşe neden olmaktadır. Dolayısıyla I_p 'de gözlenen değişimler, hem analit bağlanmasına bağlı yüzeydeki yapısal değişimleri hem de yüzey modifikasyonlarının elektron transferi üzerindeki sınırlayıcı etkisini yansıtan önemli bir gösterge olarak değerlendirilmektedir. Reaksiyon ne kadar kolay gerçekleşiyorsa, I_p o kadar yüksek olur. Yüzey kaplandığında ise yük transferinin zorlaşmasından kaynaklı olarak I_p nin azaldığı gözlenir (Kissinger ve Heineman, 1983).

3.2.7.2. EIS kullanılarak aptasensörün elektrokimyasal performansının değerlendirilmesi

Aptamerin negatif yüklü fosfat omurgasının, negatif yüklü $[Fe(CN)_6]^{-3/4}$ redoks probu ile elektrostatik itme etkileşimi oluşturması, elektrot-çözelti arayüzündeki elektron transferini sınırlandırmakta ve yük transfer direncinin (R_{ct}) artmasına neden olmaktadır (Katz ve Willner, 2003, Lisdat ve diğ., 2008, Ricci ve diğ., 2007). Elektrot yüzeyinin süt proteini olan kazein ile bloke edilmesinden sonra, modifiye edilmemiş elektrot bölgelerinin doldurulmasına bağlı olarak R_{ct} değeri daha da artmıştır. Son olarak, farklı konsantrasyonlarda DDT içeren çözeltiler aptasensöre ilave edildiğinde, sterik engelleme nedeniyle R_{ct} değerinde belirgin bir artış gözlenmiştir (Lasia, 2014) (Şekil 3.9).

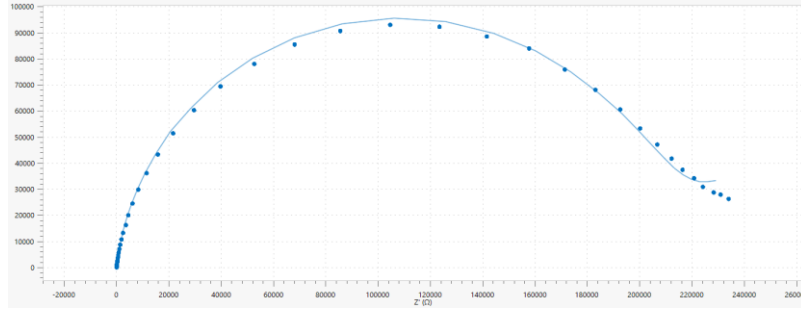


Şekil 3.9. Au elektrodun kaplama aşamalarında oluşan dirençlerin EIS grafiklerine etkisi

3.2.7.3. EIS grafiklerinin analiz edilmesi ve devrelerin oluşturulması

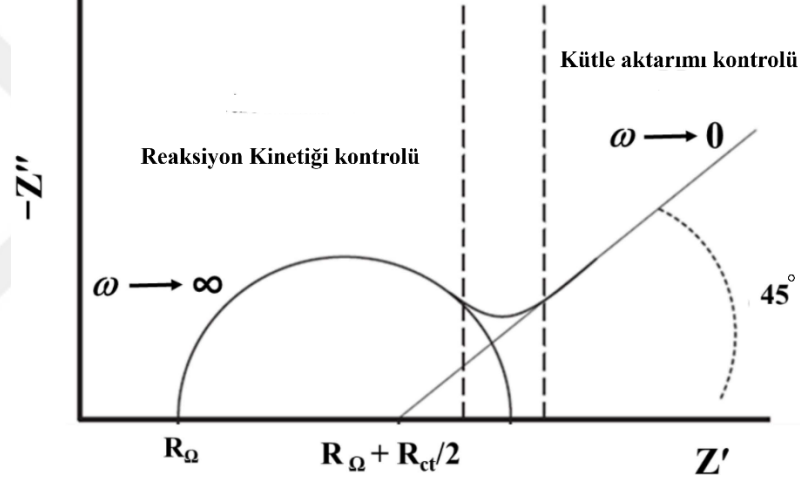
EIS verileri, NOVA 2.1.7 arayüz yazılımı kullanılarak uygun eşdeğer devre modeli ile uyumlandırılmıştır (Şekil 3.10). Nyquist ve Bode verileri üzerinden Randles ve türevleri gibi modeller kullanılarak R_s , R_{ct} , Cdl/CPE ve Warburg parametreleri hesaplanabilir. Uyum işlemleri sayesinde deneysel veriler değerlendirilebilir.

NOVA 2.1.7 yazılımında EIS verilerinin modellenmesi, sistematik adımlarla gerçekleştirilir. Nyquist diyagramı içeren veri seti seçildikten sonra, hazır eşdeğer devre şablonlarıyla deneysel verilerle uyum sağlanır. Deneysel verilerle devre modelinin tam bir uyum yakalamak için ise, basit direnç (R), kapasitans (C) ve endüktans (L) içeren eşdeğer devreler kullanılabileceği gibi; sabit faz elemanı (CPE) gibi dağıtılmış elemanlar veya kütle transfer empedansı ve gözenekli yapı modelleri gibi analitik olarak tanımlanmış daha karmaşık elemanlar da modele dâhil edilebilir (Lasia, 2014).



Şekil 3.10. Nyquist diyagramı ile uyumlandırılan bir EIS ölçümü

Elektrot işlemi hem yük transferi hem de difüzyon tarafından birlikte kontrol edildiğinde, Nyquist diyagramı iki karakteristik bölgeden oluşur: yüksek frekansta görülen bir yarım çember ve düşük frekansta ortaya çıkan 45 derecelik bir doğru bölgesi, (Şekil 3.11).

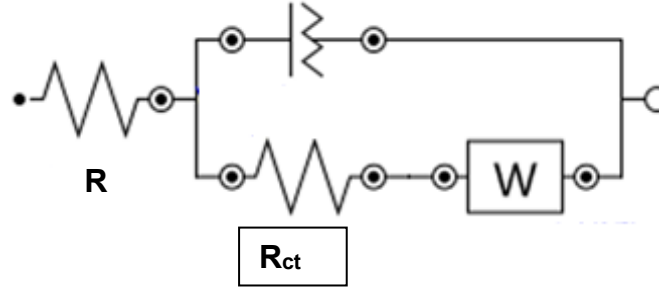


Şekil 3.11 Basit bir eşdeğer devre modali için Nyquist diyagramı (Bard ve Faulkner, 2001).

Yüksek frekans bölgesindeki yarım çember, elektrot reaksiyonunun kinetiğini yani yük transfer sürecini temsil ederken; düşük frekanstaki doğru difüzyonla sınırlı kütle aktarımını göstermektedir (Zhang, 2020)

EIS ölçümleri kullanılarak Ohmik direnç, yük transfer direnci, elektrot ara yüzeyinin çift tabaka kapasitansı ve difüzyon katsayısı ile ilişkili çeşitli parametreler belirlenebilir. Bu nedenle EIS tekniği, elektrot reaksiyonlarının kinetik davranışını incelemek için yaygın olarak tercih edilmektedir.

Nyquist diyagramları, ölçüm verileriyle en iyi uyumu sağlayan devre modelinin $[R(Q[RW])]$ yapısında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen tüm empedans verileri, bu eşdeğer devre modeline göre analiz edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Nyquist Ölçümler sonunda elde edilen EIS grafiklerine uyum sağlayan devre dizilimi [R(Q[RW])]

Bu modelde:

- R, çözeltinin iç direncini (R_s),
- Q, elektrot-çözelti arayüzündeki ideal olmayan çift katman kapasitansını,
- W kütle transferine bağlı olarak gözlenen difüzyon direncini ifade eden

Warburg empedansını temsil etmektedir (Vadhva ve diğ., 2021).

- R_{ct} ise yük transfer direnci olarak, elektrot yüzeyindeki elektron transfer reaksiyonlarının kinetiğine ilişkin doğrudan bilgi sağlamaktadır.

[R(Q[RW])] eşdeğer devre modeli kullanılarak elde edilen R_{ct} değerlerine dayanarak, çeşitli DDT konsantrasyonları için kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Bu grafikler, numunedeki DDT miktarına bağlı olarak yük transfer direncindeki değişimleri ve buna bağlı olarak elektrot cevabındaki farklılıkları ortaya koymuştur.

Literatürde belirtildiği üzere, elektrot yüzeyine moleküllerin (örneğin DDT) bağlanması, yük transferi için fiziksel bir engel oluşturarak R_{ct} değerinin artmasına neden olmaktadır (Qiao ve diğ., 2008). Elektrot yüzeyine bağlanan DDT miktarı arttıkça, bu direnç de artmakta ve bu durum Nyquist eğrisinde yarım çember çapının belirgin şekilde büyümesiyle kendini göstermektedir.

3.2.7.4. R_{ct} değerlerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında elde edilen EIS verilerinden çizdirilen Nyquist eğrileri, uygun eşdeğer devre modelleri ile uyumlandırılmış ve bu devrelerden R_{ct} değerleri hesaplanmıştır. Analit ile etkileşim sonucunda çözelti/elektrot ara yüzeyinde meydana gelen elektron transfer hızlarındaki değişimleri değerlendirebilmek amacıyla, DDT ile çalışmaya başlanmadan önceki son modifikasyon basamağı olan bloklama aşamasında elde edilen R_{ct} değeri referans alınmıştır.

Analit derişiminin nicelendirilmesi için, hedef molekül DDT ile inkübasyon öncesi ve sonrası empedans ölçümleri arasındaki farktan hesaplanan empedans değişimi (ΔR_{ct}) kullanılmıştır. Bu kapsamda, her bir analiz için bloklaya aşamasında elde edilen R_{ct} değeri sıfır kabul edilmiş; DDT ile inkübasyon sonrasında elde edilen ΔR_{ct} değerleri, değerlendirme kolaylığı sağlamak amacıyla R_{ct} olarak ifade edilmiştir.

Modifiye edilmiş aptamer yüzeylerine DDT moleküllerinin bağlanma miktarının artmasına bağlı olarak, elektrot yüzeyinde elektron transferinin kısmen engellendiği ve buna paralel olarak R_{ct} değerlerinde artış meydana geldiği beklenmektedir. Bu durum, aptamer–analit etkileşimi sonucunda elektrot/çözelti ara yüzeyindeki yük transfer direncinin artmasıyla açıklanmaktadır (Wang ve diğ., 2014).

DDT çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak, bloklaya aşamasına göre elektrot yüzeyinde meydana gelen R_{ct} değişimleri grafiğe aktarılmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Her bir deney koşulu için üç farklı AuE kullanılmış; tüm ölçümler bu elektrotlardan elde edilen değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, standart sapma değerleri ile birlikte grafiklerde sunulmuştur.

DDT konsantrasyonlarına karşı çizdirilen R_{ct} değerleri, uygun bağlanma izotermi kullanarak eğri uyumlandırma (fitting) işlemine tabi tutulmuştur. Bu uyumlandırmalar sonucunda dissosiyasyon sabiti (K_d) değerleri hesaplanmış; elde edilen K_d değerleri üzerinden aptamer–DDT kompleksinin afinitesi ve kararlılığı değerlendirilmiştir. Ayrıca primerli ve primersiz aptamerlerin bağlanma özellikleri, hesaplanan K_d değerleri karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

3.2.7.5. R_{ct} değerlerinden kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Sensörün düşük konsantrasyonlardaki DDT'yi tespit etme performansını değerlendirmek amacıyla tespit sınırı (LOD) ve kantitatif ölçüm sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalarda bloklaya aşamasından elde edilen standart sapma ile kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılmıştır.

Analitik metotlarda yaygın olarak kabul edilen yaklaşıma göre LOD, sinyal-gürültü oranının 3,3 katına karşılık gelen konsantrasyon olarak tanımlanır ve aşağıdaki denklem ile hesaplanır (Armbruster ve Pry, 2008):

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{\text{eğim}} \quad (4.1)$$

Benzer şekilde LOQ, analitin güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde nicel olarak belirlenmesi için gerekli minimum konsantrasyonu ifade eder ve sinyal-gürültü oranının 10 katı üzerinden hesaplanır:

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{\text{eğim}} \quad (4.2)$$

Kalibrasyon eğrisinde doğrusal ilişkinin korunduğu en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar dikkate alınarak tayin aralığı belirlenmiştir.

3.2.7.6. I_{pa} değerlerinden kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen CV ölçümlerinden anodik pik akımı (I_{pa}) değerleri belirlenmiştir. alınan ölçümlerin bloklama ile arasındaki fark hesaplanarak ΔI_{pa} olarak verilmiş ve her bir konsantrasyon için ΔI_{pa} değerleri belirlenmiştir. Hesaplanan ΔI_{pa} değerleri, ilgili DDT konsantrasyonlarına karşı çizilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Regresyon analizi ile doğrusal aralık ve korelasyon katsayıları hesaplanmış, ölçümler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Bu grafiklerden k_d değerlerine ulaşılmıştır.

LOD değerinin daha net bir şekilde belirlenebilmesi amacıyla, log [CDDT] değerlerine karşı hesaplanan ΔI_{pa} sonuçları grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen bu grafikten, en düşük DDT konsantrasyonuna ait sinyallerin standart sapması gürültü (σ) olarak kabul edilmiş ve LOD değeri, %95 güven aralığında $3,3\sigma/\text{eğim}$ hesaplama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.8. Girişim etkisinin incelenmesi

Bu aşamada, DDT molekülü ile benzer yapısal özelliklere sahip olan ve OCP'ler sınıfında yer alan çeşitli analitler (atrazin, aldrin, dieldrin ve β -endosülfan) kullanılarak girişim deneyleri gerçekleştirilmiştir. Girişim deneylerinde, DDT varlığının tespiti için en uygun performansı gösterdiği belirlenen aptasensör kullanılmış ve bu koşullar altında üretilen sensörler tercih edilmiştir.

Deneyler kapsamında, 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda atrazin, aldrin, dieldrin ve β -endosülfan içeren süt numuneleri, DDT'nin yasal limiti olan 40 $\mu\text{g/kg}$ süt

konsantrasyonuna eşitlenecek şekilde seyreltilmiştir. Ardından, 3 ayrı AuE yüzeyine aptamer çözeltisi damlatılarak belirlenen süre boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Aptamer immobilizasyonunun ardından, yüzey kaplamasının gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Kaplamanın başarıyla gerçekleştiğinin teyit edilmesinin ardından elektrot yüzeyleri PBS ve UPW ile yıkanmış ve bloklama aşamasına geçilmiştir. Bloklama işlemi için yağsız süt çözeltisi elektrot yüzeyine damlatılarak inkübe edilmiştir. Bloklama sonrasında alınan CV ve EIS ölçümleri ile yüzeyin etkin bir şekilde bloke edildiği doğrulanmıştır.

Son aşamada, girişim deneyleri hazırlanan sensörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, girişim deneyi için hazırlanan OCP çözeltileri AuE yüzeylerine damlatılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından alınan CV ve EIS ölçümlerindeki değişimler değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda OCP'lerin girişim etkileri yorumlanmıştır.

3.2.9. Ticari süt ve süt ürünü örneklerinde DDT tayini

DDT miktarının belirlenmesi amacıyla, çalışma kapsamında optimize edilen koşullar altında hazırlanan sensör ile piyasada satılan ticari süt ve süt ürünü örneklerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, marketten temin edilen yarım yağlı UHT süt örneklerinin yanı sıra, süt ürünü olarak kefir ve yoğurt örnekleri de değerlendirmeye alınmıştır.

Her bir örnek türü uygun şekilde hazırlanarak sensör üzerine uygulanmış ve geliştirilen aptasensörün gerçek matrislerdeki performansı incelenmiştir. Böylece hem ticari ürünlerde olası DDT kalıntılarının varlığı araştırılmış hem de sensörün karmaşık gıda matrislerindeki uygulanabilirliği değerlendirilmiştir.

Bu analizler, sensörün yalnızca standart çözeltilerde değil, gerçek süt ve süt ürünü örneklerinde de ölçüm yapabilme potansiyelini ortaya koymuş ve geliştirilen elektrotların pratik kullanım açısından uygunluğunu desteklemiştir.

3.2.10. Elektrotların raf ömrü testleri

APT-2 ile üretilen aptasensörün kısa dönem raf ömrünü değerlendirmek amacıyla, 3 farklı AuE kullanılmış ve APT-2 için optimum koşul olan S(2-2-1) ile modifiye edilerek aptasensörler üretilmiştir. Aptasensör üretimi yapıldıktan hemen sonra 40 µg DDT/kg süt

örneğinden ΔR_{ct} değerleri ve ΔI_{pa} değerleri ölçülmüş ve başlangıç değeri (0. Gün) olarak belirlenmiştir. Sensörler oda sıcaklığında 7 ve 15 gün süreyle depolanmış ve süre bitiminde yine 40 μg DDT/kg süt çözeltisi ile ölçümler alınmıştır. Bu ölçümlerden elde edilen ΔR_{ct} ve ΔI_{pa} değerlerinin 0. güne göre yüzde olarak değer kayıpları, sensörün raf ömrü boyunca elektrot performansındaki azalma olarak değerlendirilmiştir.

3.2.11. Elektrotların tekrarlanabilirlik testleri

Geliştirilen aptasensörlerin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, belirlenen en uygun elektrot hazırlama koşulları ile üretilen elektrotlar üzerinde 15'er kez ardışık ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, sabit koşullar altında 40 μg DDT/kg süt konsantrasyonunda hazırlanmış DDT çözeltisi kullanılarak elektrotlardan art arda elektrokimyasal ölçümleri alınmıştır. Ardışık ölçümler sonucunda elde edilen sinyal yanıtları karşılaştırılarak, ölçüm cevaplarında zamana bağlı bir düşüş ya da belirgin bir sapma olup olmadığı incelenmiştir.

3.2.12 Elektrotların yüzey karakterizasyonu

Üretilen elektrotların yüzey karakterizasyonlarının yapılabilmesi amacıyla, buhar biriktirme yöntemiyle ITO altlık üzerine ince film şeklinde kaplanmış temsili altın yüzeyler hazırlanmış ve elektrot üretiminde uygulanan kaplama adımları benzer şekilde tekrarlanmıştır. Bu kapsamda dört farklı yüzey koşulu incelenmiştir:

1. Kaplama yapılmamış (çıplak) altın yüzey,
2. Aptamer ile inkübasyon sonrası altın yüzey,
3. Aptamer bağlanmasını takiben yağsız süt ile bloklama uygulanmış yüzey,
4. Bloklama sonrası 80 μg DDT/kg süt örneği ile inkübasyona tutulmuş yüzey.

Bu dört aşamaya ait yüzeyler AFM ve temas açısı ölçümleri ile analiz edilerek, altın yüzeyindeki modifikasyon adımlarının her birinin yüzey morfolojisi ve yüzey ıslanabilirliği üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.13. Hesaplamalı moleküler modellemenin yürütülmesi

Hesaplamalı moleküler modellemenin yürütülmesi, hedef molekül ile biyomoleküler yapı arasındaki etkileşimlerin atomik düzeyde incelenmesini mümkün kılan *in silico* yaklaşımları kapsamaktadır. Bu çalışmada, moleküllerin üç boyutlu yapıları oluşturulmuş, enerji minimizasyonları gerçekleştirilmiş ve bağlanma eğilimlerini ortaya koymak amacıyla moleküler kenetlenme (docking) analizleri yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar, deneysel verilerin yorumlanmasına ve sensör tasarımının rasyonel olarak desteklenmesine katkı sağlamaktadır.

3.2.13.1. ssDNA aptamerin üç boyutlu yapısının tahmini

Çalışmada kullanılan tek iplikli DNA (ssDNA) aptamerin üç boyutlu (3B) yapısı, AlphaFold Server (AlphaFold 3) kullanılarak tahmin edilmiştir. Aptamer sekansı FASTA formatında sunucuya yüklenmiş ve nükleik asit modu seçilerek yapı tahmini gerçekleştirilmiştir. AlphaFold çıktıları arasından en yüksek güven skoruna (confidence score) sahip model, sonraki moleküler docking çalışmalarında kullanılmıştır.

Elde edilen 3B yapı, UCSF ChimeraX yazılımı kullanılarak görselleştirilmiş, yapısal bütünlüğü kontrol edilmiş ve gerekli durumlarda hidrojen atomları eklenmiştir. Yapı daha sonra AutoDock uyumlu olacak şekilde PDB formatında kaydedilmiştir.

3.2.13.2. Hedef ve girişimci moleküllerin hazırlanması

Hedef analit olarak DDT, girişimci moleküller olarak ise atrazin, aldrin, dieldrin ve β -endosülfan seçilmiştir. Bu pestisitlerin 3B yapıları PubChem veritabanından SDF formatında temin edilmiş ve UCSF ChimeraX kullanılarak enerji minimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Minimizasyon sonrası tüm ligand yapıları, AMDock arayüzü üzerinden AutoDock formatına (PDBQT) dönüştürülmüştür. Ligandlar için Gasteiger yükleri atanmış ve dönebilir (rotatable) bağlar tanımlanmıştır.

3.2.13.3. Moleküler kenetleme çalışmaları (AutoDock4 – AMDock)

Moleküler kenetleme simülasyonları, AutoDock4 motoru kullanılarak AMDock grafik arayüzü üzerinden gerçekleştirilmiştir. Aptamer yapısı reseptör olarak tanımlanmış ve grid kutusu, aptamerin potansiyel bağlanma bölgelerini kapsayacak şekilde otomatik olarak ayarlanmıştır. Kenetleme parametreleri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

Algoritma: Lamarckian Genetic Algorithm (LGA)

Bağımsız docking koşusu sayısı: 100

Popülasyon büyüklüğü: 150

Maksimum enerji değerlendirmesi: 2.500.000

Grid çözünürlüğü: 0.375 Å

Her bir hedef ve girişimci molekül için moleküler kenetlenme işlemi ayrı ayrı yürütülmüştür.

3.2.13.4. İlk beş pozun (top-5 poses) seçilmesi ve metriklerin ekstraksiyonu

Her kenetleme çalışması sonucunda elde edilen çıktı dosyalarından (DLG), en düşük bağlanma enerjisine sahip ilk beş poz (Top-5 poses) seçilmiştir. Bu pozlar için aşağıdaki metrikler kaydedilmiştir:

Bağlanma serbest enerjisi (ΔG , kcal/mol)

Tahmini inhibisyon sabiti (K_i)

Van der Waals + hidrojen bağı + desolvasyon enerjisi

Elektrostatik enerji

Toplam intermoleküler enerji

Bu veriler her bir ligand–aptamer çifti için ayrı ayrı çıkarılmış ve bir veri matrisi oluşturulmuştur.

3.2.13.5. Çok değişkenli veri analizi (PCA)

Moleküler kenetleme çalışmaları sonucunda elde edilen metrikler kullanılarak Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA) gerçekleştirilmiştir. PCA analizi, hedef molekül (DDT) ile girişimci pestisitler arasındaki bağlanma davranışlarının istatistiksel olarak ayrıştırılmasını ve seçiciliğin görsel olarak değerlendirilmesini amaçlamıştır.

Her bir ligand için elde edilen ilk beş pozun metrikleri, aynı renk ve sembol grubunda temsil edilerek PCA uzayına projekte edilmiştir. Analiz sonucunda, DDT'nin girişimci moleküllerden PCA skor uzayında belirgin şekilde ayrıştığı gözlenmiş, bu durum aptamerin hedef moleküle karşı seçiciliğini destekler nitelikte değerlendirilmiştir.

3.2.13.6. Hesaplamalı seçiciliğin değerlendirilmesi

PCA sonuçları, moleküler yerleştirme verileriyle birlikte yorumlanarak, aptamerin DDT'ye olan bağlanma afinitesinin ve bağlanma modlarının girişimci pestisitlerden istatistiksel olarak farklı olduğu gösterilmiştir. Bu hesaplamalı seçicilik analizi, deneysel sensör performansını destekleyici bir ön kanıt olarak değerlendirilmiştir.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

DDT tespitine yönelik olarak literatürde SELEX çalışmaları ile elde edilmiş olan aptamerin primerli formu kullanılarak çalışmalara başlanmıştır. APT-1 olarak adlandırılan bu ilk aptamer, 80 baz uzunluğunda olup 5' ucundan tiyollendirilmiştir. Aptamerin nükleotid dizisi 5'-SH-(CH₂)₆-TCCAG CACTC CACGC ATAAC GAAGA CATGC CCGCC AATGG ATGTT GTTGG ACCTG TTTGA GTTAT GCGTG CGACG GTGAA-3' şeklindedir. Ardından, aynı aptamerin primer dizileri çıkarılmış, daha kısa baz uzunluğuna sahip primersiz formu ile çalışmalara devam edilmiştir. APT-2 olarak adlandırılan bu aptamer, 5' ucundan modifiye edilmiş olup 5'-SH-(CH₂)₆-GAAGA CATGC CCGCC AATGG ATGTT GTTGG ACCTG TTTGA-3' nükleotid dizisine sahiptir. Bu aşamada, primer dizilerinin sensör performansı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Bu aptamerlerle gerçekleştirilen deneysel çalışmaların ardından *in silico* analizlere geçilmiştir. Bu kapsamda, aptasensör üretiminde kullanılan aptamer dizileri ile literatürde kaynak olarak alınan çalışmada rapor edilen aptamerler karşılaştırılmış; yapısal açıdan istatistiksel olarak anlamlı benzerliği en yüksek olan aptamer belirlenmiştir. Seçilen aptamer, laboratuvar ortamında elektrokimyasal teknikler kullanılarak test edilmiş ve elde edilen deneysel sonuçlar, *in silico* çalışmaların deneysel doğrulaması kapsamında değerlendirilmiştir. Seçilen aptamer, APT-3 olarak adlandırılmış olup 40 baz uzunluğundadır. APT-3, nükleotid dizisi 5'-SH-(CH₂)₆-GAATT GTGCT CAATG CGCCC CTGCA GTGAA TGTGG AATTT-3' şeklindedir.

4.1. APT-1 Aptameri ile Yapılan Çalışmalar

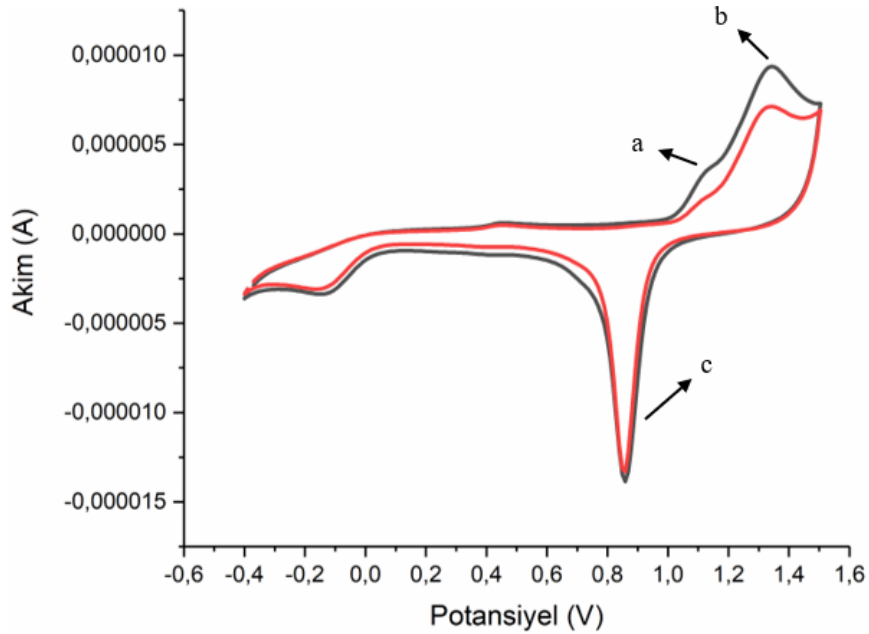
Sensör hazırlık sürecinde, aptamer immobilizasyon süresi, bloklama süresi ve DDT ile inkübasyon süresi gibi temel parametreler sistematik olarak optimize edilmek üzere farklı değerlerde incelenmiş ve çeşitli hazırlama koşulları oluşturulmuştur. Aptamer immobilizasyonu için 1 ve 2 saat, bloklama aşaması için 1 ve 2 saat, DDT ile inkübasyon süresi için ise 30 dakika (0,5 saat), 1 saat ve 2 saat süreleri seçilmiştir. Hazırlama koşulları, S(aptamer immobilizasyon süresi – bloklama süresi – DDT ile inkübasyon süresi) formatında adlandırılmıştır. Bu yaklaşım ile aptamerin elektrot yüzeyine etkin şekilde immobilizasyonu, bloklama işlemiyle açık altın yüzeylerin kapatılması ve

aptamer ile DDT arasındaki bağlanma için yeterli ve uygun sürelerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4.1.1. APT-1 aptameri ile hazırlanan elektrotların stabilizasyonu

Au elektrotların temizliğini doğrulamak amacıyla H_2SO_4 ile elektrokimyasal temizlik sonrası, elde edilen voltammogramlar incelenmiş ve grafiklerin literatürle uyumluluğu teyit edildikten sonra çalışmalara geçilmiştir. APT-1 aptameri için en uygun sensör üretim koşulu olan S(2-2-1) koşulunun hazırlığı öncesinde temizlenen Au elektrota ait bir dönüşümlü voltammogramında altına özgü pikler belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 4.1).

1,13 (Şekil 4.1. a) ve 1,33 V (Şekil 4.1. a)'da gözlenen anodik pikler, altının (Au) oksidasyonu ile ilişkilendirilmiştir. İki ayrı pikin gözlenmesi, OH^- iyonlarının farklı kristalografik yüzeylere adsorpsiyonuna bağlı olarak oluşan çeşitli türde Au "oksitlerinin" meydana geldiğini ve bunun oldukça karmaşık bir adsorpsiyon mekanizmasından kaynaklandığını göstermektedir (O'Mullane ve diğ., 2009, Hezard ve diğ., 2012). Geri tarama sırasında ise 0,89 V'da gözlenen pik, daha önce oluşmuş olan oksitlerin indirgenmesine karşılık gelmektedir (O'Mullane ve diğ., 2009, Hezard ve diğ., 2012).

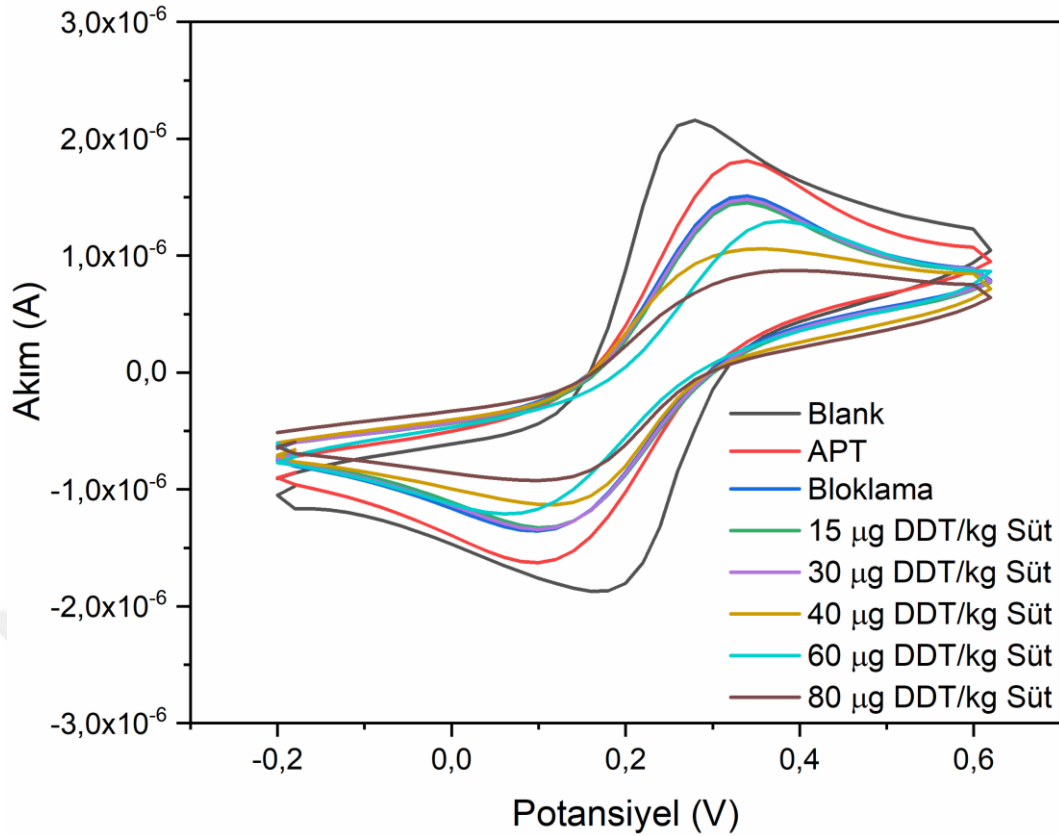


Şekil 4.1. Çalışma elektrotlarının H_2SO_4 ortamında CV tekniği ile elektrokimyasal olarak temizlenmesi sırasında alınan ilk döngü (siyah) ve son döngü (kırmızı) voltammogramlarında gözlenen anot pikleri (a ve b) ile katot piki (c)

Bu tip dönüşümlü voltammogramlarda, özellikle boş veya modifiye edilmiş altın elektrotlarda, şekilde işaretlenen a, b ve c piklerinin akım şiddetleri belirli bir eğilim gösterir. Anodik pikler, Au oksidasyonunu gösterir ve genellikle pik akımları azalır veya ilk birkaç döngüden sonra sabitlenir. Bazı durumlarda ilk 1–2 döngüde hafif bir artış görülebilir, ardından düşüş başlar. İlk taramada Au yüzeyinde Au–O ve Au–OH türleri oluşur. Bu oksit tabakası yüzeyin elektrokimyasal reaktivitesini azaltır, oksitlenmiş bölgeler bir sonraki döngüde Au oksit oluşumunu sınırlar. Katodik pikler Au oksit indirgenmesini gösterir ve tekrarlama döngüleri incelendiğinde, ilk döngüde daha yüksek akım, sonraki döngülerde azalma veya sabitlenme görülür. Ayrıca, anodik piklerle paralel bir davranış sergiler. Önceki döngülerde oluşan oksit tabakası daha ince ve daha düzenli hâle gelir. Elektrot giderek oksidasyon-redüksiyon dengesine ulaşarak stabilize olur (Bard ve Faulkner, 2001).

4.1.2. APT-1 aptameri ile hazırlanan elektrotların elektrokimyasal performanslarının değerlendirilmesi

Belirlenen elektrot üretim parametrelerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla Au elektrotlar hazırlanmıştır. Bu doğrultuda, elektrot yüzeyleri parlatılmış ve ardından H_2SO_4 ile elektrokimyasal temizlik işlemleri uygulanmış olan AuE yüzeylerine aptamer immobilizasyonu, bloklama işlemi ve farklı konsantrasyonlarda DDT içeren süt örnekleriyle belirli sürelerle temas ettirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Her işlem adımının ardından, elektrotların yüzey özelliklerini değerlendirmek amacıyla CV ve EIS ölçümleri alınarak karşılaştırmalar yapılmıştır. APT-1 ile ilk çalışılan DDT konsantrasyonları 15, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt olarak seçilmiştir. APT 1 ile yapılan çalışılan sensör koşulları arasında 2 saat aptamer kaplama, 2 saat bloklama ve 1 saat DDT ile muamele koşulu olan S(2-2-1) koşulu optimum koşul olarak belirlenmiş ve APT-1 ile yapılan diğer çalışmalarda bu koşul kullanılmıştır. Bu koşul için hazırlanan sensörün dönüşümlü voltammogramı Şekil 4.2’de verilmiştir. Tüm diğer koşullarda hazırlanan elektrotlardan alınan CV grafikleri ise EK-1’de verilmiştir.



Şekil 4.2. APT-1 aptameri ile S(2-2-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 4.2’de S(2-2-1) koşulunda hazırlanan elektrotların farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,26 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 120 mV, I_{pa} ise 2,29 μA olarak belirlenmiştir.

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redoks çifti, hızlı elektron transfer kinetiğine sahip olması nedeniyle elektrokimyasal çalışmalarda yaygın olarak tersinir bir sistem olarak kabul edilmektedir. Tersinir sistemlerde, anodik ve katodik pik akımları arasında $I_{pa} \approx I_{pc}$ olacak şekilde bir benzerlik beklenir. Bu çalışmada da elde edilen CV sonuçlarında I_{pa} ve I_{pc} değerlerinin birbirine eşit veya çok yakın olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, sonuçların değerlendirilmesinde karşılaştırma parametresi olarak yalnızca I_{pa} değerleri kullanılmıştır.

Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,30 V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,16 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri

2,16 μA 'e düşerken ΔE_p 140 mV'a çıkmıştır. Aptamer tabakasının yük transferini kısmen engellenmesi ile ΔE_p değerinde APT ile muamele sonrası artış gözlemlenmiştir. Bloklama sırasında modifiye edilmemiş elektrot bölgelerinin yağız süt ile bloke edilmesi ise I_{pa} 'nin daha da azalmasına (1,90 μA) ve ΔE_p 'nin 160 mV'a yükselmesine neden olmuştur ki bu durum bloklama ajanının yüzeyi kaplayarak redoks prosesini daha fazla sınırlandırdığını doğrulamaktadır.

15, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt inkübasyonları için anodik pikler sırasıyla 0,36; 0,36; 0,38; 0,42 ve 0,44 V olarak belirlenmiştir. Katodik pikler için ise bu değerler 0,10; 0,06; 0,06; 0,08 ve 0,04 V olarak voltammogram değerlerinden okunmuştur. ΔE_p değerleri sırasıyla 260, 300, 320, 340 ve 400 mV olarak hesaplanmış. I_{pa} değerleri ise sırasıyla 1,56 μA ; 1,35 μA ; 1,15 μA ; 1,10 μA ve 0,97 μA olarak belirlenmiştir.

Teorik olarak hedef analit konsantrasyonunun artmasıyla birlikte elektrot yüzeyinde meydana gelen biyomoleküler blokajın artması, dönüşümlü voltammogramlarda anodik pik akımının (I_{pa}) azalmasına ve anodik-katodik pik potansiyelleri arasındaki farkın (ΔE_p) artmasına yol açmaktadır (Bard ve Faulkner, 2001). Ancak genel olarak değerlendirildiğinde, DDT konsantrasyonu ile I_{pa} ve ΔE_p parametreleri arasında beklenen doğrusal ve tutarlı ilişkinin, yalnızca S(2-1-2) ve S(2-2-1) sensör hazırlama koşullarında belirgin olarak gözlemlendiği, diğer koşullarda ise bu ilişkinin net bir şekilde ortaya konulamadığı görülmektedir.

Artan DDT konsantrasyonu ile CV ölçümlerinde I_{pa} değerinde beklenen azalmanın ve ΔE_p 'de beklenen artışın gözlenmemesi, aptamer-DDT etkileşiminin elektron transfer kinetiği üzerinde sınırlayıcı bir bariyer oluşturmaması ile ilişkilendirilebilir. Bu durumda, DDT moleküllerinin aptamer-modifiye elektrot yüzeyine bağlanması sonucunda elektrot-çözelti arayüzünde oluşan biyomoleküler tabakanın, redoks probunun elektrot yüzeyine erişimini anlamlı ölçüde kısıtlamadığı ve dolayısıyla elektron transferinin önemli ölçüde engellenmediği söylenebilir.

Bununla birlikte, bazı sensör hazırlama koşullarında I_{pa} 'da beklenen azalmanın gözlenmemesi; yüzey doygunluğu, sterik engellenme ve DDT–aptamer etkileşiminin heterojenliği gibi çeşitli faktörlerle de açıklanabilir. Aptamerlerin elektrot yüzeyine immobilizasyon yoğunluğu ve yüzey üzerindeki düzenlenme biçimi, sensör performansını doğrudan etkileyen kritik parametreler arasında yer almaktadır. Aptamerlerin yüzeyi homojen ve yeterli düzeyde kaplamaması durumunda, hedef analit için erişilebilir bağlanma bölgelerinin sayısı azalmakta ve yüzey doygunluğu sınırlı kalmaktadır (Steel ve diğ., 1998). Öte yandan, aşırı veya düzensiz aptamer

immobilizasyonu, sterik engellenmeye yol açarak DDT moleküllerinin yüzeye etkin bir şekilde bağlanmasını zorlaştırabilmektedir.

Ayrıca, aptamerlerin elektrot yüzeyi üzerindeki konformasyonel farklılıkları ve yönelimlerindeki heterojenlik, elektrottan elektroda değişkenliğe neden olmakta ve bu durum ölçüm sonuçlarında artan standart sapmalar şeklinde kendini göstermektedir. Bunun yanında, bazı durumlarda aptamerin hedef bağlanması sonrasında konformasyonel olarak daha düzenli bir yapı kazanması, elektron transferine daha elverişli bir arayüz oluşturabilmekte; buna ek olarak DDT'nin hidrofobik karakteri nedeniyle elektrot yüzeyinde non-spesifik adsorpsiyon göstermesi, CV yanıtlarının beklenen teorik davranıştan sapmasına neden olabilmektedir.

Bu çalışmada bazı sensör hazırlama koşullarında teorik olarak beklenen CV davranışının gözlenememesi, yalnızca aptamer-DDT etkileşiminin doğasına değil; elektrot yüzey hazırlığı, aptamer immobilizasyonu, inkübasyon ve yıkama adımları ile ölçüm parametrelerinin hassasiyetine bağlı deneysel faktörlere de atfedilebilir. Bu durum, aptasensör performansının yüzey kimyasına son derece duyarlı olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır.

4.1.2.2. APT-1 ile hazırlanan elektrotlardan elde edilen E_p değerleri

APT-1 ile Au elektrotlara ait başlangıç ΔE_p değerleri kontrol edilmiştir. ΔE_p değeri, anodik (oksidasyon) tepe potansiyeli olan E_{pa} ile katodik (indirgenme) tepe potansiyeli olan E_{pc} değerlerinin farkı yani bu iki tepe noktası arasındaki farkı ifade etmektedir.

Belirlenen en uygun sensör üretim koşulu, kaplanma ile beraber elektron transferine karşı oluşturduğu direnci artan ya da diğer bir ifade ile her aşama sırasında ΔE_p değerinde artış olan ve bunun da görece kademeli olduğu S(2-1-2) ve S(2-2-1) koşullarıyla hazırlanan elektrotlar olabileceği öngörülmüştür. Tüm koşula ait dönüşümlü voltammogramlarından elde edilen ΔE_p değerleri Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. APT-1 çalışma sonuçlarından elde edilen ΔE_p değerleri ve standart sapmaları (mV)

Ölçüm Aşaması	S(1-1-0,5)	S(1-1-1)	S(1-1-2)	S(1-2-0,5)	S(1-2-1)	S(1-2-2)
Blank	140 ± 20	140 ± 12	140 ± 10	120 ± 8	100 ± 4	100 ± 2
APT	120 ± 60	260 ± 26	180 ± 12	160 ± 12	140 ± 6	140 ± 6
Bloklama	380 ± 62	200 ± 42	220 ± 8	220 ± 16	240 ± 12	280 ± 24
15	380 ± 42	320 ± 68	220 ± 14	320 ± 14	280 ± 14	260 ± 46
30	400 ± 44	200 ± 82	220 ± 56	300 ± 44	280 ± 20	240 ± 58
40	400 ± 36	240 ± 44	240 ± 23	440 ± 52	320 ± 23	260 ± 22
60	380 ± 62	220 ± 54	240 ± 48	440 ± 68	340 ± 20	280 ± 44
80	520 ± 84	200 ± 48	260 ± 38	580 ± 36	340 ± 32	340 ± 38

Ölçüm	S(2-1-0,5)	S(2-1-1)	S(2-1-2)	S(2-2-0,5)	S(2-2-1)	S(2-2-2)
Blank	140 ± 5	120 ± 3	100 ± 3	140 ± 12	120 ± 9	120 ± 3
APT	140 ± 22	160 ± 12	160 ± 8	280 ± 24	140 ± 11	240 ± 9
Bloklama	160 ± 14	200 ± 16	180 ± 12	280 ± 30	160 ± 12	240 ± 19
15	160 ± 26	300 ± 43	200 ± 18	280 ± 41	260 ± 14	240 ± 26
30	160 ± 38	320 ± 36	280 ± 19	280 ± 48	300 ± 20	240 ± 38
40	260 ± 16	320 ± 32	320 ± 14	300 ± 26	320 ± 18	240 ± 28
60	260 ± 39	340 ± 26	360 ± 22	320 ± 37	340 ± 26	320 ± 31
80	260 ± 41	360 ± 30	400 ± 39	320 ± 55	400 ± 29	300 ± 34

4.1.2.3. APT-1 ile hazırlanan elektrotlardan elde edilen I_{pa} değerleri

APT-1 ile Au elektrotlara ait başlangıç I_{pa} değerleri kontrol edilmiş ve sensör üretim ve deneme koşullarındaki her adım için bu değer karşılaştırılmıştır.

Belirlenen en uygun sensör üretim koşulu, kaplanma ile beraber redoks probunun akımının azaldığı bunun da görece kademeli olduğu S(2-2-1) koşullarıyla hazırlanan elektrotlar olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca, ölçüm aşamalarındaki düşük standart sapma değerleri ve düzenli akım düşüşleri, sensörün yüksek tekrarlanabilirlik ve güçlü bir lineer korelasyona sahip olduğunu doğrulamaktadır. Sonuç olarak, geliştirilen bu aptasensör mimarisi, hedef molekülün tayini için güvenilir ve hassas bir analitik platform sunmaktadır. Tüm koşuluna ait dönüşümlü voltammogramlarından elde edilen I_{pa} değerleri Çizelge 4.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. APT-1 çalışma sonuçlarından elde edilen I_{pa} değerleri ve standart sapmaları (μA)

Ölçüm Aşaması	S(1-1-0,5)	S(1-1-1)	S(1-1-2)	S(1-2-0,5)	S(1-2-1)	S(1-2-2)
Blank	2,29 ± 0,01	2,24 ± 0,02	2,27 ± 0,03	2,41 ± 0,01	2,44 ± 0,08	2,12 ± 0,09
APT	2,15 ± 0,02	2,19 ± 0,03	1,59 ± 0,04	2,15 ± 0,01	1,59 ± 0,06	1,79 ± 0,02
Bloklama	1,97 ± 0,02	1,56 ± 0,03	1,56 ± 0,01	1,52 ± 0,02	1,38 ± 0,04	1,62 ± 0,02
15	1,97 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,53 ± 0,02	1,38 ± 0,03	1,17 ± 0,03	1,55 ± 0,03
30	1,95 ± 0,03	1,35 ± 0,03	1,52 ± 0,04	1,29 ± 0,04	1,14 ± 0,04	1,52 ± 0,03
40	1,95 ± 0,04	1,31 ± 0,02	1,46 ± 0,04	1,25 ± 0,04	1,25 ± 0,04	1,48 ± 0,04
60	1,55 ± 0,06	1,16 ± 0,05	1,44 ± 0,04	1,24 ± 0,05	1,24 ± 0,05	1,21 ± 0,06
80	1,25 ± 0,04	1,14 ± 0,05	0,87 ± 0,03	1,05 ± 0,05	0,87 ± 0,06	1,00 ± 0,04

Ölçüm Aşaması	S(2-1-0,5)	S(2-1-1)	S(2-1-2)	S(2-2-0,5)	S(2-2-1)	S(2-2-2)
Blank	2,12 ± 0,06	2,38 ± 0,02	2,41 ± 0,08	2,32 ± 0,01	2,48 ± 0,03	2,16 ± 0,05
APT	1,76 ± 0,03	1,59 ± 0,03	1,77 ± 0,03	2,08 ± 0,02	2,16 ± 0,02	1,81 ± 0,07
Bloklama	1,61 ± 0,02	1,21 ± 0,02	1,57 ± 0,02	1,78 ± 0,02	1,9 ± 0,01	1,51 ± 0,02
15	1,62 ± 0,03	1,08 ± 0,03	1,31 ± 0,03	1,42 ± 0,07	1,56 ± 0,03	1,45 ± 0,03
30	1,59 ± 0,04	1,09 ± 0,04	1,22 ± 0,05	1,42 ± 0,03	1,35 ± 0,01	1,48 ± 0,03
40	1,54 ± 0,04	1,04 ± 0,04	1,09 ± 0,04	1,33 ± 0,04	1,15 ± 0,02	1,06 ± 0,11
60	1,57 ± 0,06	1,01 ± 0,05	0,92 ± 0,04	1,3 ± 0,03	1,1 ± 0,03	1,3 ± 0,09
80	1,35 ± 0,05	1,01 ± 0,05	0,94 ± 0,06	1,32 ± 0,09	0,97 ± 0,04	1,31 ± 0,14

APT-1 aptameri kullanılarak modifiye edilen elektrotlardan elde edilen I_{pa} değerleri esas alınarak, aptamerle muamele süresi, bloklama süresi ve DDT ile inkübasyon süresinin, aptasensör yanıtı üzerindeki etkileri sistematik olarak değerlendirilmiştir.

Aptamerle muamele süresinin elektrot yüzeyinin modifikasyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde, 1 saatlik ve 2 saatlik inkübasyon süreleri arasında belirgin farklar gözlenmiştir. 1 saatlik ve 2 saatlik seriler karşılaştırıldığında, 2 saatlik inkübasyon sonrası Blank aşamasından APT aşamasına geçişteki sinyal düşüşünün daha tutarlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum, 2 saatlik muamele süresinin elektrot yüzeyinde daha homojen ve daha yoğun bir aptamer tabakasının oluşması için yeterli zamanı sağladığını göstermektedir. Bununla birlikte, 1 saatlik inkübasyonda da anlamlı bir sinyal azalmasının gözlenmesi, aptamer-yüzey etkileşiminin hızlı bir bağlanma kinetiğine sahip olduğunu ve 1 saatlik sürenin yüzey doygunluğu için gerekli eşik değeri aştığını ortaya koymaktadır.

Bloklama süresinin sinyal baskılanması üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, aptamer bağlanmamış bölgelerin kapatılmasının spesifik olmayan etkileşimleri azaltmada önemli rol oynadığı görülmüştür. Bloklama süresinin 1 saatten 2 saate tüm DDT konsantrasyonlarında ölçülen sinyal değerlerinde ilave bir azalma meydana gelmiştir. Bu

sonuçlar, uzatılmış bloklama süresinin yüzey pasivasyonunu artırarak sensör performansını iyileştirdiğini desteklemektedir.

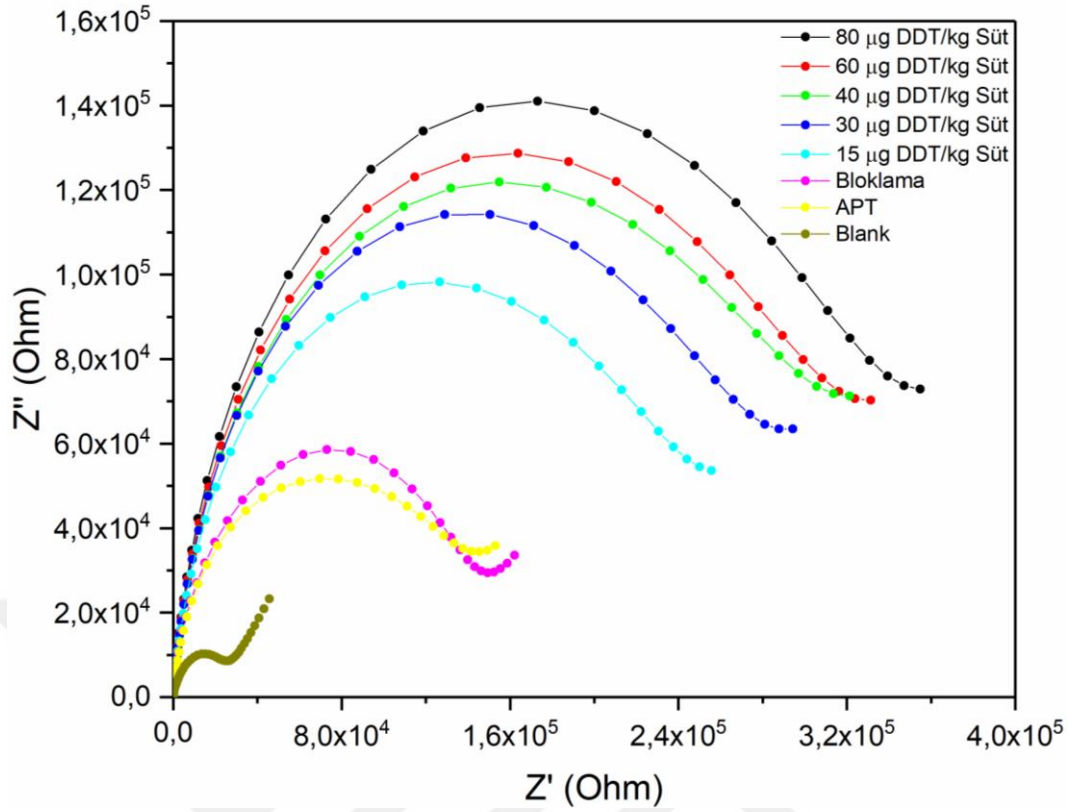
DDT konsantrasyonunun sensör yanıtı üzerindeki etkisi incelendiğinde, 15–80 µg DDT/kg süt aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak sinyal değerlerinde kademeli bir düşüş gözlenmiştir. Bu eğilim, DDT konsantrasyonu arttıkça elektrot yüzeyinde moleküler paketlenme yoğunluğunun yükseldiğini ve daha kompakt bir kendiliğinden düzenlenmiş tabaka yapısının oluştuğunu göstermektedir. En yüksek konsantrasyon olan 80 µg DDT/kg süt, S(1-1-2) ve S(2-2-1) gruplarının sırasıyla 0,87 ve 0,97 gibi en düşük sinyal değerlerine ulaşması, yüksek DDT derişiminin yüzey direncini maksimize ettiğini kanıtlamaktadır. Konsantrasyona bağlı bu düzenli düşüş, sensör yüzeyinin DDT ile modifikasyonunun doza bağımlı ve doğrusal bir korelasyon sergilediğini ve yüzey kapasitesinin 80 birime kadar doygunluğa ulaşmaya devam ettiğini göstermektedir.

S(2-1-1) koşulu ile hazırlanan elektrotların, geniş bir DDT konsantrasyon aralığında sinyal stabilitesini koruduğu ve bu kombinasyonun sensörün tekrarlanabilirliği açısından en güvenilir çalışma aralığını sunduğu belirlenmiştir.

4.1.2.4. APT-1 ile hazırlanan elektrot çalışmalarından alınan EIS grafiklerinin analiz edilmesi

Tipik bir EIS spektrumundan elde edilen Nyquist diyagramında, yüksek frekans bölgesinde gözlenen yarım daire formu elektron transferinin sınırlı olduğunu; düşük frekans bölgesindeki doğrusal kısım ise iyonların elektrot yüzeyine doğru difüzyonunu temsil etmektedir. Bu gözlemler, elektrot yüzeyindeki modifikasyonların ve DDT bağlanması elektrokimyasal davranış üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır.

Tüm yüzey modifikasyon adımlarının ardından, elektrotların elektron transfer özellikleri dönüşümlü voltrammogramlar elde edildikten sonra EIS yöntemi ile incelenmiş ve sonuçlar Nyquist diyagramları şeklinde elde edilmiştir. APT 1 ile yapılan çalışılan sensör koşulları arasında 2 saat aptamer kaplama, 2 saat bloklama ve 1 saat DDT ile muamele koşulu olan S(2-2-1) koşulu ile hazırlanan sensörün EIS Nyquist diyagramı Şekil 4.3'te verilmiştir. Tüm diğer koşullarda hazırlanan elektrotlardan alınan EIS Nyquist diyagramları ise EK-2'de verilmiştir.



Şekil 4.3. APT-1 aptameri kullanılarak S(2-2-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 4.3'te sunulan S(2-2-1) koşuluyla hazırlanmış elektrota ait EIS Nyquist grafikleri değerlendirildiğinde, 15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında bloklama aşamasına göre R_{ct} 'nin 79,2 kΩ arttığı ve daha yüksek DDT derişimlerinde bu artış eğiliminin sürdüğü görülmektedir. DDT konsantrasyonu yükseldikçe R_{ct} değerlerinde kademeli ancak giderek daha belirgin bir artış meydana gelmiş; 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için hesaplanan artışlar sırasıyla 100,1; 125,6; 138,9 ve 155,7 kΩ olarak bulunmuştur.

S(2-2-1) koşulunda gözlenen bu yüksek R_{ct} artışlarının, elektrot yüzeyinde daha yoğun aptamer immobilizasyonu veya daha verimli bağlanma bölgelerinin oluşmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durumda, yüzeyde oluşan aptamer-DDT komplekslerinin daha kompakt ve etkili bir bariyer oluşturarak elektron transferini belirgin şekilde kısıtlaması, empedanstaki artışı açıklamaktadır.

Genel olarak APT-1 ile hazırlanan elektrotların tümü değerlendirildiğinde, aptamer immobilizasyonu sonrasında elektrot yüzeyinde oluşan biyolojik tanıma tabakası ve devamındaki bloklama işlemi, yük transferine karşı belirgin bir engel oluşturarak R_{ct} değerlerinin artmasına neden olmuştur. DDT içeren süt çözeltileri ile yapılan

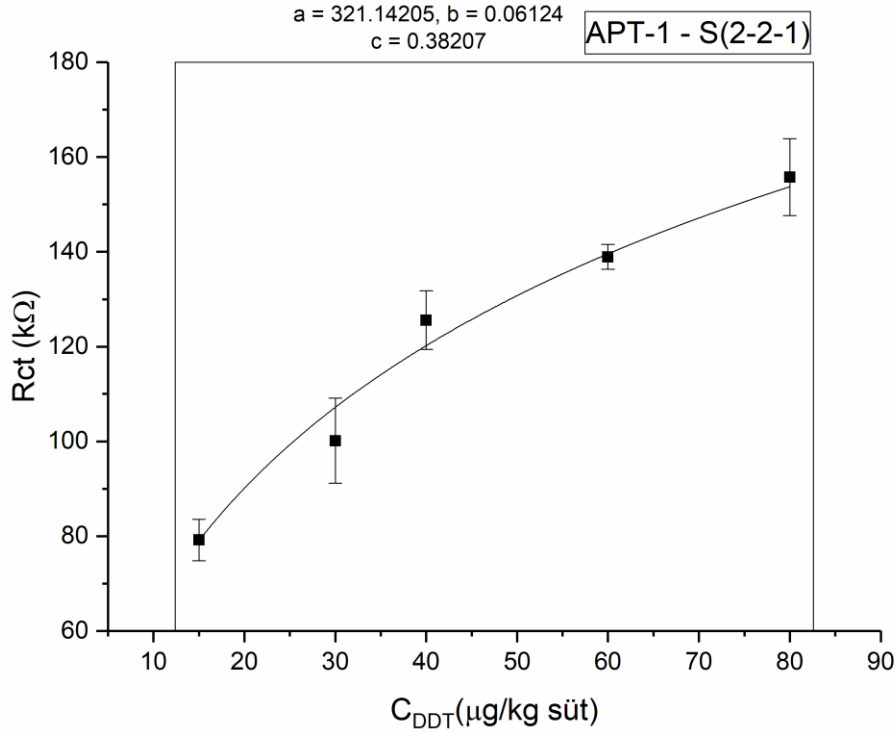
inkübasyonlarda ise, ilk düşük konsantrasyon kademesinde görülen geçici düşüşler dışında, artan DDT derişimiyle uyumlu şekilde R_{ct} 'nin yükseldiğı görölmektedir. Bu durum, aptamer–hedef etkileşiminin elektrot yüzeyindeki elektron transfer mekanizmasını etkili biçimde sınırlandırdığı, dolayısıyla aptasensörün DDT varlığına karşı duyarlı bir empedimetrik yanıt ürettiğı şeklinde yorumlanabilir.

Artan R_{ct} değerleri, DDT'nin aptamer tabakasına başarıyla bağlandığını ve bağlanma miktarındaki artışın empedans tepkisine doğrudan yansıdığını göstermektedir. Bu sonuçlar, sensörün hedef molekül konsantrasyonundaki değişimleri ayırt etme kapasitesini doğrulamakta ve aptasensörün elektrokimyasal performansının DDT tespitine uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

4.1.2.5. APT-1 ile hazırlanan elektrotlardan alınan EIS diyagramlarına uygun eşdeğer devrelerin fit edilmesi ve kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Elektrotların elektron transfer özellikleri EIS yöntemi ile değerlendirilmiş; elde edilen empedans verileri uygun eşdeğer devre modeli olan $[R(Q[RW])]$ ile fit edilerek Nyquist diyagramları ve karşılık gelen devre parametreleri elde edilmiştir. Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerleri, S(2-2-1) koşulu için kalibrasyon grafiğı oluşturulma amaçlı olarak kullanılmıştır.

Başlangıçta APT-1 aptameri ile modifiye edilen elektrotlarda R_{ct} değerlerinin DDT konsantrasyonuyla doğrusal bir ilişki göstermesi beklenmiş olsa da elde edilen ilk veriler doğrusal bir eğilimden ziyade doygunluk etkisinin belirgin olduğu, konsantrasyon arttıkça plato bölgesine yaklaşan hiperbolik bir davranışa işaret etmiştir (Şekil 4.4).

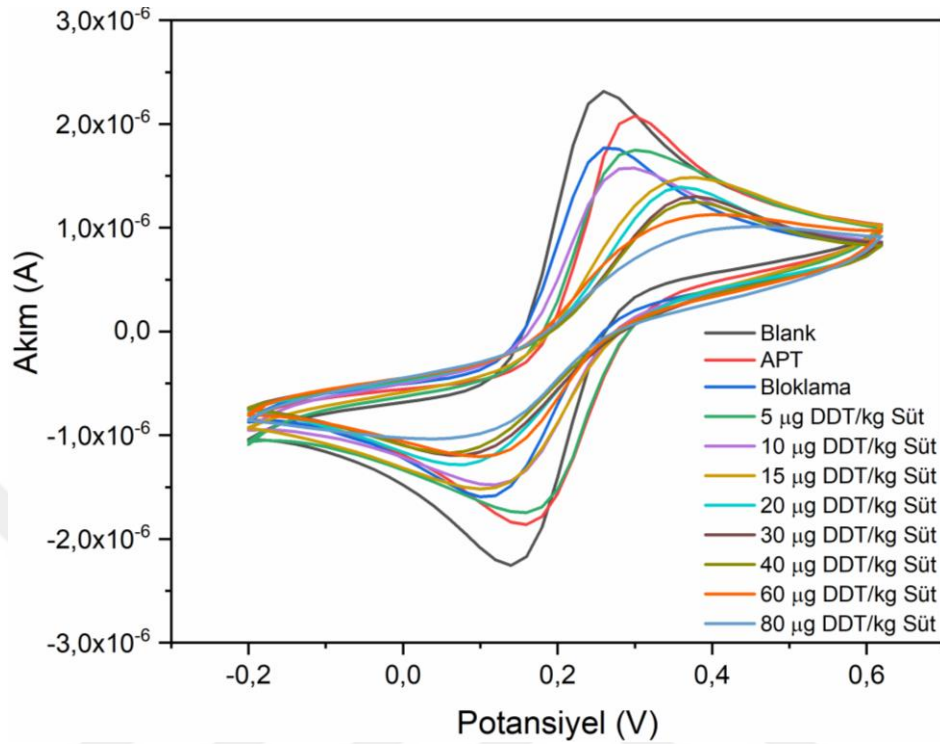


Şekil 4.4. APT-1 ile hazırlanan S(2-2-1) koşuluyla hazırlanan elektrotlardan ölçülen EIS grafiklerinden elde edilen R_{ct} değerleri

Bu gözlem doğrultusunda, birim DDT konsantrasyonu başına R_{ct} değerinde en belirgin artışı sağlayarak elektron transferini en etkili şekilde sınırladığı belirlenen; dolayısıyla daha yüksek hassasiyet sunacağı düşünülen hem CV hem de EIS verilerinde konsantrasyon artışıyla tutarlı yanıt veren elektrot yüzey modifikasyon koşulu S(2-2-1) olarak seçilmiştir.

Daha geniş bir doğrusal aralıkta bir kalibrasyon eğrisi elde edebilmek amacıyla daha önce çalışılan DDT konsantrasyonlarına ek olarak 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt konsantrasyonları hazırlanmış ve sensör S(2-2-1) koşulu altında yeniden test edilmiştir. Çalışmanın tüm aşamalarında dönüşümlü voltammogramları değerlendirilmiş; EIS ölçümlerinden elde edilen R_{ct} değerleri kullanılarak APT-1 aptameri ile S(2-2-1) koşuluna ait nihai kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

4.1.2.6. APT-1 ve S(2-2-1) koşulu ile hazırlanan elektrotların kalibrasyon amaçlı CV ve EIS analizi



Şekil 4.5. APT-1 aptameri ile kaplanan elektrotlar ile S(2-2-1) koşulunda genişletilmiş DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 4.5'te, S(2-2-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve konsantrasyonları değiştirilerek hazırlanmış farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünden itibaren tüm aşamalarda ΔE_p değerlerinde artış izlenmiştir. Anodik ve katodik pik tepe noktaları blank ölçümü için sırasıyla, 0,26 ve 0,14 V, aptamer ölçümü için 0,30 ve 0,16 V, bloklama için 0,26 ve 0,10 V olarak ölçülmüş, ΔE_p değerleri yine sırasıyla 120, 140 ve 160 mV olacak şekilde artış hesaplanmıştır. I_{pa} değerlerinin ise 2,31; 2,08 ve 1,77 μA olacak şekilde düşüş eğiliminde olduğu gözlenmiştir.

5 μg DDT/kg süt örneği ile ölçüm alındığında anodik pikpotansiyeli 0,30 V ve katodik pik potansiyeli 0,16 V olarak ölçülürken, ΔE_p 140 mV olarak hesaplanmıştır. Bu noktada gözlenen ΔE_p değerindeki beklenmeyen düşüşün, çalışılan DDT konsantrasyonunun oldukça düşük olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca, daha sonra oluşturulan kalibrasyon grafiği esas alınarak yapılan değerlendirmede, söz konusu konsantrasyon değerinin sensör için belirlenen doğrusal ölçüm aralığının da dışında kaldığı tespit edilmiştir.

10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt inkübasyonları için anodik pikler sırasıyla 0,30, 0,38, 0,36, 0,38, 0,38, 0,40 ve 0,46 V olarak belirlenmiştir. Katodik pikler için ise bu değerler 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,06, 0,10 ve 0,04 V olarak voltammogram değerlerinden okunmuştur. ΔE_p değerleri sırasıyla 180, 280, 300, 320, 340, 340 ve 420 mV olarak hesaplanmış. I_{pa} değerleri ise sırasıyla 1,58 μA ; 1,48 μA ; 1,39 μA ; 1,30 μA ; 1,25 μA ; 1,13 μA ve 1,01 μA olarak belirlenmiştir

Genel olarak değerlendirildiğinde, artan DDT konsantrasyonunun I_{pa} üzerinde kademeli ve belirgin bir azalma trendi oluşturduğu; buna karşılık ΔE_p parametresinin DDT miktarına bağlı olarak düzenli ve yaklaşık doğrusal bir artış sergilediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. APT-1 ile, S(2-2-1) çalışma koşulu ile genişletilmiş DDT konsantrasyonu örnekleri sonuçlarından elde edilen ΔE_p değerleri ve standart sapmaları

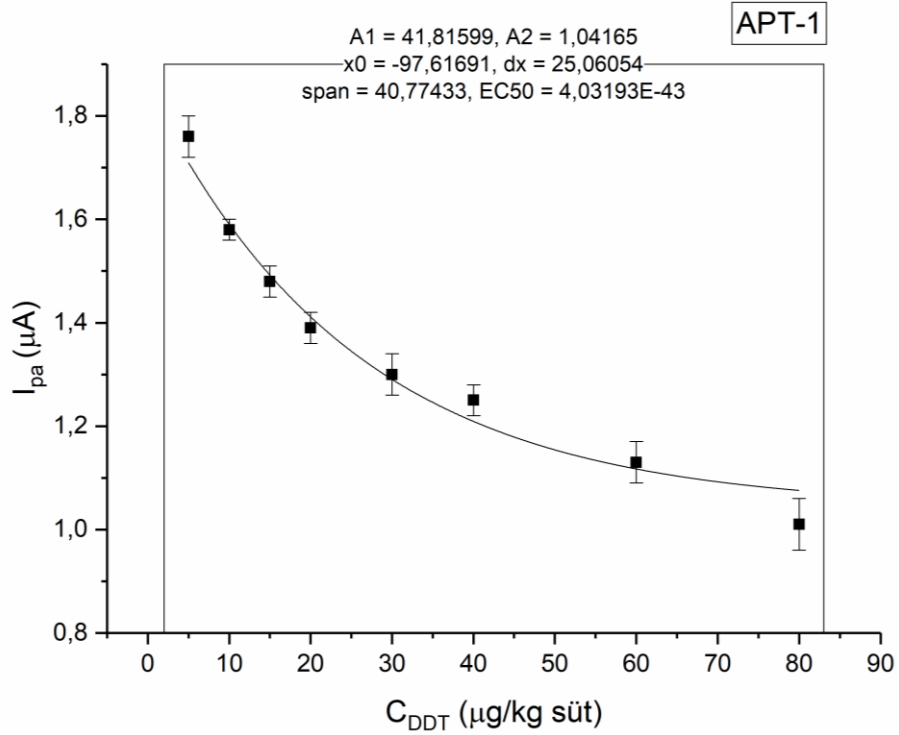
Ölçüm aşaması	ΔE_p (mV)	Ep için standart sapma (mV)
Blank	120	± 0
APT	140	± 12
Bloklama	160	0
5	140	0
10	180	± 12
15	280	± 23
20	300	± 20
30	320	± 11
40	340	± 42
60	360	± 42
80	420	± 94

S(2-2-1) koşulunda elde edilen dönüşümlü voltammogramlarından hesaplanan ΔE_p değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Elektrot yüzeyinin her bir modifikasyon basamağında kaydedilen dönüşümlü voltammogramları değerlendirildiğinde, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ redoks çiftine ait anodik ve katodik pik akımlarının her aşamada değişim gösterdiği görülmüş; bu değişime paralel olarak ΔE_p değerinin de 10 ile 80 μg DDT/kg süt konsantrasyon aralığında belirgin bir artış sergilediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. APT-1 ile, S(2-2-1) çalışma koşulu ile genişletilmiş DDT konsantrasyonu örnekleri sonuçlarından elde edilen I_{pa} değerleri ve standart sapmaları

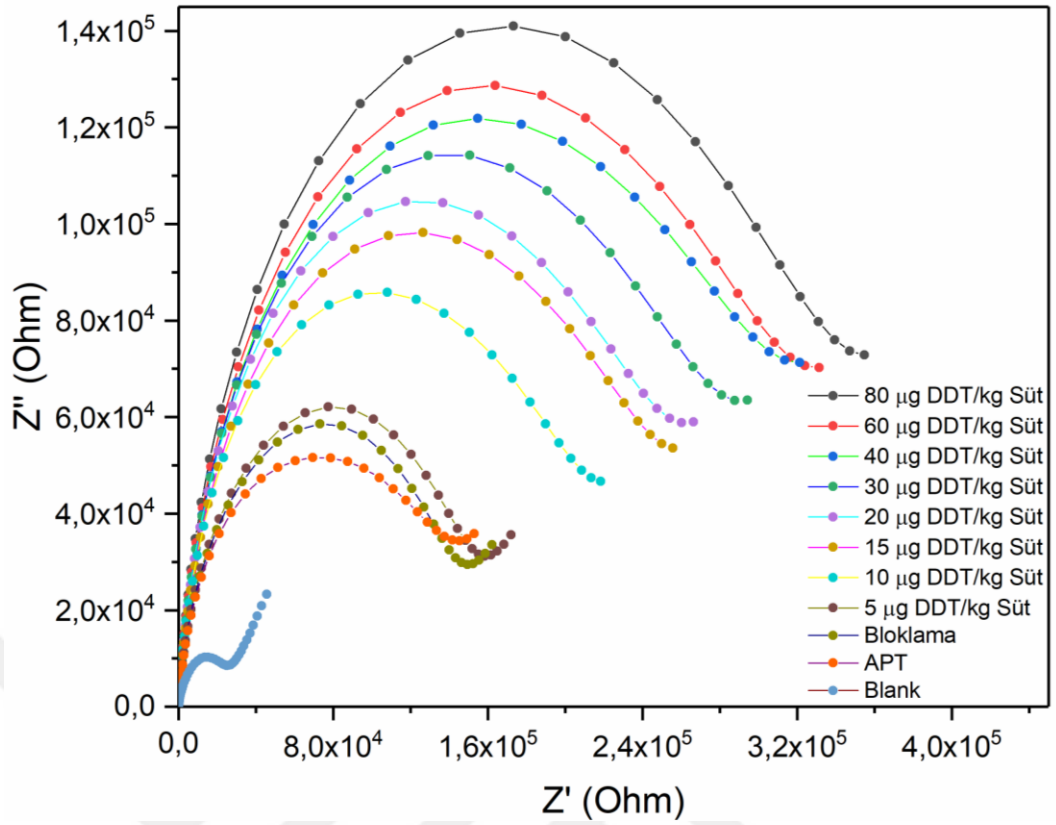
Ölçüm aşaması	I_{pa} (μA)	I_{pa} standart sapma (μA)
Blank	2,31	$\pm 0,04$
APT	2,08	$\pm 0,02$
Bloklama	1,77	$\pm 0,01$
5	1,76	$\pm 0,04$
10	1,58	$\pm 0,02$
15	1,48	$\pm 0,03$
20	1,39	$\pm 0,03$
30	1,30	$\pm 0,04$
40	1,25	$\pm 0,03$
60	1,13	$\pm 0,04$
80	1,01	$\pm 0,05$

S(2-2-1) sensör hazırlama koşulunda gerçekleştirilen CV ölçümlerinden elde edilen I_{pa} değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elektrot yüzeyinin ardışık modifikasyon basamakları boyunca kaydedilen dönüşümlü voltammogramlar incelendiğinde, $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ redoks çiftine ait anodik ve katodik pik akımlarında her bir yüzey modifikasyonuna bağlı olarak belirgin değişimler gözlenmiştir. Özellikle aptamer immobilizasyonu, yüzey bloklama işlemi ve hedef analit olan DDT'nin bağlanması sonrasında elektrot yüzeyinde oluşan biyomoleküler tabakanın, redoks probunun elektrot yüzeyine elektron transferini kısıtladığı anlaşılmaktadır. Bu durum, 5–80 μg DDT/kg süt konsantrasyon aralığında DDT konsantrasyonu arttıkça I_{pa} değerlerinin düzenli ve konsantrasyona bağlı bir şekilde azalmasıyla doğrulanmıştır. Gözlenen bu akım düşüşü, sensörün DDT'ye karşı özgül ve ölçülebilir bir yanıt verdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.6. APT-1 ile , S(2-2-1) çalışma koşulu ile genişletilmiş DDT konsantrasyonu örnekleri sonuçlarından elde edilen dönüşümlü voltammogramlardan alınan I_{pa} değerleri

Şekil 4.6’da S(2-2-1) koşulunda hazırlanan aptasensör için, DDT konsantrasyonuna bağlı olarak ölçülen I_{pa} değerlerinin konsantrasyona karşı grafiği gösterilmektedir. $[Fe(CN)_6]^{-3/4}$ redoks probu kullanılarak elde edilen dönüşümlü voltammogramlardan hesaplanan I_{pa} değerlerinin, DDT konsantrasyonunun 5–80 µg/kg süt aralığında artmasıyla birlikte belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bu azalış, aptamer–DDT etkileşimi sonucunda elektrot yüzeyinde oluşan biyomoleküler tabakanın kalınlaşması ve buna bağlı olarak redoks probunun elektrot yüzeyine elektron transferinin kısıtlanması ile ilişkilendirilmektedir. Düşük DDT konsantrasyonlarında I_{pa} değerlerindeki azalışın daha keskin olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda ise eğrinin plato eğilimi gösterdiği görülmektedir. Bu davranış, elektrot yüzeyindeki aktif bağlanma bölgelerinin yüksek DDT konsantrasyonlarında doygunluğa ulaşmasıyla açıklanabilir. Elde edilen bu sonuçlar, sensör yanıtının konsantrasyona bağımlı olduğunu ve aptasensörün DDT tayini için uygun bir elektrokimyasal cevap verdiğini ortaya koymaktadır.

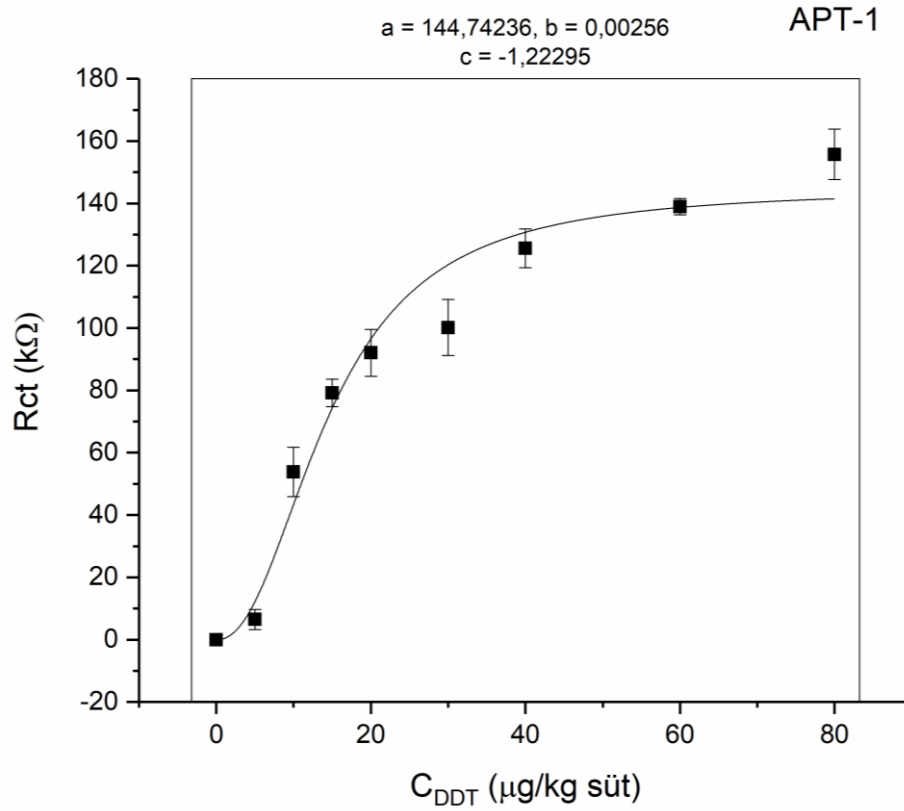


Şekil 4.7. APT-1 aptameri kullanılarak S(2-2-1) koşulunda genişletilmiş DDT konsantrasyonu örnekleri ile elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 4.7’de sunulan S(2-2-1) koşuluyla hazırlanmış elektrotta ait EIS Nyquist grafikleri incelendiğinde, 5 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında bloklama adımına kıyasla R_{ct} ’nin 6,5 kΩ arttığı ve DDT derişimi yükseldikçe bu artış eğiliminin devam ettiği görülmektedir. Artan DDT konsantrasyonlarıyla birlikte R_{ct} değerleri de kademeli ve giderek daha belirgin bir şekilde yükselmiş; 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için bloklamaya göre hesaplanan R_{ct} farkları sırasıyla 53,8, 79,2, 92,1, 100,1, 125,6, 138,9 ve 155,7 kΩ olarak belirlenmiştir.

S(2-2-1) koşulunda elde edilen yüksek R_{ct} artışlarının, elektrot yüzeyinde daha yoğun aptamer tutunması ya da hedef molekülün bağlanmasına elverişli bölgelerin daha verimli şekilde oluşmasıyla ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir. Bu sayede yüzeyde biriken aptamer-DDT kompleksleri daha sıkı ve geçirimsiz bir tabaka oluşturarak elektron transferini güçlü biçimde engellemekte, bu da empedans değerlerindeki belirgin yükselişi açıklamaktadır.

4.1.2.7. R_{ct} değerlerinden APT-1 ile S(2-2-1) koşullarında üretilen elektrota ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması



Şekil 4.8. APT-1 aptameri ile hazırlanan S(2-2-1) koşulu için genişletilmiş DDT konsantrasyonlarına karşı R_{ct} grafiği

Şekil 8’de S(2-2-1) koşulunda hazırlanan APT-1 bazlı aptasensör için, DDT konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen yük transfer direnci (R_{ct}) değerlerinin değişimi ve bu verilere LangmuirEXT1 modeli kullanılarak uygulanan eğri uydurma sonucu gösterilmektedir. DDT konsantrasyonunun 5–80 μg/kg süt aralığında artmasıyla birlikte R_{ct} değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiş, özellikle düşük konsantrasyon bölgesinde R_{ct} artışının daha keskin olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda ise artış hızının azalarak plato eğilimi sergilediği belirlenmiştir.

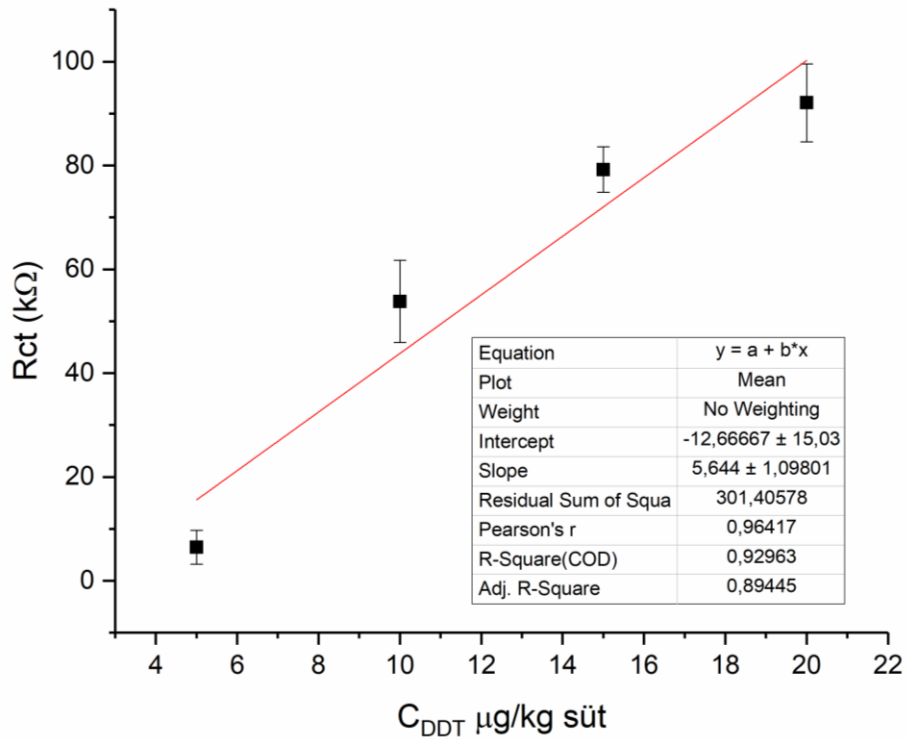
Bu davranış, Langmuir adsorpsiyon izotermine uygun olarak, aptamerlerin elektrot yüzeyinde sınırlı sayıda ve eşdeğer bağlanma bölgesine sahip olduğunu ve düşük DDT konsantrasyonlarında bu bölgelerin hızla dolduğunu göstermektedir. Yüksek DDT konsantrasyonlarında ise bağlanma bölgelerinin doygunluğa ulaşması sonucu R_{ct} değerlerindeki artışın sınırlı kaldığı anlaşılmaktadır. Elektrot yüzeyinde oluşan aptamer–

DDT kompleksleri, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ redoks probunun elektrot yüzeyine erişimini ve elektron transferini engelleyerek yük transfer direncinin artmasına neden olmaktadır.

LangmuirEXT1 modeli ile elde edilen başarılı uyum, sensör yanıtının esas olarak tek tabakalı ve spesifik aptamer-DDT etkileşimine dayandığını göstermektedir. Bu sonuçlar, geliştirilen aptasensörün DDT tayini için özgül, konsantrasyona bağlı ve doyumluk davranışı sergileyen bir EIS yanıtı sunduğunu ortaya koymaktadır.

Modeldeki a parametresi sensör yüzeyinin doyumluk seviyesinde ulaşabileceği maksimum yük transfer direncini temsil ederken ya da maksimum bağlanma yanıtını ($R_{ct,max}$), b parametresi ayrışma sabitini (K_d)'yi belirtir. c parametresi aptamer-DDT bağlanma afinitesinin bir göstergesi olarak DDT konsantrasyonuna bağlı duyarlılığı ve eğrinin konsantrasyon artışına yanıtının eğimini temsil eder. Elde edilen parametre değerleri sensör yüzeyinin yüksek bağlanma afinitesi ve sınırlı aktif bağlanma bölgesi ile uyumlu bir Langmuir davranışı sergilediğini desteklemektedir.

LangmuirEXT1 modeli ile yapılan fitting sonucunda, APT-1 aptameri için dissosiyasyon sabiti (K_d) 0,00256 μg DDT/kg süt (veya 2.56 ng/g süt) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen düşük K_d değeri, aptamer-DDT kompleksinin yüksek afiniteli ve kararlı olduğunu, sensör yanıtının düşük konsantrasyonlarda dahi belirgin şekilde değiştiğini göstermektedir.



Şekil 4.9. APT-1 ile hazırlanan elektrodun, S(2-2-1) koşulu için kalibrasyon grafiği

APT-1 aptameri kullanılarak S(2-2-1) koşulu altında hazırlanan elektrota ait DDT kalibrasyon eğrisi Şekil 4.9’da verilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki DDT çözeltileri ile aptasensörün elde ettiği R_{ct} değerleri arasında, 20 μg DDT/kg süt seviyesine kadar doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Regresyon analizine göre elde edilen doğrusal model aşağıdaki gibidir:

$$R_{ct} = -12,667 + 5,644 \cdot C_{\text{DDT}} \quad (4.3)$$

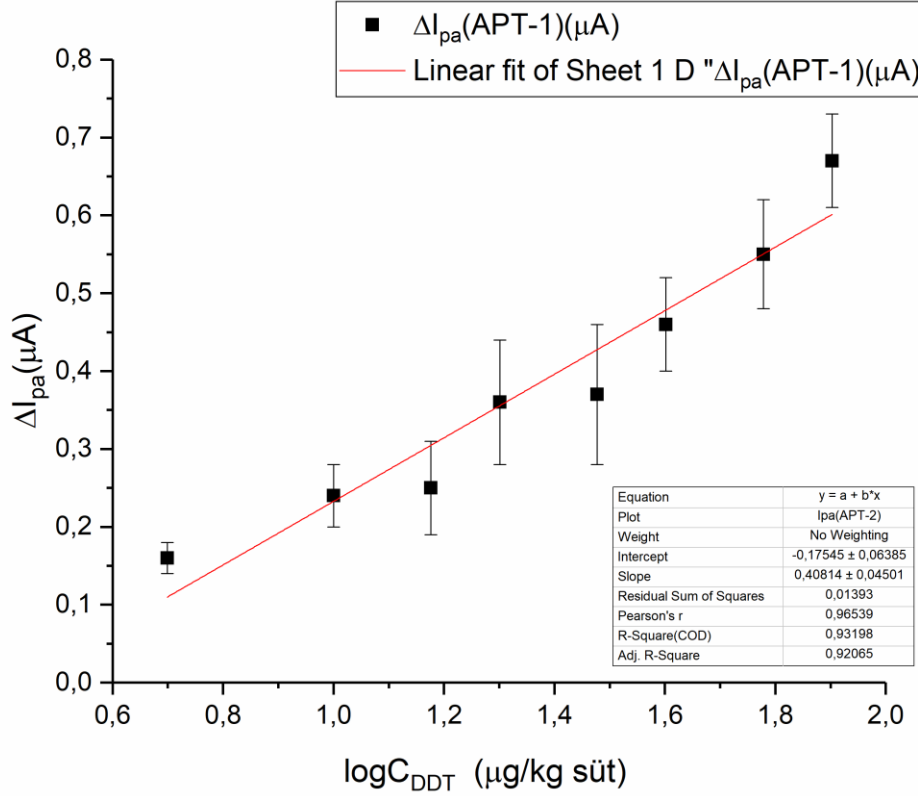
Eğimin $5,644 \pm 1,098$ ve x eksenini kestiği noktanın -12,667 olarak hesaplanmış olması, sensörün konsantrasyon değişimlerine karşı duyarlı bir yanıt verdiğini göstermektedir. Korelasyon katsayısının (Pearson’s $r = 0,964$) ve determinasyon katsayısının ($R^2 = 0,929$) yüksek bulunması, kalibrasyon eğrisinin iyi düzeyde doğrusal uyum sağladığını ortaya koymaktadır. Ayrıca düzeltilmiş R^2 değerinin 0,894 olması da modelin istatistiksel olarak anlamlı ve güvenilir olduğunu desteklemektedir. Bu bulgular doğrultusunda sensörün 6–20 μg DDT/kg süt aralığında güvenilir ve tekrarlanabilir ölçümler üretebildiği belirlenmiştir.

APT-1 aptameri kullanılarak S(2-2-1) koşulu altında hazırlanan elektrodun, sensörün analiti düşük konsantrasyonlarda tespit edebilme performansını değerlendirmek amacıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde, bloklama ölçümlerinden elde edilen standart sapma ($\sigma = 5,18$) ile kalibrasyon eğrisinin eğimi (5,644) kullanılmıştır.

Eşitlik 4.1 kullanılarak APT-1 ile S(2-2-1) koşulundaki çalışmada LOD değeri yaklaşık 3,03 μg DDT/kg süt olarak bulunmuştur. Eşitlik 4.2 ile yapılan hesaplama sonucunda ise LOQ değeri yaklaşık 9,18 μg DDT/kg süt olarak elde edilmiştir.

Tayin aralığı belirlenirken, alt sınır olarak LOQ değeri olan 9,18 μg DDT/kg süt, LOL olarak ise doğrusal kalibrasyon bölgesinin üst limitini oluşturan 20 μg DDT/kg süt değeri kullanılmıştır. Dolayısıyla tayin aralığı 9,18 – 20 μg DDT/kg süt olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar, yöntemin 9,18- 20 μg DDT/kg süt gibi dar bir aralıkta ve sadece düşük konsantrasyon değerlerinde analiti kantitatif biçimde tespit edilebilirliğini göstermektedir.

4.1.2.8. I_{pa} değerlerinden APT-1 ile S(2-2-1) koşullarında üretilen elektrota ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması



Şekil 4.10. APT-1 ile S(2-2-1) koşulunda hazırlanan elektrot ölçümlerinden alınan, DDT konsantrasyonunun logaritmik değerlerine karşı I_{pa} değişim değerleri

Şekil 4,10'da APT-1 ile hazırlanan aptasensör için, DDT konsantrasyonunun logaritmik değeri ile ΔI_{pa} arasındaki ilişki gösterilmektedir. ΔI_{pa} değerlerinin, $\log(C_{DDT})$ ile doğrusal bir artış eğilimi sergilediği ve elde edilen verilerin doğrusal regresyon modeli ile iyi bir uyum sağladığı görülmektedir. Uygulanan doğrusal regresyon sonucunda elde edilen yüksek korelasyon katsayısı ($R^2 = 0,932$) ve Pearson korelasyon katsayısı ($r = 0,965$), sensör yanıtının DDT konsantrasyonuna güçlü ve anlamlı bir şekilde bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Grafikte kullanılan logaritmik konsantrasyon eksen, özellikle geniş konsantrasyon aralığında sensör yanıtının doğrusal bir bölgede değerlendirilmesine olanak sağlamış ve düşük konsantrasyonlardaki sinyal değişimlerinin daha net biçimde ayırt edilmesini mümkün kılmıştır. ΔI_{pa} parametresinin kullanılması, elektrotlar arası

başlangıç akım farklarının etkisini minimize ederek sensör yanıtının karşılaştırılabilirliğini artırmıştır.

Elde edilen doğrusal ilişki, APT-1 aptamerinin DDT ile etkileşiminin ölçülebilir ve tekrarlanabilir bir elektrokimyasal sinyal değişimi oluşturduğunu ve geliştirilen aptasensörün nicel analiz için uygun bir kalibrasyon davranışı sergilediğini göstermektedir. Hata çubuklarının göreceli olarak dar olması, ölçümlerin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu desteklemektedir.

Gürültü sinyaline karşılık gelen veya en düşük çalışılan konsantrasyon olan 5 µg DDT/kg süt çözeltisinden elde edilen standart sapma değeri 0,05 olarak hesaplanmıştır. Sinyal/gürültü = 3,3 yaklaşımı esas alınarak, %99,9 güven sınırı içerisinde LOD değeri doğrusal kalibrasyon denkleminde hesaplanmış; LOQ ise LOD değerinin 3,3 katı olarak belirlenmiştir. Bu durumda Şekil 4.31'deki doğru denkleminde LOD 6,82, LOQ değeri ise 22,53 olarak hesaplanmıştır.

4.2. APT-2 Aptameri ile Yapılan Çalışmalar

APT-1 aptameri ile gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmalar, bu aptamerin primersiz formu olan APT-2 kullanılarak da aynı koşullar altında tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, sensör hazırlama adımları, ölçüm protokolleri ve elektrokimyasal analiz yöntemleri APT-1 ile yapılan çalışmalarla birebir aynı tutulmuş, böylece iki aptamer arasındaki performans farklarının güvenilir bir şekilde ortaya konması amaçlanmıştır. APT-1 ile gerçekleştirilen deneylerde son aşamada kullanılan DDT konsantrasyon aralığı referans alınarak, APT-2 aptameri için de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt konsantrasyonlarında hazırlanan DDT çözeltileri tüm sensör koşullarında çalışılmıştır. Bu yaklaşım sayesinde, primersiz aptamer yapısının elektrot yüzeyine immobilizasyonu, hedef analit bağlanma davranışı ve sensör yanıtı üzerindeki etkileri sistematik olarak incelenmiş ve APT-1 ile APT-2 aptamerlerinin analitik performansları doğrudan karşılaştırılabilir hâle getirilmiştir.

4.2.1. APT-2 aptameri ile hazırlanan elektrotların stabilizasyonu

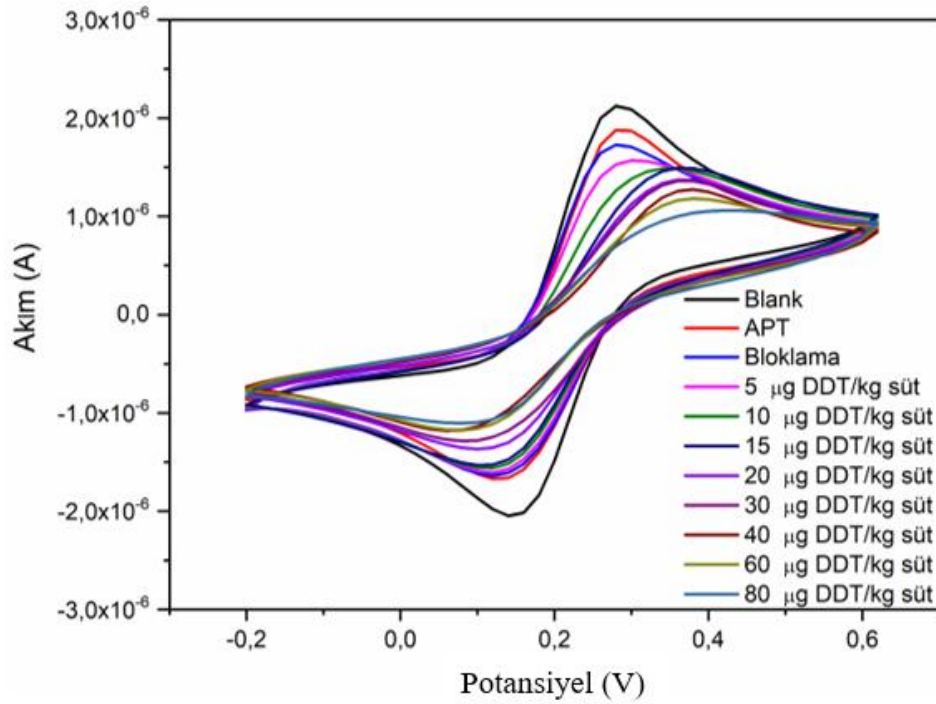
APT-1 ile yapılan çalışmalarda uygulanan prosedüre paralel olarak, her bir deney öncesinde elektrotların fiziksel ve elektrokimyasal temizlik işlemleri gerçekleştirilmiş;

dönüşümlü voltametri ölçümlerinde altına özgü karakteristik piklerin net bir şekilde gözlemlenmesinin ardından deneysel ölçümlere başlanmıştır.

4.2.2. APT-2 aptameri ile hazırlanan elektrotların elektrokimyasal performanslarının değerlendirilmesi

APT-2 ile hazırlanan elektrotların performansları; APT-1’de olduğu gibi CV ve EIS grafikleri alınmış ve karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

APT-2 aptameri ile hazırlanan elektrotlarda da aptamer immobilizasyonu sonrasında akım değerlerinin azaldığı, yağsız süt ile temasın iletkenliği düşürdüğü ve DDT konsantrasyonu arttıkça akımın daha da azalarak elektrokimyasal performansı olumsuz etkilediği gözlenmiştir. APT-2 ile ilk çalışılan DDT konsantrasyonları 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt derişimleri kullanılmıştır. APT 2 ile yapılan çalışılan sensör koşulları arasında 2 saat aptamer kaplama, 2 saat bloklama ve 1 saat DDT ile muamele koşulu olan S(2-2-1) koşulu optimum koşul olarak belirlenmiş ve APT-2 ile yapılan diğer çalışmalarda bu koşul kullanılmıştır. Bu koşul için hazırlanan sensörün dönüşümlü voltammogramı Şekil 4.7’de verilmiştir. Tüm diğer koşullarda hazırlanan elektrotlardan alınan CV grafikleri ise EK-3’te verilmiştir.



Şekil 4.11. APT-2 aptameri ile S(2-2-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

S(2-2-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,26V'da $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,12 V'da $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} 2,12 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,28 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,12 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 1,87 μA 'e düşerken ΔE_p 160 mV değerine çıkmıştır. Bloklama sonrasında ise I_{pa} değeri azalarak 1,73 μA 'e ulaşmıştır. ΔE_p 'nin anodik ve katodik pik tepe noktaları sırasıyla 0,26 ve 0,10 V değerlerini aldığı ölçülmüştür.

Bloklama adımını takiben gerçekleştirilen 5, μg DDT/kg süt inkübasyonlarında anodik pik değerlerinin 0,28 V; katodik pik değerlerinin ise 0,12 V olarak sabit kalması, ΔE_p 'nin 160 mV değerinde sabit kalmasına neden olmuştur. ΔE_p 'nin sabit kalması, düşük DDT derişimlerinde aptamer bağlanma bölgelerinin henüz doymunluğa ulaşmamış olması nedeniyle bağlanan DDT miktarının yüzey elektron transfer direncinde ölçülebilir bir değişim yaratmamasından kaynaklanabilir. Aynı konsantrasyonlarda I_{pa} 'nin 1,57 değerine düştüğü belirlenmiştir. Devamında gerçekleştirilen 10, 15, 20, 30 ve 40 μg DDT/kg süt örnekleri için anodik pik tepe değerleri sırasıyla 0,36; 0,38; 0,38; 0,40 ve 0,42 V olarak belirlenirken, katodik pik tepe değerleri aynı sırayla 0,12 V; 0,12 V; 0,10 V; 0,10 V ve 0,10 V değerleri belirlenmiş, buna karşılık ΔE_p değerleri sırasıyla 240, 260, 280, 300 ve 320 mV olarak hesaplatılmıştır. ΔE_p değerlerindeki bu artış bağlanan DDT miktarının yüzeyde giderek artan bir elektron transfer bariyeri oluşturduğunu açıkça göstermektedir. Bu eğilim, sensörün bu konsantrasyon aralığında hedef moleküle duyarlı bir voltametrik yanıt verdiğini ve artan konsantrasyonun doğrudan ΔE_p 'ye yansıdığını ortaya koymaktadır. Aynı konsantrasyonlarda kaydedilen I_{pa} değerlerinin 1,49; 1,48; 1,37; 1,36 ve 1,27 μA şeklinde düzenli bir düşüş göstermesi, yüzeye bağlanan DDT'nin elektron transferini giderek daha fazla sınırlandırdığını düşündürmektedir. I_{pa} 'deki bu azalma, ΔE_p artışıyla uyumlu olup, DDT–aptamer etkileşiminin elektrot kinetiğine etkisini tutarlı biçimde yansıtmaktadır.

DDT konsantrasyonunun daha yüksek değerlere çıkarıldığı sonraki aşamalarda ise anodik pik değerlerinin 0,42 V ve katodik pik değerlerinin 0,10 V değerine sabitlenmesi ile ΔE_p 320 mV olarak hesaplanmıştır. Bu durum yüzeydeki aptamer bağlanma

bölgelerinin büyük ölçüde dolduğu; dolayısıyla eklenen DDT moleküllerinin yüzey elektron transferine ilave bir katkı sunamadığı bir doygunluk noktasına ulaşıldığını düşündürmektedir. Başka bir ifadeyle, sensör bu aralıktan sonra konsantrasyon artışına karşı duyarlılığını kaybetmektedir. Bu noktada I_{pa} değerlerinin de 1,18 ve 1,06 μA 'a kadar azalması, yüzeyde daha fazla engelleyici etkileşim bulunduğunu gösterse de, ΔE_p 'nin artık bu değişimlere yanıt vermemesi sensörün çalışma aralığının belirli bir sınırdan sonra doygunluğa ulaştığını desteklemektedir.

4.2.2.1. APT-2 ile hazırlanan elektrotların E_p değerlerinin yorumlanması

Belirlenen en uygun sensör üretim koşulu, kaplanma ile beraber elektron transferine karşı oluşturduğu direnci artan ya da diğer bir ifade ile her aşama sırasında ΔE_p değerinde artış olan S(2-2-1) koşullarıyla hazırlanan elektrot olabileceği öngörülmüştür. Tüm koşula ait dönüşümlü voltammogramlarından elde edilen ΔE_p değerleri Çizelge 4.5.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. APT-2 ile S(2-2-1) çalışma sonuçlarından elde edilen ΔE_p değerleri ve standart sapmaları

Ölçüm Aşaması	S(1-1-0,5)	S(1-1-1)	S(1-1-2)	S(1-2-0,5)	S(1-2-1)	S(1-2-2)
Blank	120 ± 2	180 ± 26	160 ± 12	120 ± 5	140 ± 22	100 ± 2
APT	120 ± 4	180 ± 12	180 ± 13	160 ± 8	160 ± 10	140 ± 6
Bloklama	380 ± 46	280 ± 6	160 ± 27	240 ± 12	220 ± 8	180 ± 10
5	380 ± 52	260 ± 24	220 ± 32	240 ± 33	240 ± 14	240 ± 19
10	380 ± 25	240 ± 26	220 ± 49	260 ± 15	260 ± 12	260 ± 21
15	380 ± 27	220 ± 36	240 ± 35	280 ± 16	280 ± 16	260 ± 39
20	400 ± 35	260 ± 21	220 ± 26	280 ± 34	300 ± 18	260 ± 45
30	400 ± 42	300 ± 26	200 ± 18	300 ± 19	360 ± 35	240 ± 53
40	360 ± 67	280 ± 41	240 ± 21	440 ± 25	260 ± 42	280 ± 11
60	380 ± 32	260 ± 52	260 ± 24	580 ± 22	320 ± 34	320 ± 14
80	600 ± 44	400 ± 48	280 ± 16	440 ± 36	460 ± 45	340 ± 12

Ölçüm Aşaması	S(2-1-0,5)	S(2-1-1)	S(2-1-2)	S(2-2-0,5)	S(2-2-1)	S(2-2-2)
Blank	160 ± 21	160 ± 26	140 ± 16	200 ± 55	140 ± 19	160 ± 24
APT	140 ± 13	160 ± 12	160 ± 7	240 ± 21	160 ± 12	200 ± 11
Bloklama	220 ± 9	160 ± 21	160 ± 11	280 ± 24	160 ± 11	280 ± 9
5	220 ± 18	240 ± 9	180 ± 13	280 ± 34	160 ± 8	280 ± 22
10	220 ± 21	260 ± 13	180 ± 26	280 ± 42	240 ± 13	280 ± 36
15	220 ± 32	300 ± 15	180 ± 34	280 ± 46	260 ± 12	280 ± 45
20	220 ± 38	300 ± 34	200 ± 29	280 ± 53	280 ± 15	280 ± 53
30	220 ± 46	300 ± 41	240 ± 28	280 ± 50	300 ± 18	280 ± 58
40	220 ± 51	340 ± 24	320 ± 16	280 ± 49	320 ± 16	280 ± 66
60	260 ± 26	320 ± 46	380 ± 10	320 ± 19	320 ± 29	300 ± 23
80	240 ± 53	360 ± 19	420 ± 9	320 ± 21	320 ± 24	320 ± 24

4.2.2.2. APT-1 ile hazırlanan elektrotlardan elde edilen I_{pa} değerleri

APT-2 ile Au elektrotlara ait başlangıç I_{pa} değerleri kontrol edilmiş ve sensör üretim ve deneme koşullarındaki her adım için bu değer karşılaştırılmıştır.

Tüm koşuluna ait dönüşümlü voltammogramlarından elde edilen I_{pa} değerleri Çizelge 4.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. APT-2 çalışma sonuçlarından elde edilen I_{pa} değerleri ve standart sapmaları (μA)

Ölçüm Aşaması	S(1-1-0,5)	S(1-1-1)	S(1-1-2)	S(1-2-0,5)	S(1-2-1)	S(1-2-2)
Blank	2,15 ± 0,04	2,14 ± 0,03	2,25 ± 0,01	2,60 ± 0,02	2,07 ± 0,02	2,1 ± 0,01
APT	2,32 ± 0,03	2,08 ± 0,02	1,54 ± 0,04	2,17 ± 0,02	1,53 ± 0,02	1,79 ± 0,02
Bloklama	1,91 ± 0,02	1,43 ± 0,02	1,56 ± 0,02	1,50 ± 0,02	1,46 ± 0,03	1,69 ± 0,03
5	1,90 ± 0,03	1,39 ± 0,06	1,50 ± 0,02	1,50 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,57 ± 0,03
10	1,97 ± 0,03	1,33 ± 0,02	1,52 ± 0,08	1,45 ± 0,03	1,26 ± 0,03	1,56 ± 0,02
15	1,86 ± 0,04	1,29 ± 0,04	1,49 ± 0,04	1,43 ± 0,04	1,20 ± 0,03	1,52 ± 0,04
20	1,94 ± 0,03	1,18 ± 0,05	1,44 ± 0,07	1,30 ± 0,06	1,10 ± 0,08	1,47 ± 0,03
30	1,97 ± 0,04	1,21 ± 0,04	1,55 ± 0,04	1,25 ± 0,04	1,09 ± 0,12	1,48 ± 0,09
40	2,05 ± 0,17	1,07 ± 0,05	1,48 ± 0,03	1,21 ± 0,04	1,20 ± 0,06	1,44 ± 0,04
60	1,55 ± 0,06	1,09 ± 0,03	1,45 ± 0,11	1,17 ± 0,06	1,10 ± 0,05	1,16 ± 0,05
80	1,35 ± 0,08	1,10 ± 0,04	0,90 ± 0,09	0,90 ± 0,04	0,8 ± 0,07	0,99 ± 0,06

Ölçüm Aşaması	S(2-1-0,5)	S(2-1-1)	S(2-1-2)	S(2-2-0,5)	S(2-2-1)	S(2-2-2)
Blank	2,26 ± 0,04	2,17 ± 0,02	1,08 ± 0,01	2,08 ± 0,08	2,12 ± 0,04	2,02 ± 0,01
APT	1,77 ± 0,02	1,61 ± 0,03	1,92 ± 0,01	2,05 ± 0,02	1,87 ± 0,02	1,94 ± 0,01
Bloklama	1,68 ± 0,03	1,37 ± 0,02	1,77 ± 0,03	1,90 ± 0,01	1,73 ± 0,02	1,66 ± 0,02
5	1,65 ± 0,03	1,12 ± 0,03	1,66 ± 0,02	1,81 ± 0,03	1,57 ± 0,05	1,60 ± 0,08
10	1,65 ± 0,03	1,09 ± 0,08	1,53 ± 0,03	1,69 ± 0,05	1,49 ± 0,02	1,52 ± 0,02
15	1,65 ± 0,04	1,08 ± 0,06	1,43 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,48 ± 0,04	1,45 ± 0,04
20	1,59 ± 0,05	1,30 ± 0,12	1,29 ± 0,04	1,46 ± 0,06	1,37 ± 0,06	1,37 ± 0,05
30	1,57 ± 0,04	1,10 ± 0,09	1,24 ± 0,05	1,42 ± 0,05	1,36 ± 0,07	1,44 ± 0,04
40	1,55 ± 0,08	1,03 ± 0,05	1,15 ± 0,04	1,37 ± 0,04	1,27 ± 0,04	1,33 ± 0,05
60	1,48 ± 0,05	1,04 ± 0,16	1,04 ± 0,05	1,31 ± 0,07	1,18 ± 0,05	1,12 ± 0,04
80	1,33 ± 0,09	1,03 ± 0,14	1,00 ± 0,06	1,31 ± 0,04	1,06 ± 0,04	0,95 ± 0,06

Çizelge 4.6’da farklı sensör hazırlama koşulları için elektrot yüzeyinin her bir modifikasyon basamağında elde edilen I_{pa} değerleri sunulmuştur. Tüm sensör koşulları genel olarak değerlendirildiğinde, DDT konsantrasyonunun artmasıyla birlikte I_{pa} değerlerinde bir azalış eğilimi gözlenmekle birlikte, bu azalışın en düzenli, kademeli ve konsantrasyona duyarlı biçimde gerçekleştiği sensör koşulunun S(2-2-1) olduğu açıkça görülmektedir.

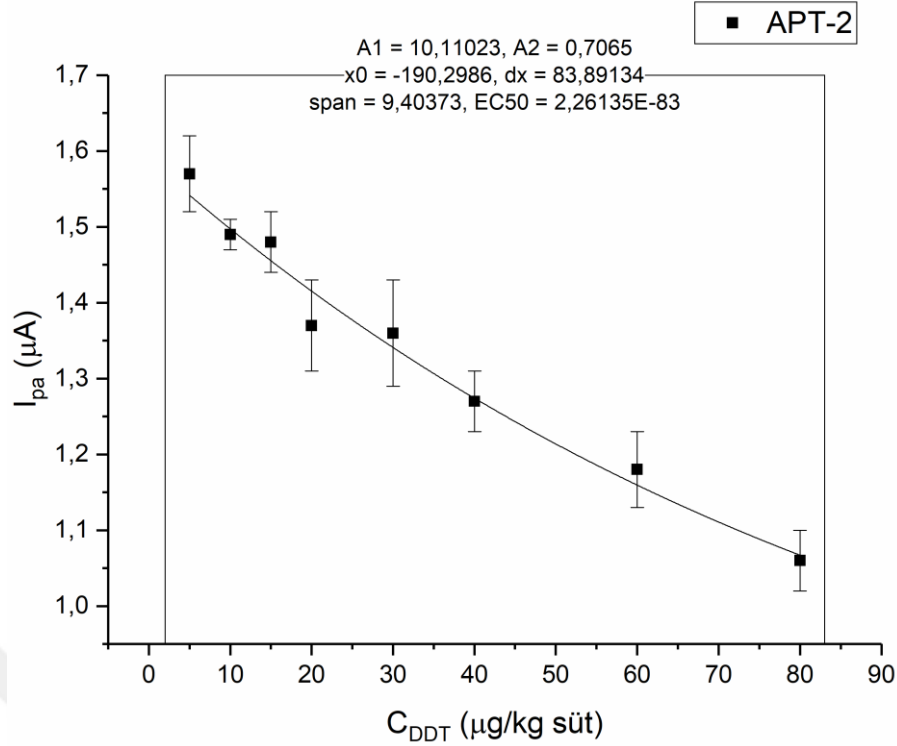
S(2-2-1) koşulunda, blank ölçümüne kıyasla aptamer immobilizasyonu ve bloklama basamakları sonrasında I_{pa} değerlerinde belirgin bir düşüş meydana gelmiş; bu durum, elektrot yüzeyinin biyomoleküler katmanlarla etkin bir şekilde modifiye edildiğini göstermiştir. Bunu takiben, 5–80 μg DDT/kg süt konsantrasyon aralığında I_{pa} değerlerinin artan DDT konsantrasyonu ile birlikte tutarlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Özellikle düşük konsantrasyon bölgesinde akımdaki azalmanın daha belirgin olması, sensörün bu aralıkta hedef analite karşı yüksek duyarlılık sergilediğini ortaya koymaktadır.

APT-2 ile hazırlanan elektrotlardan elde edilen I_{pa} değerleri temel alınarak, değişken parametreleri olan aptamer muamele süresi, bloklama süresi ve DDT inkübasyonunun aptasensör cevabına etkisi araştırılmıştır.

Elektrot modifikasyonunun temel basamaklarından biri olan aptamerle muamele süresinin yüzeyin düzenlenmesi üzerindeki etkisi hem elektrot direnci hem de akım yanıtları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. 1 saat ve 2 saat serileri karşılaştırıldığında, 2 saatlik inkübasyon sonrasında elektrot yüzeyine ait başlangıç direnç değerlerinin daha stabil olduğu ve akım değerlerinde daha kontrollü ve öngörülebilir bir düşüş meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu durum, 2 saatlik muamele süresinin aptamer-yüzey etkileşimleri açısından gerekli kinetik kararlılığı sağladığını ve elektrot yüzeyinde daha yoğun, düzenli ve homojen bir aptamer tabakasının oluşumunu desteklediğini göstermektedir. Uzatılmış muamele süresinin, redoks probunun elektrot yüzeyine difüzyonunu daha sistematik bir biçimde kısıtladığı ve buna bağlı olarak sensör hassasiyetinin arttığı söylenebilir.

Yüzeydeki spesifik olmayan etkileşimlerin minimize edilmesi amacıyla uygulanan bloklama aşamasında, bloklama süresinin 1 saatten 2 saate çıkarılmasının yüzey izolasyonunu belirgin biçimde güçlendirdiği tespit edilmiştir. İki saatlik bloklama uygulanan elektrotlarda, DDT konsantrasyonunun artışıyla birlikte gözlenen direnç artışının ve akım düşüşünün daha lineer ve tutarlı bir eğilim sergilemesi, bloklama ajanının yüzeydeki aktif ve bağlanmaya açık boşlukları daha etkin biçimde kapattığını göstermektedir. Bu durum, sensör yüzeyinin arka plan sinyalinin baskılanmasına katkı sağlayarak hedef analit olan DDT'ye karşı daha seçici ve kararlı bir yanıt elde edilmesine olanak tanımıştır.

Sensör yüzeyindeki moleküler bağlanmanın kontrol edilmesi amacıyla uygulanan DDT konsantrasyonunun artışına paralel olarak, elektrot direncinde artış ve akım sinyalinde belirgin bir azalma meydana geldiği saptanmıştır. Özellikle 80 µg DDT/kg süt DDT konsantrasyonunda S(1-1-2) ve S(2-2-1) gruplarında gözlenen uç değerler, DDT moleküllerinin elektrot yüzeyinde düzenli bir yapı oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak sinyalde gözlenen bu değişim, elektrot yüzeyinin DDT ile modifikasyona açık olduğunu ve artan yüzey yoğunluğunun elektron transferine karşı bir bariyer oluşturarak sensör yanıtını baskıladığını göstermektedir.



Şekil 4.12. APT-1 ile , S(2-2-1) çalışma koşulu ile elde edilen dönüşümlü voltammogramlardan alınan I_{pa} değerleri

Diğer sensör koşulları incelendiğinde, bazı koşullarda I_{pa} değerlerinin belirli konsantrasyon aralıklarında plato eğilimi gösterdiği veya düzensiz değişimler sergilediği görülmüştür. Buna karşın, S(2-2-1) koşulunda elde edilen I_{pa} değerlerinin tüm konsantrasyon aralığında daha düşük standart sapma ile birlikte düzenli bir azalış göstermesi, bu sensör konfigürasyonunun elektrot yüzeyinde daha homojen bir aptamer tabakası oluşturduğunu ve DDT bağlanmasına daha etkin bir şekilde yanıt verdiğini düşündürmektedir.

S(2-2-1) dışındaki koşullarda, I_{pa} değerlerinin bazı konsantrasyon aralıklarında plato eğilimi göstermesi, düzensiz dalgalanmalar sergilemesi veya nispeten yüksek standart sapma değerleri ile ölçülmesi, elektrot yüzeyinde oluşan biyomoleküler tabakanın homojen ve kararlı olmadığını düşündürmüştür. Bu durum ya yetersiz ya da aşırı aptamer immobilizasyonu ve/veya bloklama adımının spesifik olmayacak şekilde adsorpsiyonu tam olarak engelleyememesi ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, bu koşullar hedef analit bağlanmasına karşı net, güvenilir ve konsantrasyona bağlı bir elektrokimyasal sinyal üretme açısından yeterli performansı sağlayamadıkları için elenmiştir. Sonuç olarak, S(2-2-1) sensör hazırlama koşulu, I_{pa} değerlerindeki konsantrasyona bağlı ve tekrarlanabilir azalış davranışı sayesinde diğer koşullara kıyasla

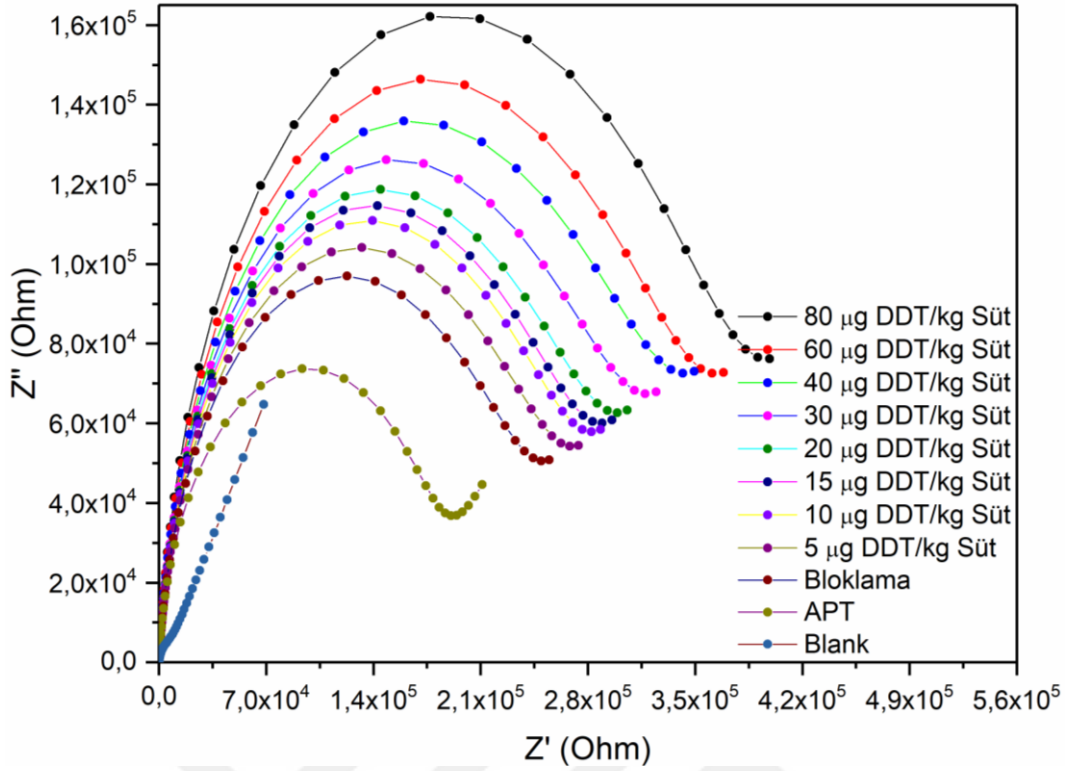
daha kararlı ve güvenilir bir elektrokimyasal yanıt sunmuş; bu nedenle çalışmada en uygun sensör konfigürasyonu olarak değerlendirilmiştir.

4.2.2.3. APT-2 ile hazırlanan elektrot çalışmalarından alınan EIS grafiklerinin analiz edilmesi

Tüm yüzey modifikasyon adımlarının ardından, elektrotların elektron transfer özellikleri dönüşümlü voltammogramlarından sonra EIS yöntemi ile incelenmiş ve sonuçlar Nyquist diyagramları şeklinde elde edilmiştir. EIS spektrumları, DDT konsantrasyonu arttıkça sistemin toplam empedansının yükseldiğini ve R_{ct} değerlerinin arttığını göstermiştir. Bu durum, daha fazla DDT molekülünün aptamer tabakasına bağlanarak elektrot yüzeyindeki elektron transferini kısıtlamasından kaynaklanmakta olup, önceki elektrotlarda elde edilen sonuçlarla uyumludur.

EIS spektrumlarından elde edilen Nyquist diyagramları, APT-1 ile gerçekleştirilen çalışmalarda olduğu gibi, elektron transferinin sınırlı olduğunu gösteren karakteristik yarım daire biçimini sergilemiş ve bu bölümü, iyonların elektrot yüzeyine doğru difüzyonunu temsil eden doğrusal segment takip etmiştir.

APT 2 ile yapılan çalışılan sensör koşulları arasında 2 saat aptamer kaplama, 2 saat bloklama ve 1 saat DDT ile muamele edildiği S(2-2-1) koşulu ile hazırlanan sensörün EIS Nyquist diyagramı Şekil 4.3'te verilmiştir. Tüm diğer koşullarda hazırlanan elektrotlardan alınan EIS Nyquist diyagramları ise EK-4'te verilmiştir.



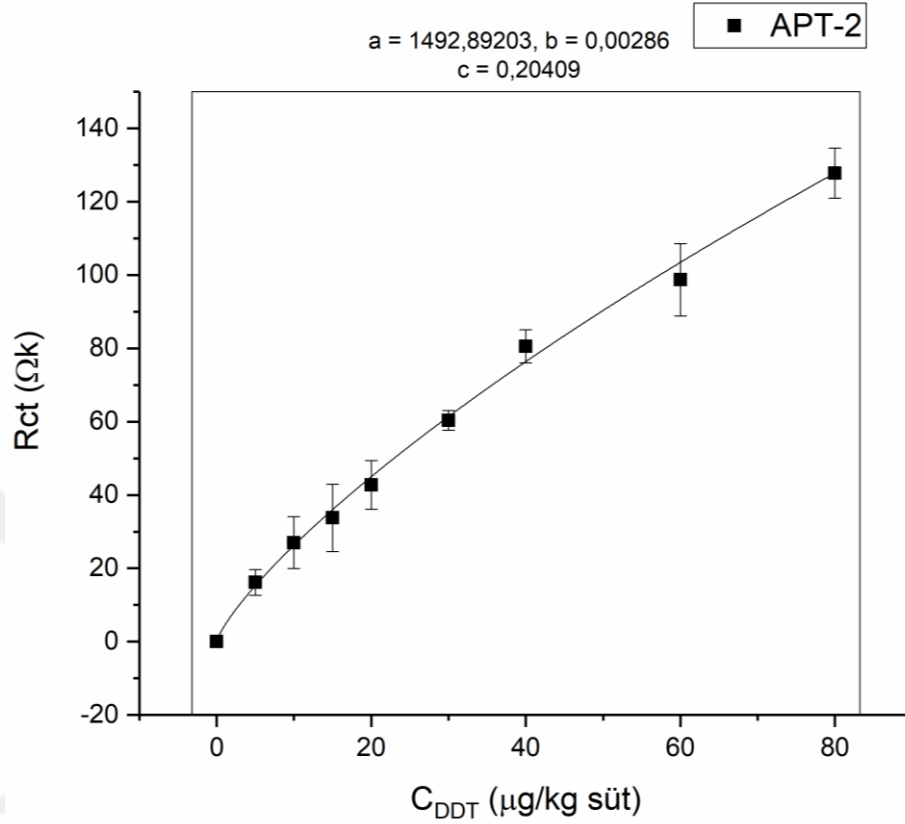
Şekil 4.13. APT-2 aptameri kullanılarak S(2-2-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 4.13'te verilen Nyquist diyagramları, S(2-2-1) koşuluyla modifiye edilen elektrotun DDT varlığına oldukça güçlü bir empedans yanıtı gösterdiğini ortaya koymaktadır. 5 μg DDT/kg süt inkübasyonundan sonra, bloklama basamağına kıyasla R_{ct} değerinde 16,2 $\text{k}\Omega$ 'lık bir artış meydana gelmesi bu hassasiyeti doğrulamaktadır. DDT derişimi arttıkça bu değişimin daha da belirginleştiği görülmüş; 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt seviyelerinde kaydedilen R_{ct} artışları sırasıyla 27,0; 33,77; 42,7; 60,4; 80,6; 98,7 ve 127,8 $\text{k}\Omega$ olarak hesaplanmıştır.

Bu sonuçlar, sensörün artan DDT konsantrasyonunu oldukça tutarlı, yoğunluğu yansıtan ve yüksek doğrulukla ayırt edebildiğini göstermektedir. Elde edilen veriler, aptamer-DDT etkileşimlerinin S(2-2-1) modifikasyonunda elektron transferini en etkili şekilde kısıtladığını ve tüm modifikasyon koşulları arasında en başarılı ve en duyarlı performansın bu sensörle elde edildiğini güçlü biçimde desteklemektedir.

Benzer şekilde iyi bir sinyal veren S(2-2-0,5) koşulu da değerlendirildiğinde, S(2-2-1) sensörün R_{ct} değerlerine ait standart sapmaların daha düşük olması dikkat çekmektedir. Ölçümlerin tekrarlanabilirliği açısından bakıldığında, S(2-2-1) modifikasyonunun daha istikrarlı ve tutarlı sonuçlar üreterek öne çıktığı görülmektedir.

4.2.2.4. R_{ct} değerlerinden APT-2 ile S(2-2-1) koşullarında üretilen elektrota ait kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması



Şekil 4.14. APT-14 aptameri ile hazırlanan S(2-2-1) koşulu için farklı DDT konsantrasyonlarına karşı R_{ct} grafiği

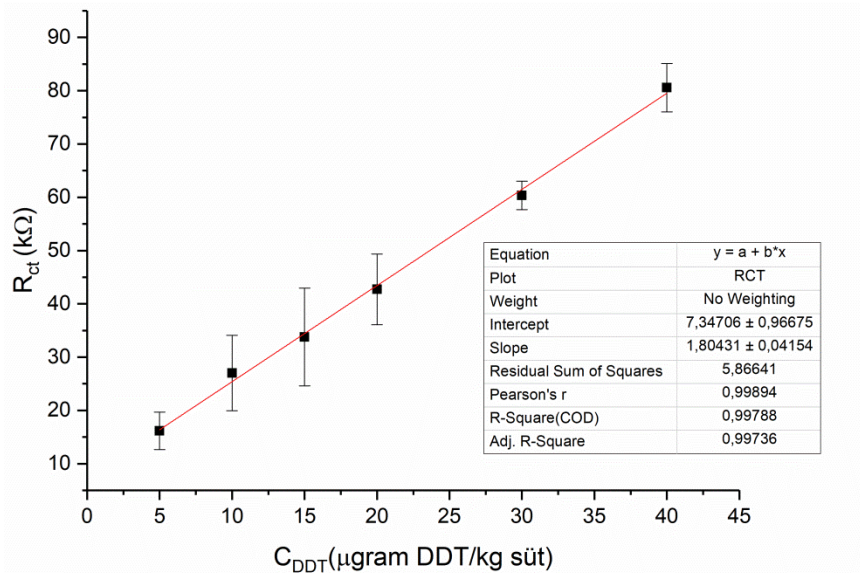
Geliştirilen aptasensörün DDT derişimine bağılı yanıtını gösteren kalibrasyon eğrisi, 0 ile 80 μg DDT/kg süt aralığında derişim artışıyla paralel bir empedans yükselmesi sergileyerek sistemin analitik kararlılığını ortaya koymaktadır. Grafikte düşük konsantrasyonlarda gözlenen keskin eğim artışı sensörün yüksek hassasiyetini kanıtlamakta, yüksek konsantrasyonlara gidildikçe eğimin dengeye yaklaşması ise elektrot yüzeyindeki aktif bölgelerin hedef molekülle verimli şekilde etkileşime girdiğini göstermektedir. Deneysel verilerin teorik modelle gösterdiği yüksek uyum, sensör yanıtının tahmin edilebilir ve tekrarlanabilir olduğunu desteklemektedir. Ayrıca, her bir ölçüm noktası için sunulan hata çubuklarının dar olması, metodun farklı numuneler üzerinde tutarlı ve güvenilir sonuçlar ürettiğinin önemli bir göstergesidir. Bu genel performans verileri, hazırlanan platformun gerçek numunelerde eser düzeydeki DDT miktarını doğru şekilde tayin edebilecek kapasiteye sahip olduğunu doğrulamaktadır.

APT-2 aptameri için elde edilen verilerinin Langmuir modeli ile uyumlandırılması sonucunda K_d değeri $0,00286 \mu\text{g DDT/kg süt}$ (2.86 ng/g) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu düşük K_d değeri, primersiz APT-2 aptamerinin DDT molekülüne karşı yüksek bağlanma afinitesi sergilediğini ve aptamer-DDT kompleksinin kararlı bir yapı oluşturduğunu göstermektedir.

APT-2 aptameri kullanılarak üretilen elektrotlardan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusal davranışa yakın bir eğilim sergilediği görülmektedir. Bununla birlikte, ΔE_p değerleri değerlendirildiğinde, $40 \mu\text{g DDT/kg süt}$ konsantrasyonunun üzerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle, sütte bulunmasına izin verilen maksimum DDT düzeyi olan $40 \mu\text{g DDT/kg süt}$ konsantrasyonunun, ölçüm yapılabilir aralık içerisinde yer almasından dolayı ve APT-2 aptamerinin sensör geliştirme çalışmaları için uygun bir aday olduğu düşünülmektedir.

R_{ct} kalibrasyon grafiğinde, $40 \mu\text{g DDT/kg süt}$ düzeyine kadar en yüksek eğime sahip olan ve dolayısıyla en yüksek hassasiyet gösteren S(2-2-1) koşulunun, süt örneklerindeki DDT düzeylerini kantitatif olarak belirlemek için en uygun koşul olduğu sonucuna varılmıştır.

APT-2 aptameri kullanılarak S(2-2-1) koşulu ile hazırlanan elektroda ait, DDT'nin farklı konsantrasyonları ile aptasensörün ölçtüğü R_{ct} arasındaki ilişki Şekil 4.14.'te verilmiştir.



Şekil 4.15. APT-2 ile hazırlanan elektrodun, S(2-2-1) koşulu için kalibrasyon grafiği

Elde edilen veriler doğrultusunda sensörün geniş konsantrasyon aralığında doğrusal bir yanıt ürettiği görülmektedir. Doğrusal regresyon analizi sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$R_{ct} = 7,35 + 1,804 \cdot C_{DDT} \quad (4.4)$$

Regresyon katsayılarının istatistiksel olarak anlamlı bulunması, sensörün konsantrasyon değişimlerine karşı duyarlı bir elektriksel yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Eğimin $1,804 \pm 0,0415$ olarak hesaplanması, DDT konsantrasyonu arttıkça yük transfer direncinin tutarlı ve ölçülebilir şekilde yükseldiğini ortaya koymaktadır. Kesişim değerinin $7,35 \pm 0,97$ olması ise sensörün düşük konsantrasyonlarda bile ölçüm yapılabilir bir temel sinyal ürettiğini göstermektedir.

Sensör yanıtının doğrusal uygunluğu oldukça yüksek olup, Pearson's r değerinin 0,999 ve R^2 değerinin 0,998 olması, modelin veriyle neredeyse tam uyum içinde olduğunu göstermektedir. Düzeltilmiş R^2 değerinin 0,997 yüksek bulunması da doğrusal modelin sensör yanıtını güvenilir şekilde temsil ettiğini desteklemektedir.

Bu bulgular doğrultusunda aptasensörün 5–40 μg DDT/kg süt aralığında kararlı ve tekrarlanabilir bir sinyal verdiği, dolayısıyla bu aralıkta güvenilir bir kalibrasyon davranışı sergilediği belirlenmiştir. Ölçüm hatalarının düşük, sinyal değişimlerinin ise konsantrasyona net şekilde bağlı olması, geliştirilen aptasensörün DDT tayini için yüksek performanslı ve güvenilir bir elektrokimyasal platform sunduğunu göstermektedir.

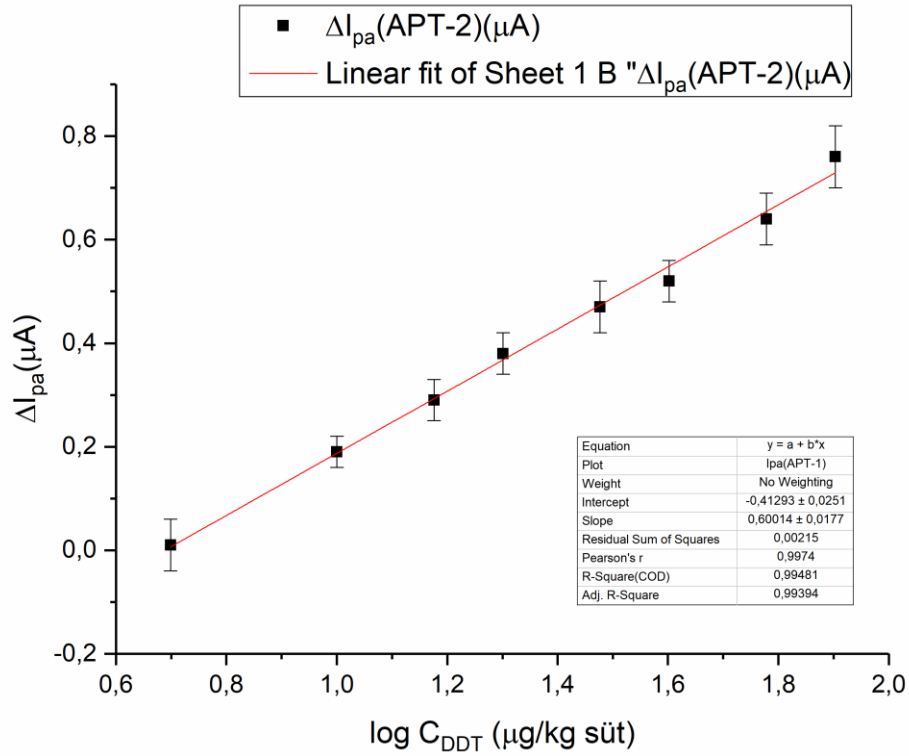
APT-2 ile S(2-2-1) koşullarında hazırlanan sensörün, analiti düşük konsantrasyonlarda tespit edebilme performansını değerlendirmek amacıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesinde, bloklama ölçümlerinden elde edilen standart sapma ($\sigma = 2,13$) ile kalibrasyon eğrisinin eğimi (1,80431) kullanılmıştır.

APT-2 ile S(2-2-1) koşulundaki çalışmada LOD değeri, 4.1 nolu denklemle hesaplatılmış ve yaklaşık 3,89 μg DDT/kg süt olarak bulunmuştur. 4.2 numaralı denklem ile yapılan hesaplama sonucunda ise LOQ değeri yaklaşık 11,80 μg DDT/kg süt olarak elde edilmiştir.

APT-2 aptameri kullanılarak S(2-2-1) koşullarında hazırlanan sensörün, tayin aralığının belirlenmesi amacıyla LOQ (11,80 μg DDT/kg süt) ve LOL(40 μg DDT/kg süt) değerleri kullanılmıştır. Dolayısıyla tayin aralığı 11,80 – 40 μg DDT/kg süt olarak tanımlanmıştır.

Bu sonuçlar, geliştirilen sensörün düşük konsantrasyonlarda dahi analiti güvenilir şekilde tespit ve kantitatif olarak belirleyebilecek hassasiyete sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.2.5. I_{pa} değerlerinden APT-1 ile S(2-2-1) koşullarında üretilen elektrota ait kalibrasyon grafiğinin oluşturulması



Şekil 4.16. APT-1 ile S(2-2-1) koşulunda hazırlanan elektrot ölçümlerinden alınan, DDT konsantrasyonunun logaritmik değerlerine karşı I_{pa} değişim değerleri

Geliştirilen aptasensörün performansını değerlendirmek amacıyla hazırlanan ve Şekil 4.16'da verilen logaritmik kalibrasyon grafiği, DDT derişimindeki değişimin akım yanıtı üzerindeki etkisini lineer bir korelasyonla ortaya koymaktadır. Logaritmik ölçekte elde edilen $R^2 = 0,995$ değeri, sensör yanıtının DDT konsantrasyonundaki değişimlere duyarlı olduğunu göstermektedir. $R^2 = 0,995$ ve ayarlanmış R^2 değerinin 1'e oldukça yakın olması, deneysel verilerin doğrusal modele yüksek uyum sağladığını ve ölçümlerin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu ortaya koymaktadır. Eğim değerinin pozitif yönlü olması, hedef molekül derişimi arttıkça yüzeydeki biyolojik etkileşimin akım değişimini sistematik bir biçimde tetiklediğini göstermektedir.

Grafikte her bir ölçüm noktası için sunulan hata çubuklarının dar olması ve verilerin regresyon doğrusu üzerinde homojen dağılımı, metodun tekrarlanabilirliğinin ve hassasiyetinin yüksek olduğunu desteklemektedir. Özellikle logaritmik modelin tercih edilmesi, sensörün çok düşük derişimlerden yüksek derişimlere kadar uzanan geniş bir analitik çalışma aralığında etkin bir ölçüm kapasitesine sahip olduğunu doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, S(2-2-1) optimizasyonu ile hazırlanan sensörün, numunelerdeki DDT miktarını logaritmik bir hassasiyetle ve yüksek doğrulukla raporlayabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, primersiz APT-2 aptamerinin DDT tayini için geniş bir doğrusal aralıkta, yüksek hassasiyet ve güvenilirlik sunduğunu göstermektedir.

Gürültü sinyaline karşılık gelen veya en düşük çalışılan konsantrasyon olan 5 µg DDT/kg süt çözeltisinden elde edilen standart sapma değeri 0,02 olarak hesaplanmıştır. Sinyal/gürültü = 3,3 yaklaşımı esas alınarak, %99,9 güven sınırı içerisinde LOD değeri Şekil 4.32'deki doğru denkleminde, LOD 6,28 µg DDT/kg süt, LOQ değeri ise 20,73 µg DDT/kg süt olarak hesaplanmıştır.

4.2.2.6. APT-1 ve APT-2 aptamerlerinin karşılaştırılması

Bu çalışma kapsamında kullanılan aptamerlerden APT-1, SELEX sürecinde kullanılan primer dizilerini içerecek şekilde sentezlenmiş primerli aptamer olarak tasarlanmış ve kullanılmıştır. APT-2 ise APT-1 aptamer dizisinden primer bölgeleri çıkarılarak elde edilen, yalnızca hedef molekülün tanınmasından sorumlu özgül diziyi içeren primersiz aptamer formu olarak sentezlenmiş ve deneysel çalışmalarda değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım ile primer dizilerinin aptamer-DDT etkileşimi, bağlanma afinitesi ve elektrokimyasal sensör performansı üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Primersiz aptamerlerin kullanımı, biyosensör uygulamalarında son yıllarda giderek artan bir ilgi görmektedir. Aptamer dizilerinin primer bölgelerinin uzaklaştırılması, bağlanmadan sorumlu çekirdek yapının korunmasını sağlarken, sensör performansını olumsuz etkileyebilecek yapısal fazlalıkların ortadan kaldırılmasına olanak tanımaktadır. Literatürde, primersiz aptamerlerin elektrot yüzeyine daha kompakt ve düzenli bir şekilde immobilize olabildiği, bunun da hedef analitin bağlanması sonrasında oluşan elektrokimyasal sinyal değişiminin daha belirgin hale gelmesine katkı sağladığı bildirilmektedir (Stoltenburg ve ark., 2007; Song ve ark., 2008).

Bununla birlikte, aptamer uzunluğunun azaltılması, molekülün esnekliğini düşürerek elektrot yüzeyine yakın konumlanmasını sağlamak ve bu durum özellikle elektrokimyasal sensörlerde elektron transfer süreçlerinin daha etkin bir şekilde modüle edilmesine olanak vermektedir. Daha kısa aptamer dizileri, sterik engellerin azalması ve non-spesifik etkileşimlerin sınırlandırılması açısından da avantaj sağlamaktadır (Cho et al., 2009). Ayrıca primersiz aptamerlerin kimyasal sentezinin daha kolay ve maliyet açısından daha avantajlı olması, pratik uygulamalarda tercih edilme nedenleri arasında yer almaktadır.

Öte yandan, primer bölgelerin uzaklaştırılması bazı durumlarda aptamerin üç boyutlu katlanma stabilitesini olumsuz etkileyebilmekte ve hedef analite karşı bağlanma afinitesinde azalmaya yol açabilmektedir. Bu nedenle primersiz aptamerlerin kullanımı, bağlanma bölgesinin doğru şekilde tanımlandığı ve hedef analit ile özgül etkileşimin korunabildiği durumlarda avantajlı olmaktadır. Aksi hâlde, aşırı kısaltılmış diziler sensör yanıtında düzensizliklere veya duyarlılık kaybına neden olabilmektedir (Ellington ve Szostak, 1990; McKeague ve DeRosa, 2012).

Langmuir modeli ile yapılan uyumlandırmalar sonucunda primerli APT-1 aptameri için K_d değeri 0,00256 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt, primersiz APT-2 aptameri için ise 0,00286 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt olarak hesaplanmıştır. Her iki aptamerin de düşük K_d değerleri sergilemesi, DDT'ye karşı yüksek bağlanma afinitesine sahip olduklarını göstermektedir. APT-1 aptamerinin APT-2'ye kıyasla daha düşük K_d değerine sahip olması, primer dizilerinin aptamerin üç boyutlu konformasyonunu stabilize ederek hedef molekül ile etkileşimi kısmen güçlendirdiğini düşündürmektedir. Literatürde, SELEX sürecinde kullanılan primer dizilerinin bazı aptamerlerde bağlanma bölgesinin yapısal bütünlüğünü destekleyerek afinitenin artmasına katkı sağlayabildiği rapor edilmiştir (Song ve diğ., 2012).

Buna karşın, primersiz APT-2 aptamerinin primerli forma oldukça yakın bir K_d değeri göstermesi, DDT bağlanmasından sorumlu fonksiyonel çekirdek bölgenin primer dizilerinden bağımsız olarak da etkinliğini koruduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, primer dizilerinin bazı sistemlerde sterik engel oluşturabildiği veya hedef bağlanma bölgesine dolaylı etki ederek bağlanma afinitesini sınırlayabildiğine dair literatür bulguları ile uyumludur (Ellington ve Szostak, 1990; Tuerk ve Gold, 1990). Dolayısıyla elde edilen sonuçlar, DDT–aptamer etkileşiminin esas olarak aptamerin özgül tanıma dizisi tarafından belirlendiğini, primer dizilerinin ise bağlanma afinitesi üzerinde sınırlı fakat ölçülebilir bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

APT-1 ve APT-2 için aptamer için yapılan çalışmalardan elde edilen analitik performansların karşılaştırması Çizelge 4,8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. APT-1 ve APT-2 aptamerlerinin analitik performans karşılaştırmaları

Analitik Parametreler	APT-1	APT-2
Ölçülebilir konsantrasyon aralığı	5-80	5-80
(µg DDT/kg süt)		
Kalibrasyon eşitliği	$\Delta I_{pa}=0,40814 \cdot \log (C_{DDT})$ -0,17545	$\Delta I_{pa}=0,60014 \cdot \log (C_{DDT})$ -0,41293
Eğim ± standart sapma	$0,40814 \pm 0,04501$	$0,60014 \pm 0,0251$
y-eksenini kesim noktası	-0,17545	-0,41293
LOD (µg DDT/kg süt)	6,82	6,28
LOQ (µg DDT/kg süt)	22,506	20,724
R² değeri	0,93198	0,99481
K_d değeri (µg DDT/kg süt)	0,00256	0,00286

Çizelge 4.8’de sunulan analitik veriler doğrultusunda, APT-1 ve APT-2 ile üretilmiş biyosensörlerin performans karakteristikleri karşılaştırıldığında, her iki sistemin de 5-80 µg DDT/kg süt konsantrasyon aralığında yanıt verdiği görülmektedir. Analitik duyarlılık açısından APT-2 sensörü, 0,60014’lük eğim değeri ile APT-1’in (0,40814) önüne geçerek hedef analite karşı daha yüksek bir hassasiyet sergilemiştir. Bu hassasiyet artışına paralel olarak APT-2 sistemi, 6,28 µg DDT/kg süt değeri ile APT-1’e (6,82 µg DDT/kg süt) kıyasla daha düşük bir gözlenebilirlik sınırı (LOD) sunarak eser miktardaki analizlerde daha avantajlı bir konumda yer almaktadır.

Doğrusallık ve güvenilirlik parametreleri incelendiğinde, APT-2 sensörünün 0,995 değerindeki R² katsayısı, APT-1’in 0,932 olan değerine göre çok daha yüksek bir regresyon başarısına ve ölçüm kararlılığına işaret etmektedir. Ayrıca, APT-1 için 0,00256 ve APT-2 için 0,00286 olarak belirlenen K_d değerlerinin birbirine oldukça yakın olması, yüzey modifikasyonlarındaki farklılıklara rağmen biyoreseptörlerin hedef moleküle olan ilgisinin benzer seviyede korunduğunu ortaya koymaktadır. Genel bir değerlendirme yapıldığında, APT-2 modifikasyonunun hem daha yüksek korelasyon katsayısı hem de daha düşük LOD değeri sayesinde süt örneklerinde DDT tayini için APT-1 sistemine göre çok daha üstün ve güvenilir analitik parametreler sunduğu sonucuna varılmaktadır.

4.3. *In Silico* Çalışmalar

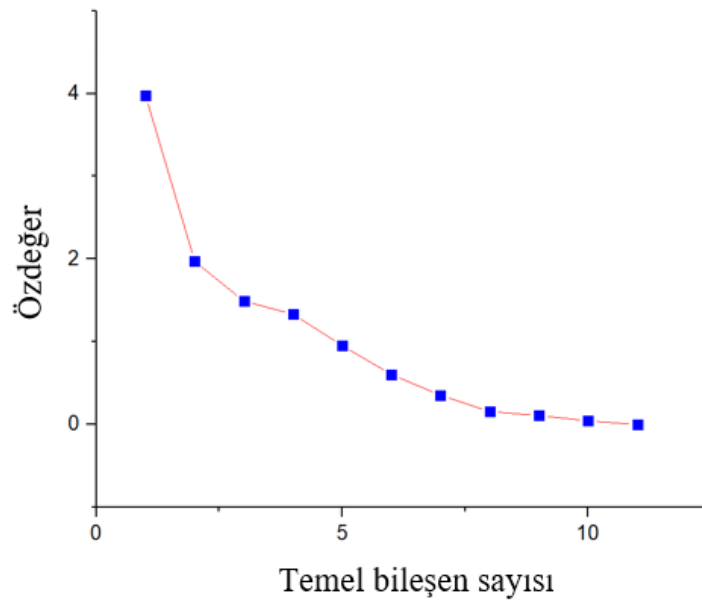
Literatürde DDT için aptamer üretimi yapan Zhang ve diğ. tarafından SELEX yöntemiyle primerleri ile 17 farklı aptamer tasarlanmıştır (Çizelge 4.9). Bu çalışmada bu aptamerler arasından yapılan tasarımında, deneysel SELEX süreci sonrasında *in silico* yöntemler kullanılmıştır. İlk olarak aptamer dizilerinin ikincil ve üç boyutlu yapıları Mfold/RNAComposer ile modellenmiştir. Böylece yüksek afiniteli adayların ön elemesi sağlanarak hem zaman hem maliyet avantajı elde edilmeye çalışılmıştır.

Çizelge 4.9. SELEX ile 13 tur sonrasında kütüphane klonlarından elde edilen aptamer dizileri (primerleri ile birlikte)

Aptamer ismi	Aptamer dizisi (5'-3' yönünde)
DDT_02	TCCAGCACTCCACGCATAACAGTTCGAGGCAACAAGGCTGATCAGTCTGATGTTTGA AATGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_03	TCCAGCACTCCACGCATAACCGTCCACTGCTCGAATACAGCTTCGTCTCTTGCCAAGT GTGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_06	TCCAGCACTCCACGCATAACCGCGCCACTCCAGAGAGTACATTCCAGTTCGGGCCACA TTTGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_08	TCCAGCACTCCACGCATAACCCACCACCGACAATAACCTTCGCGGAACAACTGGG GTCTCGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_10	TCCAGCACTCCACGCATAACCCAGGCGCACACTCGTTCCACTCTCAGTTAAGCAAAC CGTGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_13	TCCAGCACTCCACGCATAACGAATTGTGCTCAATGCGCCCCTGCAGTGAATGTGG AATTTGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_14	TCCAGCACTCCACGCATAACCACCCACGTAAGTGCCTAATAAGAATTGGTCATCGTTT CCCCGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_16	TCCAGCACTCCACGCATAACCACGCCGTCCGTGCATACACGCTCCGTCAACACGTCCT TCTGGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_18	TCCAGCACTCCACGCATAACCGCCGTACTTACTACTCTGCCACCAAATACATGCACT ACCCGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_19	TCCAGCACTCCACGCATAACCGACCAACTGTCTCGTGGTTGGTCCGACTACTCAGCT CGGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_23	TCCAGCACTCCACGCATAACCTGGCAACAACATTCGCTACGACCTGAAGCTCCTGAC CTTTGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_24	TCCAGCACTCCACGCATAACCGCCCAGATAGCCTGAACGATCGACAGTGAATCACC CTCAGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_26	TCCAGCACTCCACGCATAACCCGCAAGGTGGGTCCGACCTTTCCCCGCTTATACAGA CGTCGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_27	TCCAGCACTCCACGCATAACGAAGACATGCCCCGCAATGGATGTTGTTGGACCTGTT TGAGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_28	TCCAGCACTCCACGCATAACCGATCGCACCCTCGTGTCAATTGGATTCCACTAGGC CCCCGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_34	TCCAGCACTCCACGCATAACCCAGGACCGACCCCGCAGACTACAAAGTGTCATAA GCAATGTTATGCGTGCGACGGTGAA
DDT_35	TCCAGCACTCCACGCATAACCCACAATCCAAGCCGGTCCATCAATGCGGTTATCCA TCCTGTTATGCGTGCGACGGTGAA

Bu aptamerlerden, DDT'ye karşı bağlanma kapasitesi en yüksek olan ve DDT_13 olarak adlandırılan formdur (Zhang, 2020). Çalışmanın ilk kısmında kullanılan ve APT-1 olarak isimlendirilen aptamer, DDT_13'ün primerleri dahil 80 baz uzunluğundaki dizilimidir. APT-1 ile yapılan deneyler sonrasında *in silico* olarak Zhang ve diğ. yaptığı çalışmada elde edilen ve Çizelge 4.4'te verilen diğer aptamerler, PCA metodu ile analiz edilerek DDT_13 ile yapısal ve işlevsel benzerlikleri karşılaştırılmıştır.

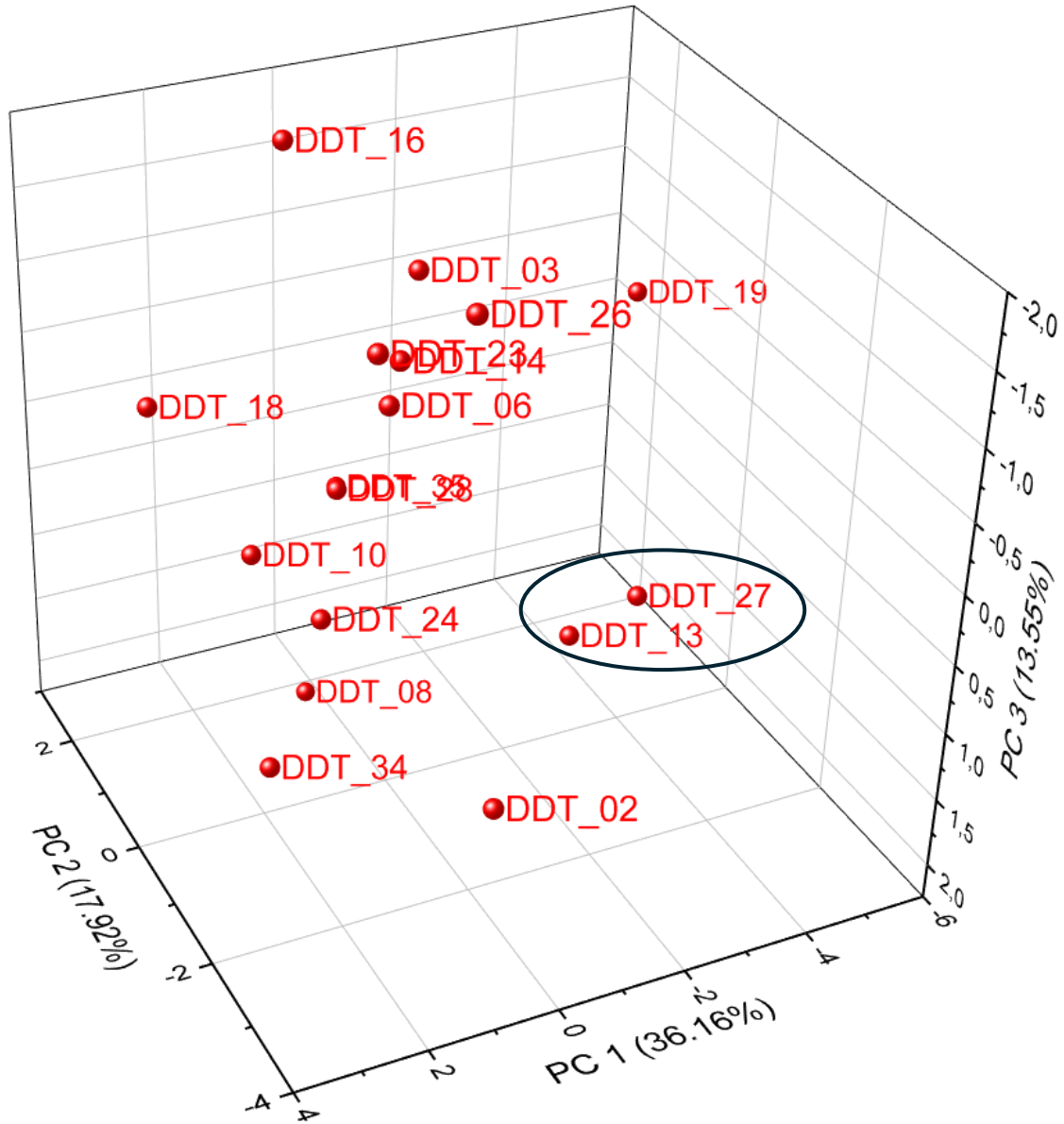
Verilerin çok değişkenli yapısını değerlendirmek, çalışmada aptamerlerin sahip olduğu çok değişkenli verilerin boyut indirilmesi ve örnekler arası ilişkilerin daha anlaşılır hale getirilmesi amacıyla PCA uygulanmıştır. PCA, değişkenler arasındaki korelasyonları azaltarak, verilerdeki varyansı maksimum açıklayan yeni bileşenler oluşturmak üzere kullanılmıştır. Özdeğerler, açıklanan varyans yüzdeleri ve bileşen yükleri değerlendirilmiştir. PCA analizinde özdeğer her bir ana bileşenin veri varyansını ne kadar açıkladığını gösterir. PCA analizinde her bir ana bileşen, verideki varyansın belirli bir oranını açıklar ve bu oran özdeğer ile temsil edilir. Özdeğer, o bileşenin taşıdığı bilgi miktarının (varyansın) göstergesidir. Özdeğeri 1'in üzerinde olan bileşenler genellikle anlamlı kabul edilir (Kaiser kriteri). Bu kriter gereğince özdeğeri 1'den küçük olan bileşenler, tek bir değişken kadar bile bilgi taşıyor demektir. Özdeğeri 1'den büyük olan bileşenler, toplam varyansa anlamlı katkı yapacağı için analize alınır. Bundan dolayı bileşen seçiminde Kaiser kriteri esas alınmış ve yalnızca özdeğeri 1'in üzerinde olan bileşenler analizde değerlendirilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Temel bileşen sayısına karşı özdeğer grafiği (Scree plot)

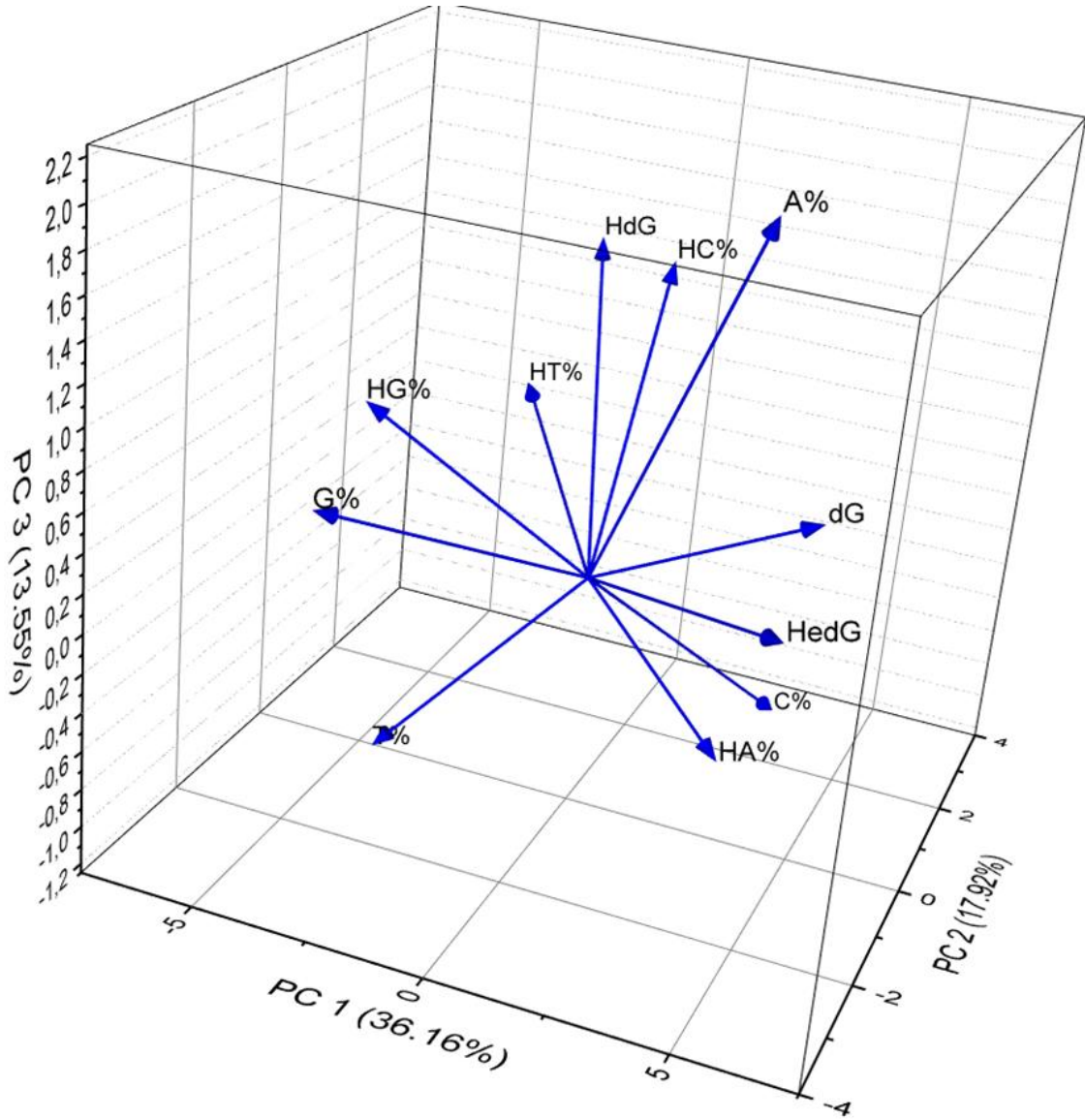
Karşılaştırma sırasında aptamerlerin içerdikleri timin (T), adenin (A), guanin (G) ve sitozin (C) sayıları ve yüzde olarak oranları, aptamerin Gibbs serbest enerjisi (ΔG), aptamerlerin entalpileri (H), heliks ve saç tokası yapılarının entalpileri ($he\Delta G$) ve ($h\Delta G$); gibi termodinamik özellikleri karşılaştırılarak temel bileşenleri olacak şekilde toplam 12 özelliği analiz edilmiştir.

Elde edilen scree plot incelendiğinde, ilk üç bileşenin özdeğerlerinin 1'in üzerinde olduğu ve sırasıyla PC1 (%36,16), PC2 (%17,92) ve PC3 (%13,55) olmak üzere toplam varyansın %67,63'ünü açıkladığı görülmektedir. Bu oran, analiz için yeterli düzeyde kabul edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. PCA skor grafiği: PC 1 (%36,16), PC 2 (%17,92) ve PC3 (%13,55) bileşenlerine göre her bileşenin açıkladığı varyans yüzdeleri

PCA skor grafiğinde (Şekil 4.18), örneklerin PC1, PC2 ve PC3 bileşenlerine göre üç boyutlu düzlemde dağıldığı görülmektedir. Bu dağılım, örnekler arasında yapısal benzerlik ya da farklılıkları değerlendirmek açısından önemli ipuçları vermektedir. Özellikle DDT_13 ve DDT_27 örneklerinin PCA uzayında birbirine oldukça yakın konumlandığı gözlemlenmiş ve bu durum, bu iki örneğin istatistiksel olarak benzer özellikler taşıdığını düşündürmüştür.



Şekil 4.19. PCA yükleme grafiği: PC 1 (%36,16), PC 2 (%17,92) ve PC3 (%13,55) bileşenlerine göre her bileşenin açıkladığı varyans yüzdeleri

PCA yükleme grafiği (Şekil 4.19) ise değişkenlerin PCA bileşenlerine olan katkılarını göstermektedir. Burada, vektörlerin uzunluğu ve yönü, ilgili değişkenin analizdeki etkisini temsil eder (Jolliffe ve Cadima, 2012). Bu değişkenlerin PCA skor

grafisindeki örnek konumlanmalarını etkilediği ve gruplamaya katkı sağladığı sonucuna varılmıştır.

PCA analizi sonucunda, ilk üç bileşenin toplam varyansın %67,63'ünü açıkladığı belirlenmiştir. Scree plot değerlendirmesi, “dirsek” noktasının 3. bileşende oluştuğunu göstermiştir. PC1 bileşeni özellikle dG ve HedG gibi yapısal parametreler ile yüksek korelasyon göstermektedir. PC2, C% ve HT% gibi nükleotid içeriği değişkenlerini yansıtırken, PC3 daha çok A%, HC% ve HG% gibi baz içeriklerine dayalı varyasyonu temsil etmektedir. Eğer tüm PCA analizinde en önemli değişkeni tek bir taneye indireceksek, “dG değişkeni” bu veri setinde en etkili olandır çünkü en fazla varyans açıklayan ilk bileşende en yüksek katkıya sahiptir.

PCA skor grafiğinde, DDT_13 numaralı örnek ile DDT_27 numaralı örneğin PCA uzayında birbirine oldukça yakın konumlandığı görülmektedir. Bu durum, bu iki örnek arasında yapısal ve istatistiksel benzerlik olduğunu göstermektedir. Benzer örnek profilleri, analiz edilen biyokimyasal ya da genetik parametrelerin yakın değerlerde olduğunu düşündürmektedir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak ssDNA aptamerlerinin yanında, PCA analizi ile *in-silico* olarak seçilen ve APT-3 olarak isimlendirilen

5'-GAATTGTGCTCAATGCGCCCCTGCAGTGAATGTGGAATTT-3'

diziliminin tiyollenmiş formu çalışmada kullanılmıştır. APT-2 ile yapılan denemelerdeki aynı koşullarda APT-3 aptameri ile de yapılmıştır.

4.3.1. APT-3 aptameri ile hazırlanan elektrotların stabilizasyonu

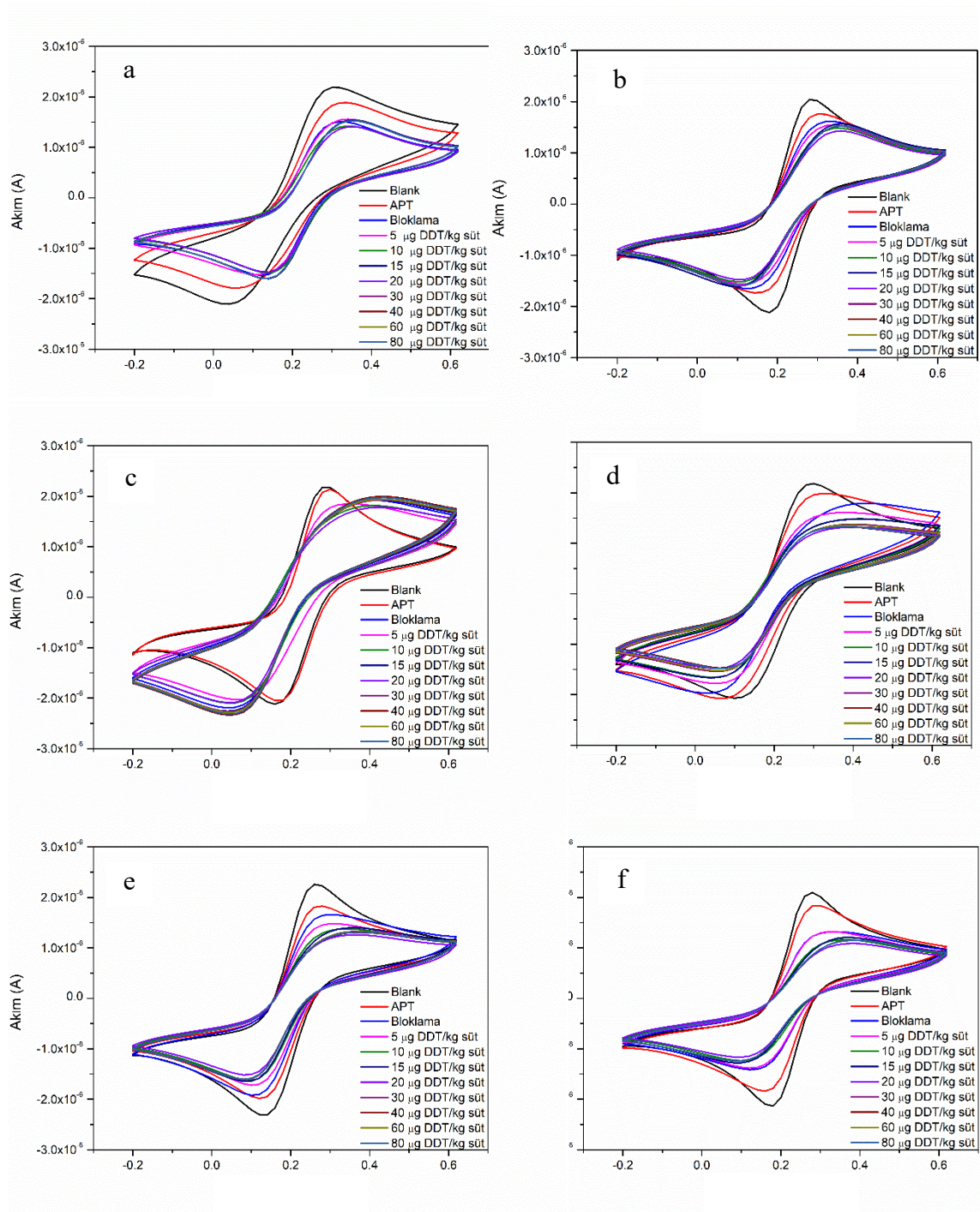
APT-3 aptameri ile modifiye edilen elektrotların stabilizasyonu amacıyla, APT-1 ve APT-2'de olduğu gibi elektrokimyasal temizlik ve yüzey dengeleme sürecinde kaydedilen dönüşümlü voltammogramlar değerlendirilmiştir. Ardışık taramalar boyunca altına ait karakteristik oksidasyon ve indirgenme piklerinin konumları ve akım değerleri izlenmiş, böylece elektrot yüzeyinin elektrokimyasal olarak kararlı bir duruma ulaşmış ve ulaşmadığı kontrol edilmiştir.

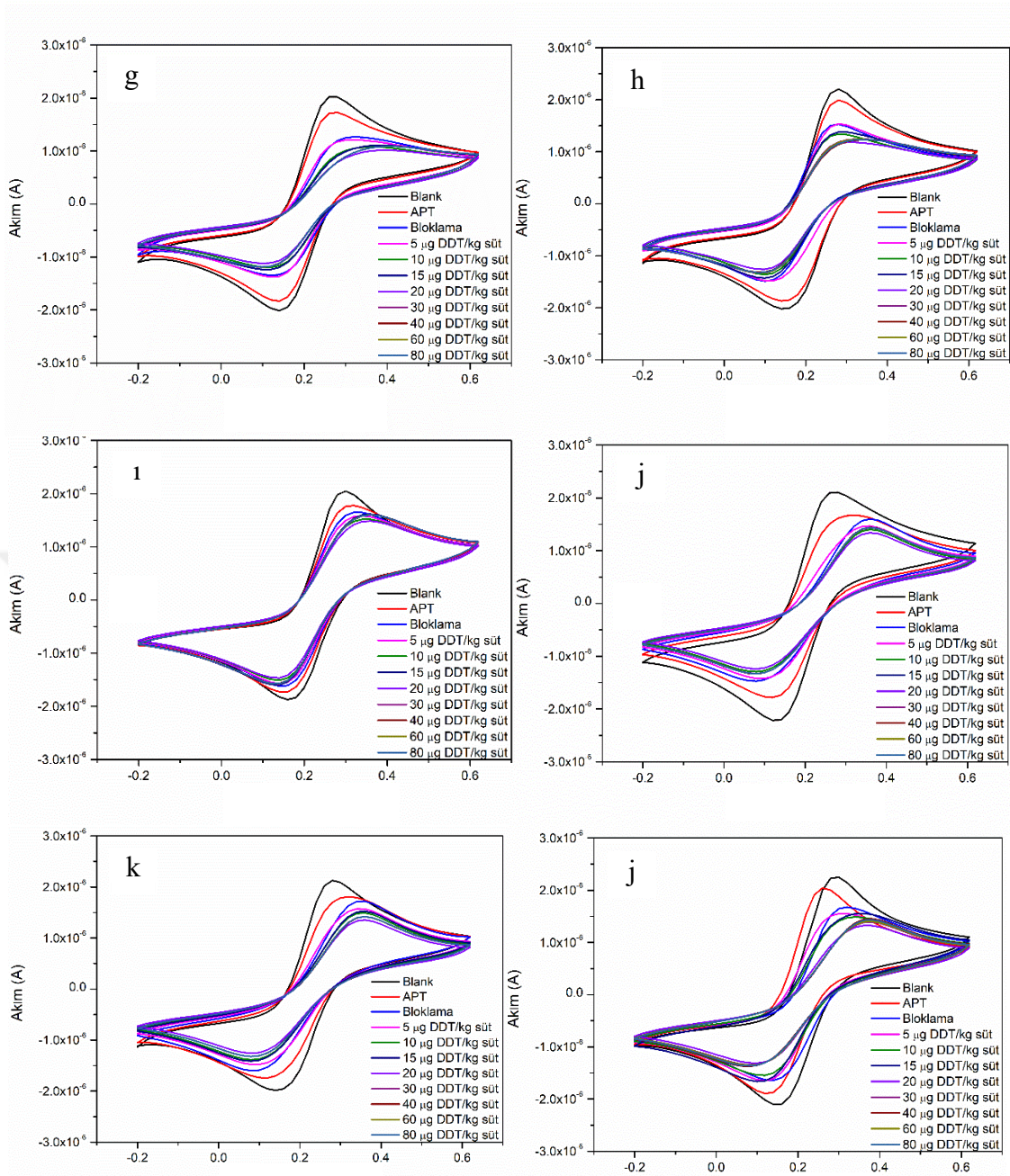
4.3.2. APT-3 aptameri ile hazırlanan elektrot performanslarının karşılaştırılması

APT-3 ile hazırlanan elektrotların performansları; APT-1 ve APT-2'de olduğu gibi CV ve EIS grafikleri, hem R_{ct} değerlerindeki değişimler hem de I_{pa} değerlerindeki düşüşler göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır.

4.3.2.1. APT-3 aptameri ile hazırlanan elektrotların elektrokimyasal performanslarının değerlendirilmesi

APT-3 ile yapılan çalışmaların yine 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 μg DDT/kg süt olacak şekilde süt içerisinde DDT çözeltileri ile ölçümler yapılmıştır. Aptamer immobilizasyonu gerçekleştirilmiş elektrotlarda, anodik ve katodik pik akım değerlerinin, modifiye edilmemiş Au elektrotlara kıyasla azaldığı, aptamer kaplanmış elektrot denemelerinde de gözlenmiştir. Sensör üretimi çalışmaları sırasında elde edilen dönüşümlü voltammogramları toplu bir şekilde Şekil 4.34.'te verilmiştir.

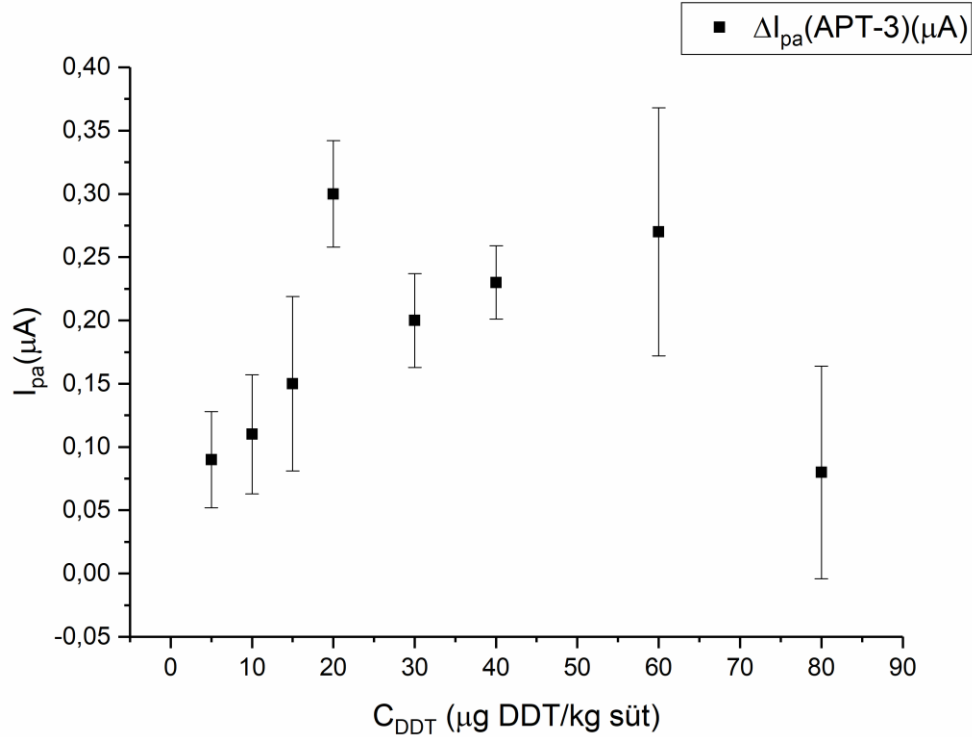




Şekil.4.20. Elektrotların APT-3 aptameri ile kaplanması ve örneklerde ölçümlerin alınması sırasında elde edilen dönüşümlü voltammogramları; a: S(1-1-0,5), b:S(1-1-1), c: S(1-1-2), d: S(1-2-0,5), e: S(1-2-1), f: S(1-2-2), g: S(2-1-0,5), h: S(2-1-1), i: S(2-1-2), j: S(2-2-0,5),k: S(2-2-1), l: S(2-2-2)

Şekil 4.20’de sunulan APT-3 aptameri ile hazırlanan sensörlerin dönüşümlü voltammogramları incelendiğinde, tüm deney koşullarında aptamer immobilizasyonu ve bloklama işlemleri sonrasında anodik ve katodik tepe akımları arasındaki farkın arttığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, yarım yağlı süt içerisinde hazırlanan DDT çözeltilerine ait veriler değerlendirildiğinde, konsantrasyon artışıyla orantılı bir tepe akımı değişimi beklenmesine rağmen, ölçümlerde ya tepe akımlarının birbirleriyle

çakıştığı ya da konsantrasyonla uyumlu olmayan düzensiz bir değişim sergilediği belirlenmiştir (Şekil 4.21). Ayrıca DDT konsantrasyonundaki artışa rağmen reaksiyon sırasında elde edilen I_{pa} değerlerinin düzensiz bir şekilde sonuç verdiği tespit edilmiştir.



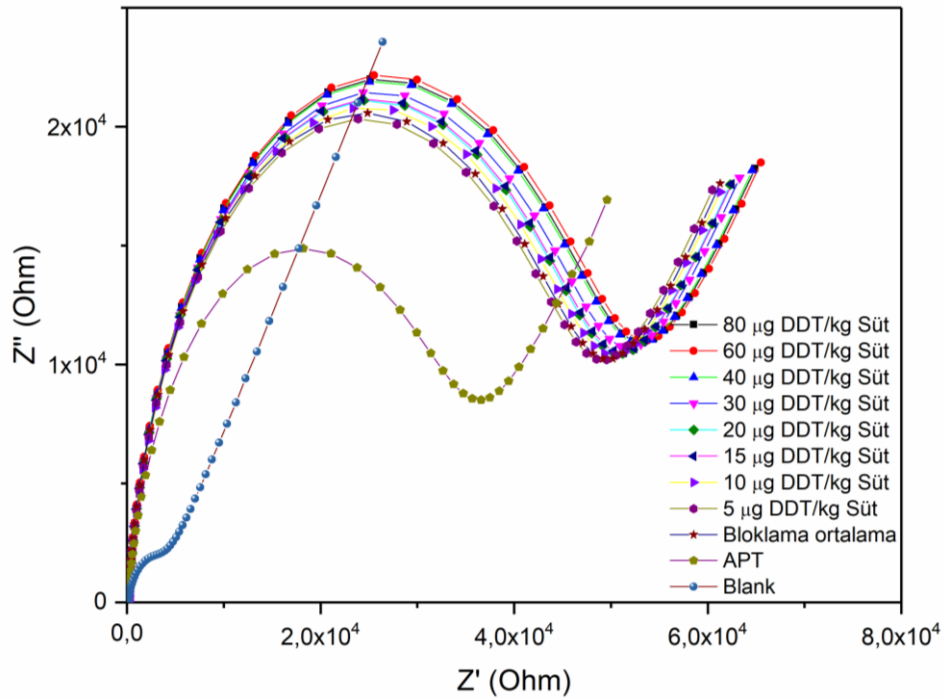
Şekil 4.21. APT-3 ile S(2-2-1) koşulunda hazırlanan elektrot ölçümlerinden alınan, DDT konsantrasyonunun logaritmik değerlerine karşı I_{pa} değişim değerleri

APT-3 aptameri kullanılarak elde edilen ΔI_{pa} değerleri, DDT konsantrasyonundaki artışla beklenen şekilde düzenli bir değişim göstermemektedir. 5–20 $\mu\text{g DDT/kg süt}$ gibi düşük konsantrasyon aralığında sinyalde artış gözlenmesine rağmen, orta ve yüksek konsantrasyonlarda sensör cevabının kararsızlaştığı, hata çubuklarının belirgin biçimde büyüdüğü ve sinyalin doğrusal eğilimden saptığı görülmektedir.

4.3.2.2. APT-3 ile hazırlanan elektrot çalışmalarından alınan EIS grafiklerinin yorumlanması

Diğer aptamerlerde en uygun sensör hazırlık koşulu olarak belirlenen S(2-2-1) koşulunda üretilen sensörlerden elde edilen ortalama EIS spektrumu (Şekil 4.22) incelendiğinde, DDT konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak sistemin toplam empedansında belirgin bir yükselme beklenmesine karşın bu yönde bir artış eğilimi

gözlemlenmemiştir. Bu bulgu, tüm elektrot hazırlık koşulları için geçerli olup, dönüşümlü voltammogramlarında kaydedilen ΔI_{pa} değerleri arasında da beklenen gidişatta bir değişimin ortaya çıkmamasıyla da tutarlılık göstermektedir.

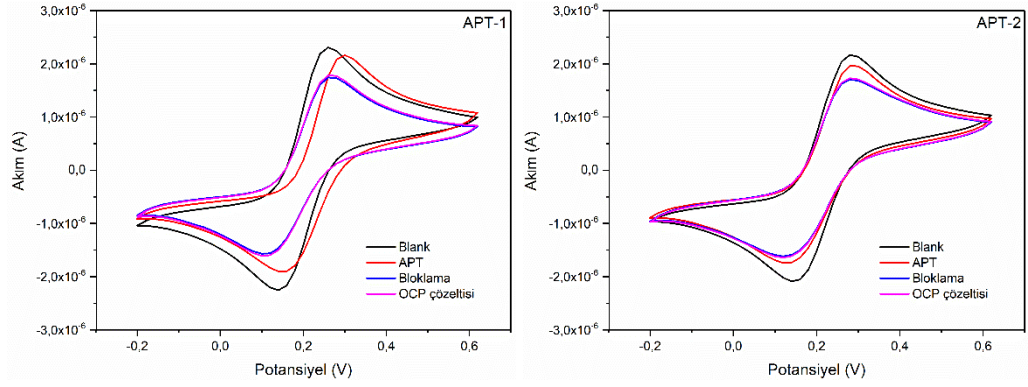


Şekil 4.22. APT-3 aptameri ile kaplanan elektrotlar ile S(2-2-1) koşulundaki deneyeler sırasında alınan ortalama empedans spektrumu

4.4. Girişim Etkisinin İncelenmesi

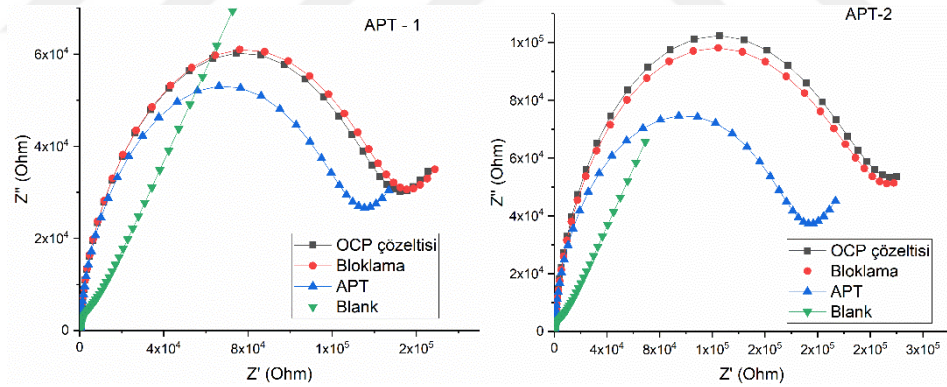
Empedimetrik aptasensör platformu hem APT-1 hem de APT-2 aptameri için aday olarak belirlenen seçicilik ve girişim etkisine karşı performansını değerlendirmek amacıyla, 3 farklı AuE ile girişim analizi gerçekleştirilmiş ve ortalama değerler standart sapmaları ile verilmiştir. Bu doğrultuda, organoklorlu ve organik pestisit sınıflarından atrazin, aldrin, dieldrin ve β -endosülfan bileşiklerini eşit konsantrasyonlarda içeren bir süt matrisi hazırlanmıştır. Bu pestisitler, DDT ile aynı gıda ortamlarında bulunabilmeleri ve benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları nedeniyle özellikle seçilmiştir.

Sensör yüzeyinin bloklanması sonrasında hazırlanan pestisit karışımı AuE'ler üzerinde inkübe edilmiş ve aptamer dizisinin hedef dışı moleküllere karşı bağlanma eğilimi değerlendirilmiştir. bunun için alınan döngüsel voltammogramları Şekil 4.23'te, EIS grafikleri Şekil 4.24'te, sunulmuştur.



Şekil 4.23. Optimum koşullarda APT-1 ve APT-2 ile hazırlanan aptasensörlerin girişim etkisinin incelenmesi için alınan döngüsel voltammogramlar

İnkübasyon sonrasında elde edilen döngüsel voltammogram verileri incelendiğinde, APT-1 ile hazırlanan aptasensör için OCP çözeltisinden elde edilen I_{pa} değeri ile blokama sonrası ölçülen I_{pa} değeri arasındaki fark artış yönünde $0,04 \pm 0,13 \mu A$ olarak hesaplanmıştır. APT-2 için ise bu fark yine artış yönünde $0,02 \pm 0,19 \mu A$ olarak belirlenmiştir. Her iki aptamer için gözlenen I_{pa} değerlerindeki değişimlerin, standart sapma aralıkları içerisinde yer alması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.24. Optimum koşullarda APT-1 ve APT-2 ile hazırlanan aptasensörlerin girişim etkisinin incelenmesi için alınan EIS grafikleri

İnkübasyon sonrasında elde edilen EIS verilerinin analizi sonucunda, APT-1 ile hazırlanan aptasensör için OCP çözeltisinden elde edilen R_{ct} değeri ile blokama sonrası ölçülen R_{ct} değeri arasındaki fark $0,6 \pm 1,5 k\Omega$ olarak belirlenmiştir. APT-2 için ise bu fark $1,5 \pm 2 k\Omega$ olarak hesaplanmıştır. Her iki aptamer için gözlenen R_{ct} artışlarının, standart sapma aralıkları içerisinde yer alması nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu bulgu, hem APT-1 hem de APT-2 aptamerinin söz konusu pestisitlerle ölçülebilir düzeyde etkileşime girmediğini ve sensör yüzeyinde non-spesifik bağlanmanın düşük olduğunu göstermektedir.

4.5. Ticari Süt ve Süt Ürünü Örneklerinde DDT Varlığı Tespiti

Piyasada ticari olarak satışa sunulan farklı markalara ait 10 yarım yağlı UHT süt örneği, 5 yarım yağlı yoğurt örneği ve 5 kefir örneği analiz edilmiştir. Süt örnekleri herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan, kefir örnekleri ise elektrot yüzeyinde aşırı birikimi önlemek amacıyla 1:1 (v/v) oranında saf su ile seyreltilerek incelenmiştir. Yoğurt örneklerinde ise analizin yoğurt suyunda gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur. Tüm ölçümler, APT-2 aptameri ile fonksiyonelleştirilen elektrotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analizler sonucunda, yalnızca bir ticari süt örneğinin R_{ct} değerinin bloklamadan farklı 48,8 k Ω olan ve ΔI_{pa} değeri 0,33 μA çıkan ölçümler alınmıştır. APT-2 için $\log(C_{DDT})$ değerine karşı ΔI_{pa} verilerinden elde edilen ve denklem 4.5'te gösterilen kalibrasyon denkliğinde yerine konulduğunda kilogram başına 22,6 μg DDT tespit edilmiş olup, bu değer mevcut yasal limitin altında olarak değerlendirilmiştir.

$$\Delta I_{pa} = 0,60014 \cdot \log(C_{DDT}) - 0,41293 \quad (4.5)$$

Yoğurt örneklerinde herhangi bir DDT varlığına rastlanmamıştır. Kefir örneklerinde de sensör tarafından herhangi bir sinyal değişikliği, dolayısıyla DDT tespit edilmemiştir.

4.6. APT-2 ile Hazırlanan Elektrotların Raf Ömürleri Test Sonuçları

Aptasensör raf ömrü testleri için 3 farklı AuE, APT-2 ile S(2-2-1) koşuluyla hazırlanmış ve ilk gün (0. gün), 7. gün ve 14. Gün; 40 μg DDT/kg süt içeren örneğin CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. ΔR_{ct} değerleri ve ΔI_{pa} değerlerindeki değişimler ve değer kayıpları belirlenmiş ve Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. APT-2 ile üretilen aptasensörlerin, 0, 7 ve 14 gün raf ömrü testlerinin sonuna elde edilen ΔR_{ct} ve ΔI_{pa} değerleri, standart sapmaları ve bu değerlerdeki değişimin yüzde olarak oranı

Gün	APT-2			
	ΔR_{ct} (k Ω)	R_{ct} 'ye göre performans kaybı(%)	ΔI_{pa} (μA)	I_{pa} 'ya göre performans kaybı (%)
0	84,6 $\pm$ 4,4	-	0,48 $\pm$ 0,07	-
7	48,7 $\pm$ 3,8	42	0,37 $\pm$ 0,05	23
14	36,9 $\pm$ 3,6	56	0,30 $\pm$ 0,06	37

Elektrotların üretim günü 3 farklı aptasensörden elde edilen ortalama R_{ct} değerlerinin ortalaması alınarak standart sapmaları belirlenmiştir. Aptasensör temel alındığında R_{ct} değerlerindeki düşüş yüzdesi, 7 günlük depolama süresinde %42; 15 günlük depolama süresinde ise %56 oranında bir azalma gözlemlenmiştir. Bu veriler, üretilen sensörlerin yalnızca kısa süreli depolama koşullarına dayanıklı olduğunu göstermektedir. I_{pa} değerlerindeki düşüş yüzdesine göre elektrot performansındaki azalmalar hesaplatıldığında ise 7 gün sonunda %23, 14 gün sonunda ise %37'lik bir azalma belirlenmiştir.

Aptamer temelli sensörlerin uzun dönem stabilitesinin iyileştirilmesine yönelik olarak, çapraz bağlayıcı kimyasallar ile modifikasyon yapılması veya farklı destek tabanlarının kullanımı gibi gelişmiş yaklaşımlar, performans kayıplarını minimize ederek sensörlerin daha uzun süre güvenli ve etkin biçimde kullanılmasını sağlayabilir (Duan ve ark., 2024).

Aptasensör cevabının günler içerisinde azalması çoğunlukla biyoreseptör stabilitesi ile yüzey kimyasına bağlı süreçlerden kaynaklanan bir durumdur. Özellikle aptamerlerin nükleik asit yapıda olması, zamanla konformasyonel bozulmalar ve bağlanma afinitesinin azalmasına yol açabilmektedir. Bu etki, ölçüm koşullarındaki pH, iyonik güç ve sıcaklık değişimlerine karşı aptamerlerin duyarlı olmasıyla daha da belirgin hâle gelmektedir (Song et al., 2008; McKeague ve DeRosa, 2012). Bunun yanı sıra, altın elektrot yüzeylerine tiyol grubu aracılığıyla immobilize edilen aptamerlerin, uzun süreli kullanımda Au-S bağlarının zayıflaması veya yüzeyde meydana gelen oksidatif süreçler nedeniyle kısmen desorbe olabildiği rapor edilmiştir; bu durum aktif bağlanma bölgelerinin azalmasına neden olarak sensör sinyalinde düşüşe yol açmaktadır (Herne ve Tarlov, 1997; Sassolas ve diğ., 2008).

Ayrıca, özellikle karmaşık örnek matrislerinde gerçekleştirilen tekrarlı ölçümler sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen spesifik olmayan adsorpsiyon ve yüzey

kirlenmesi, elektron transferini kısıtlayarak elektrokimyasal sinyalin kademeli olarak azalmasına neden olabilmektedir (Bard ve Faulkner, 2001; Putzbach ve Ronkainen, 2013). Hidrofobik ve kalıcı bir pestisit olan DDT'nin yüzeyde birikme eğilimi göstermesi ve yetersiz rejenerasyon koşulları altında aptamerden tam olarak uzaklaştırılamaması da, sensörün aktif bağlanma kapasitesini zamanla düşüren önemli bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Tüm bu etkilerin birleşimi sonucunda, günler arası ölçümlerde sensör cevabında azalma gözlenmesi beklenen ve literatürle uyumlu bir davranış olup, aptasensörlerin uzun dönem stabilite çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır. (Radi, 2011).

4.7 Elektrotların Tekrarlanabilirlik Testleri

APT-1 ve APT-2 ile hazırlanan aptasensörler ile 3 AuE elektrot kullanılarak, ard arda 15 kez 40 µg DDT/kg süt örneğinde DDT ölçümü yapılmış ve elektrokimyasal performansları açısından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.11). R_{ct} değerinde bloklama değerine karşı elde edilen fark ve I_{pa} değişimi dikkate alınarak yorumlanmıştır.

Çizelge 4.11. APT-1 ve APT-2 ile üretilen aptasensörlerin tekrarlanabilirlik testlerinin sonuna elde edilen R_{ct} ve I_{pa} değişim değerleri ve standart sapmaları

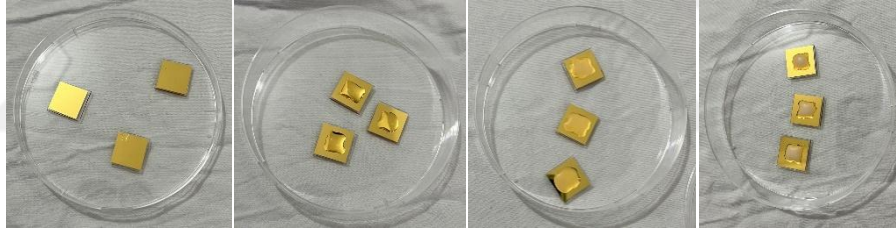
Ölçüm sayısı	APT-1		APT-2	
	ΔR_{ct} (kΩ)	ΔI_{pa} (µA)	ΔR_{ct} (kΩ)	ΔI_{pa} (µA)
1	121,1 ± 3,3	0,52 ± 0,02	82,1 ± 2,4	0,48 ± 0,0
2	120,4 ± 3,6	0,53 ± 0,03	81,9 ± 3,5	0,47 ± 0,0
3	121,3 ± 3,9	0,51 ± 0,04	80,8 ± 2,9	0,48 ± 0,0
4	122,6 ± 4,2	0,53 ± 0,02	81,2 ± 3,6	0,46 ± 0,0
5	123,4 ± 4,1	0,52 ± 0,03	81,6 ± 2,1	0,47 ± 0,0
6	121,5 ± 3,4	0,52 ± 0,03	82,1 ± 1,9	0,49 ± 0,0
7	124,2 ± 2,9	0,51 ± 0,01	81,3 ± 3,1	0,45 ± 0,0
8	123,0 ± 4,3	0,54 ± 0,01	82,4 ± 3,0	0,47 ± 0,0
9	122,9 ± 4,6	0,53 ± 0,02	82,5 ± 2,8	0,49 ± 0,0
10	121,7 ± 5,1	0,52 ± 0,04	83,2 ± 2,7	0,48 ± 0,0
11	121,6 ± 3,8	0,54 ± 0,03	82,6 ± 3,2	0,47 ± 0,0
12	123,3 ± 4,7	0,54 ± 0,04	83,4 ± 3,0	0,49 ± 0,0
13	124,6 ± 5,0	0,53 ± 0,03	83,7 ± 3,2	0,48 ± 0,02
14	122,4 ± 3,6	0,50 ± 0,04	82,8 ± 3,4	0,45 ± 0,04
15	123,0 ± 4,1	0,52 ± 0,05	81,9 ± 2,8	0,47 ± 0,03

Elde edilen veriler doğrultusunda, sensör yanıtlarının ölçümler boyunca büyük ölçüde korunduğunu ve sinyalde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmediğini

göstermiştir. Bu durum, geliştirilen elektrotların kısa süreli kullanımda stabil bir performans sergilediğini ve tekrarlanabilir ölçümler için uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

4.8. Elektrotların Yüzey Karakterizasyonu

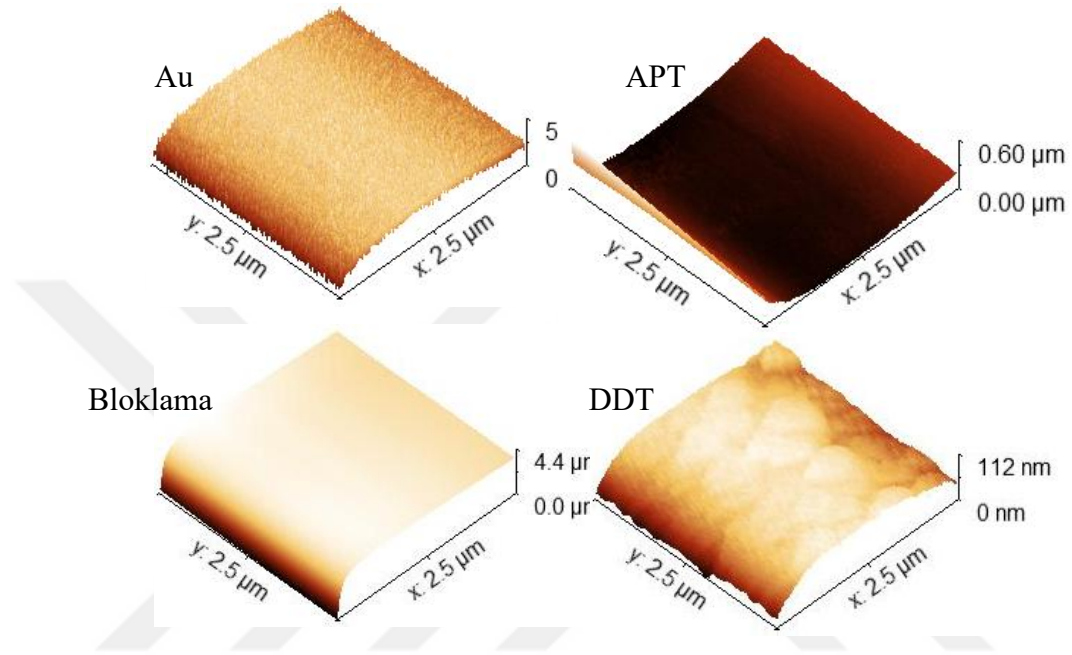
Çalışma kapsamında, buhar biriktirme yöntemiyle Au kaplanmış ITO yüzeyleri hazırlanmış ve Au olarak isimlendirilmiştir. Bunlara ek olarak üç farklı modifikasyon aşamasını temsil eden yüzeyler elde edilmiştir: aptamer ile inkübe edilmiş altın yüzey (APT), aptamer bağlanması sonrasında yağsız süt ile bloklanmış yüzey (Bloklama) ve bloklama sonrası 80 µg DDT/kg süt örneği ile inkübasyona tutulmuş yüzey (DDT) olmak üzere toplam dört farklı yüzey koşuluna ait örnekler hazırlanmıştır (Şekil 4.25). Bu örneklerin yüzey karakterizasyonu için AFM ve temas açısı ölçümü yöntemleri kullanılmıştır.



Şekil 4.25. Yüzey karakterizasyonu amacıyla hazırlanan altın yüzeylerin inkübasyon basamaklarına ait görüntüler: (a) Au, (b) APT, (c) Bloklama, (d) DDT

4.8.1. AFM ölçüm sonuçları

Hazırlanan modifiye edilmiş ve edilmemiş temsili Au yüzeyler AFM görüntüleri alınmış ve Şekil 4.26 ‘da sunulmuştur.



Şekil 4.26. Temsili yüzeylerin AFM görüntüleri;

Yüzey topografisindeki farklılıklar, yüzey kaplamanın etkin şekilde yapıldığını ve yüzeyde pürüzlülük farkı yarattığını göstermektedir.

AFM görüntülerinin RMS pürüzlülük değerleri de Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. AFM ölçümleri sonucunda örnek yüzeylerine ait RMS pürüzlülük değerleri

Örnek	RMS pürüzlülük değeri (nm)
Au	0,07
APT	73,69
Bloklama	474,86
DDT	18,58

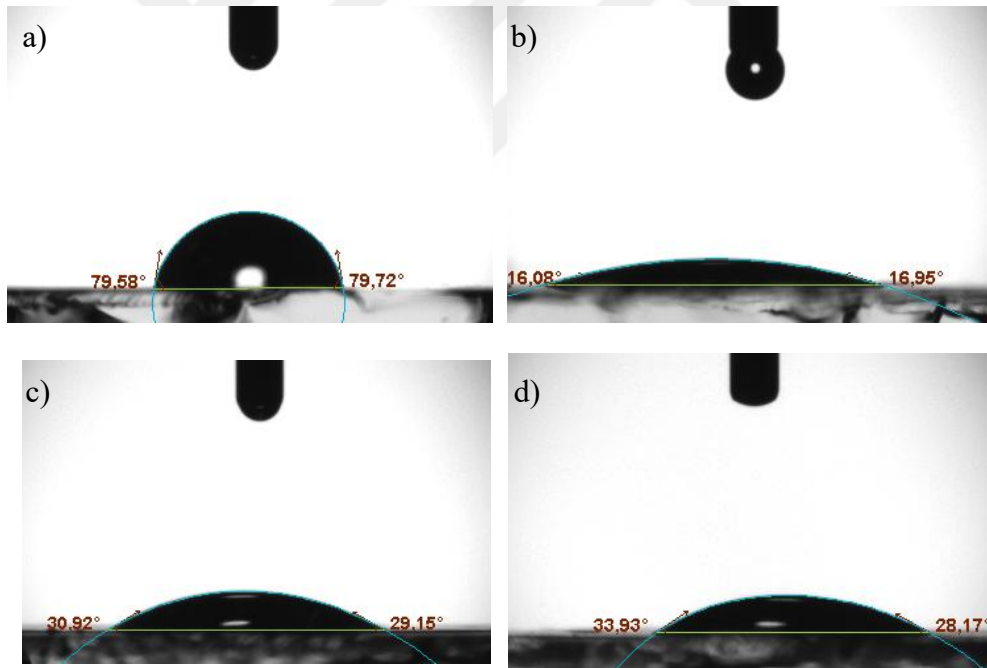
Pürüzlülüğü pm düzeylerinde olan (674,701 pm) Au yüzey, aptamer ile kaplandıktan sonra beklenen şekilde daha pürüzlü hâle gelmiş ve RMS değeri 73,69 nm’ye çıkmıştır. Altın yüzeyindeki açık bağlanma bölgelerine tutunan aptamer moleküllerinin oluşturduğu yapısal değişiklikler, RMS değerindeki artışla

doğrulanmaktadır. Bunu izleyen bloklama aşamasında yüzeye adsorplanan kazein miselleri, RMS değerini 474,86 nm değerine çıkmasına ve pürüzlülüğün belirgin şekilde yükselmesine neden olmuştur. Bu artışın, kazein misellerinin küresel morfolojisi ve yüzeyde düzensiz bir tabaka oluşturmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bakos ve diğ., 2021).

DDT ile inkübasyon sonrasında ise RMS değerinde 18,58 nm'ye kadar düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün hem DDT moleküllerinin yüzeye bağlanması hem de süt matrisinden gelen kazeinin de yüzeyde yeniden düzenlenmeye neden olmasından kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmektedir

4.8.2. Temas açısı ölçüm sonuçları

Hazırlanan modifiye edilmiş ve edilmemiş temsili Au yüzeylerin temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.27'te sunulmuştur.



Şekil 4.27. Yüzey karakterizasyonu amacıyla hazırlanan altın yüzeylerin temas açısı ölçümlerine ait görüntüler: (a) Au, (b) Aptamer (APT), (c) Bloklama, (d) DDT inkübasyonu.

Altın yüzeyinin temas açısı 79,65° olarak ölçülmüş olup, aptamer immobilizasyonu sonrasında bu değer belirgin bir düşüş göstererek 16,52°'ye gerilemiştir. Yüzeyin daha hidrofilik hâle gelmesi, aptamerlerin hidrofilik karakteri ile uyumludur. Bloklama aşamasında süt kaynaklı bileşenlerin yüzeye bağlanması ile temas

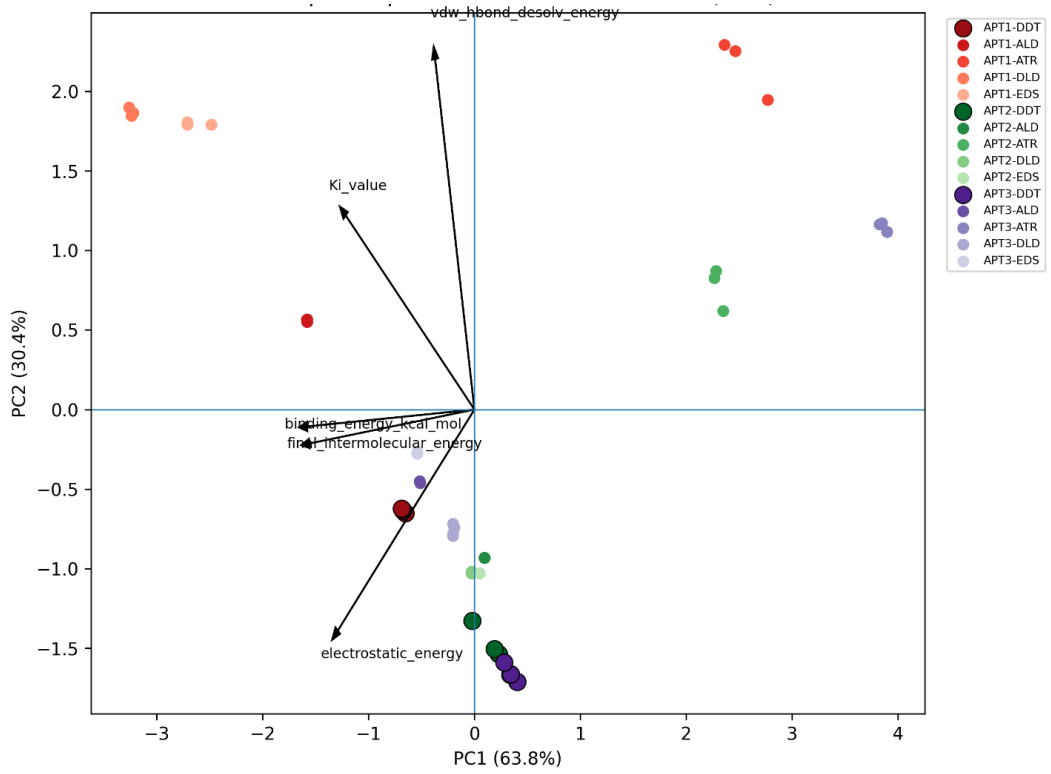
açısı artmış ve $30,03^\circ$ değerine ulaşmıştır. Bu artışın, süt proteinlerinin, özellikle kazein misellerinin, altın yüzeye bağlanma sırasında geçirdikleri olası konformasyonel değişimlere bağlı olarak hidrofobik bölgelerin yüzeyde daha fazla açığa çıkmasından kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmektedir.

Son aşamada, hidrofobik yapıda olan DDT ile etkileşim sonrası temas açısı $31,05^\circ$ 'ye yükselmiştir. Ancak bu artış oldukça sınırlıdır ve bunun, çalışmada kullanılan DDT konsantrasyonunun $\mu\text{g/kg}$ seviyesinde olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Genel olarak, yüzey modifikasyonları sonrasında temas açısındaki azalma yüzeyin daha hidrofilik, artış ise daha hidrofobik bir karakter kazandığını göstermektedir. Ölçümler bütüncül olarak değerlendirildiğinde, yalın altın yüzeyinin diğer tüm modifiye edilmiş yüzeylere kıyasla daha hidrofobik özellik gösterdiği; aptamer kaplaması ile hidrofilik karakterin belirgin şekilde arttığı; bloklama ve DDT bağlanması ile ise hidrofobisitenin kademeli olarak yükseldiği sonucuna varılmaktadır.

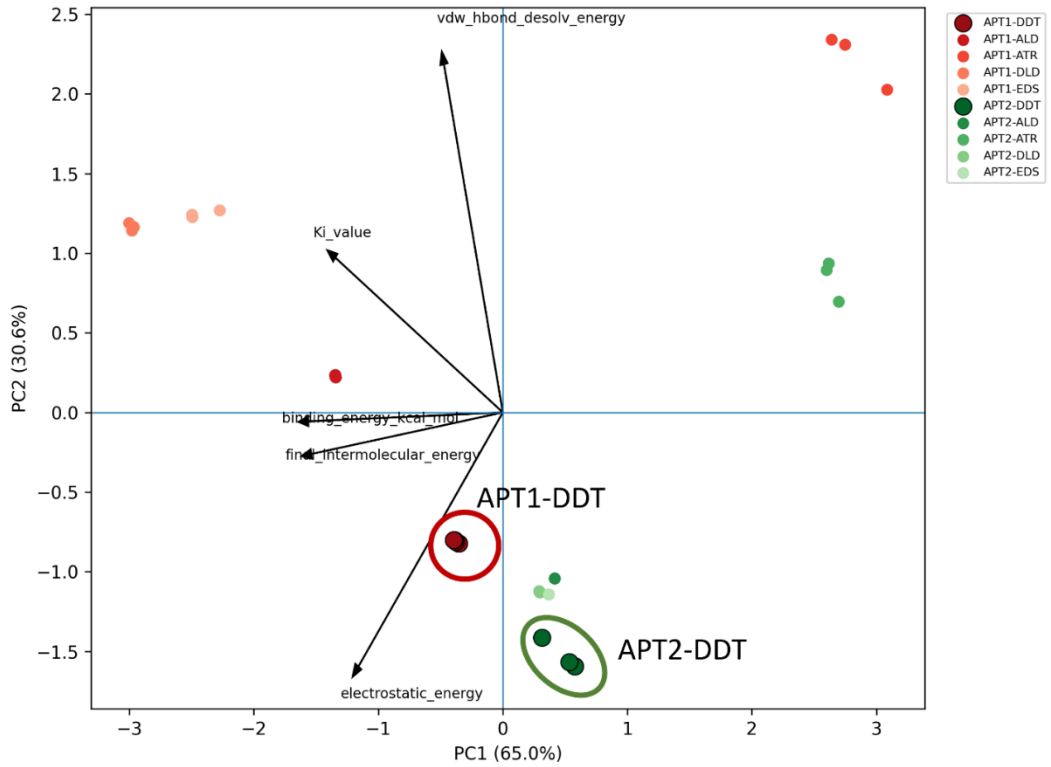
4.9. PCA Analizi ile Kenetleme ve Seçiciliğin Gösterimi

APT-1, APT-2 ve APT-3 aptamerlerinin kenetleme ve seçicilik özelliklerini değerlendirmek amacıyla aptamerler için PCA matrisi oluşturulmuş ve EK-1'de verilmiştir. Ayrıca bu üç aptamerin Şekil 4.29'da birlikte analiz edildiği PCA sonuçları elde edilerek aşağıda açıklanmıştır.



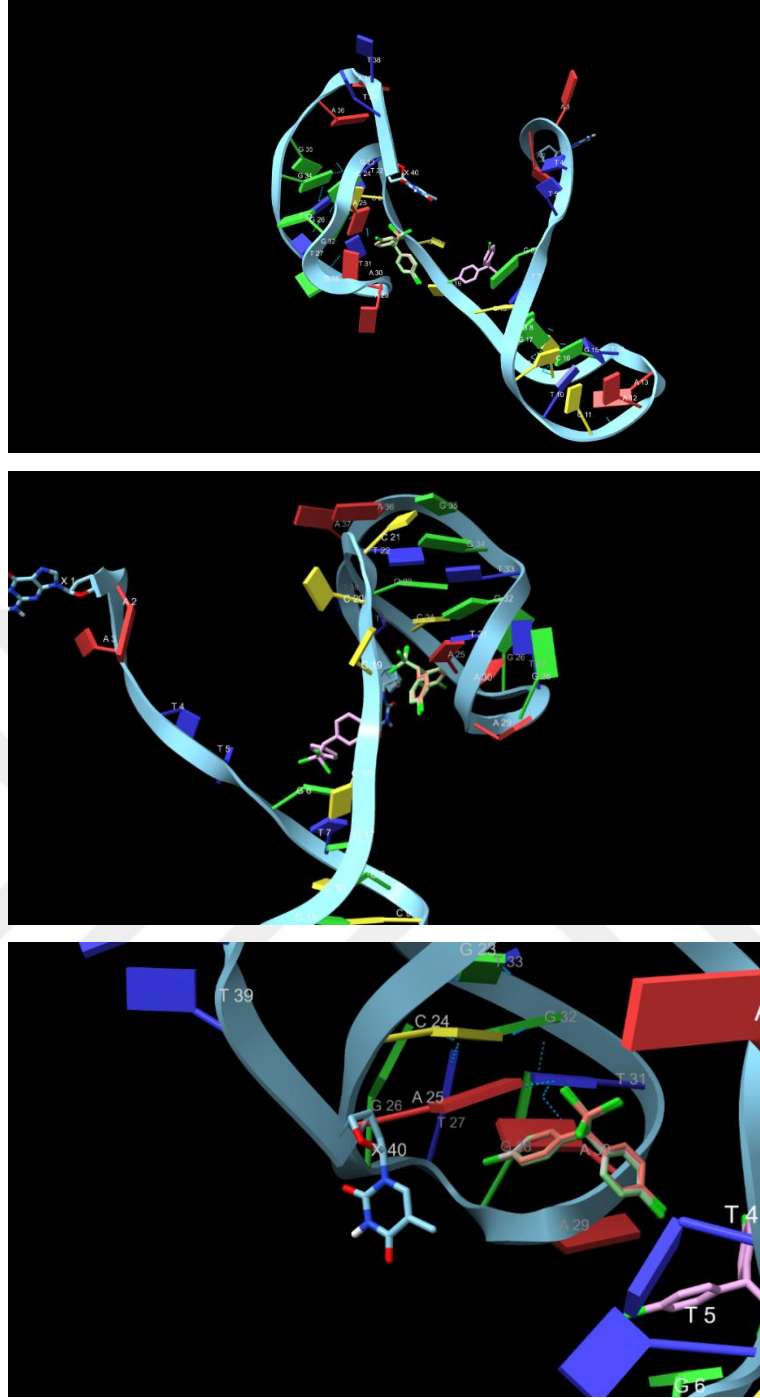
Şekil 4.29. APT-1, APT-2 ve APT-3 aptamerlerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu elde edilen PCA sonucu

Üç aptamerin Şekil 4.29’da gösterilen birlikte değerlendirildiği PCA analizinde, PC1 ve PC2 bileşenlerinin toplam varyansın büyük bir kısmını açıklaması, kenetleme metriklerinin istatistiksel olarak güçlü ve ayırt edici olduğunu göstermektedir. PCA skor uzayında APT-1, APT-2 ve APT-3’e ait noktaların ayrı alt kümeler oluşturması, bağlanma davranışlarının aptamer-spesifik olduğunu ortaya koymaktadır. Her bir aptamer için DDT’ye ait yerleştirme pozlarının, aynı aptamerin girişimci pestisitlerinden daha kompakt ve belirgin bir bölgede kümelenmesi, DDT’nin girişimcilere kıyasla farklı bir bağlanma profiline sahip olduğunu göstermektedir. Biplot yükleme vektörleri incelendiğinde, özellikle elektrostatik enerji ve van der Waals/hidrojen bağı katkılarının DDT bağlanmasında belirleyici olduğu, Ki değeri ve daha zayıf intermoleküler etkileşimlerin ise girişimci moleküllerin ayrımında etkili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, DDT’nin üç aptamer tarafından da seçici biçimde tanındığını ve docking verilerinin hesaplamalı seçiciliği desteklediğini göstermektedir. Ancak APT-3’ün DDT ile bağlanma pozları kümelenmişse de girişimci moleküller ile kümelenmelerin farklı PC düzleminde gerçekleşmesi nedeniyle girişimci moleküller ile olan etkileşimin özellikle aldrin (ALD), dieldrin (DLD) ve endosulfan (EDS) için diğer iki aptamerden farklı olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.30. APT-1 ve APT-2 aptamerlerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu elde edilen PCA sonucu

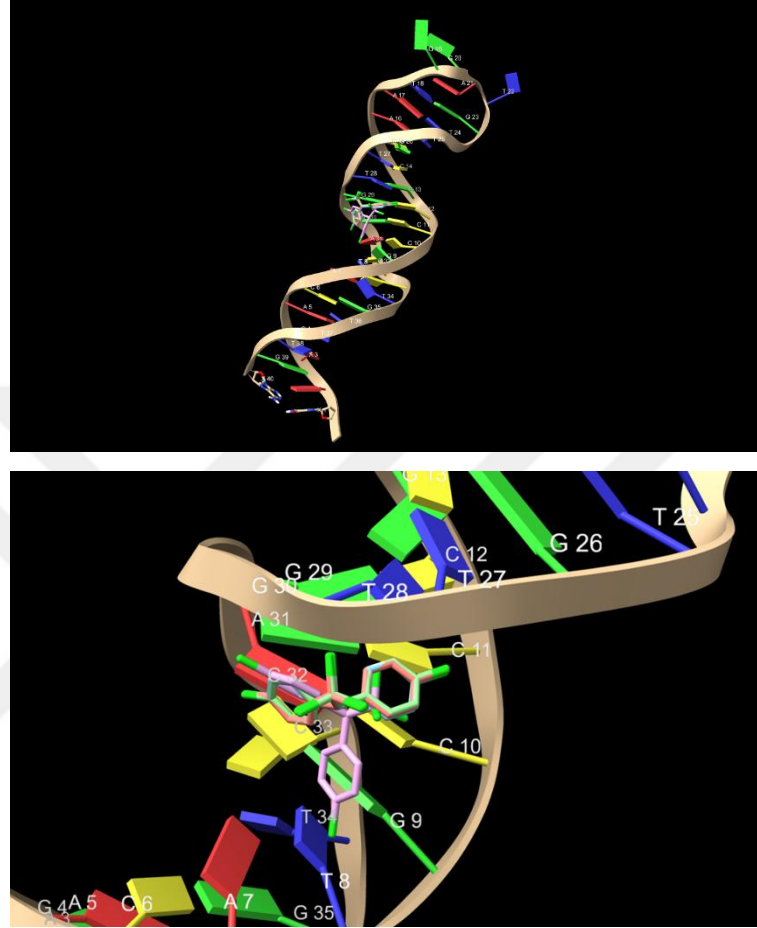
APT-3'ün PCA'den çıkarıldığı ve yalnızca APT-1 ile APT-2'nin değerlendirildiği PCA sonucu Şekil 4.30'da verilmiştir. Benzer şekilde yüksek açıklanan varyans değerleri elde edilmiş, bu durum yerleştirme verilerinin iki aptamer için de tutarlı olduğunu göstermiştir. PCA skor grafiğinde APT-1-DDT ve APT-2-DDT noktalarının hem kendi girişimci moleküllerinden hem de birbirlerinden ayrıştığı gözlenmiştir (Şekil 4.31.). Özellikle APT-1'in DDT ve DLD ile 5 bağlanma pozunda da yüksek kümelenme gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.31. APT1-DDT kenetleme ve hidrofobik cep ile etkileşim

Bununla birlikte APT-2-DDT etkileşimi de 5 poz için (1 poz kısmen ayrı olmasına rağmen) yakın bir kümelenme göstermektedir. DDT'nin polar fonksiyonel grup eksikliği nedeniyle bağlanma, özgül H-bağı açısından çok apolar temaslar tarafından sürüklenmekte ve bu da konformasyon çeşitliliğini azaltarak pozların kümelenmesine yol açmaktadır. Girişimcilerin bağlanma kümelenmesi ile daha farklı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Örneğin, dieldrin'deki H-bağı kabul edici merkezler, aptamer

üzerinde belirli bir donör motifini hedefleyerek bağlanmayı yönlendirir; bu yönlendirme vdW temaslarına ek olarak enerjice avantaj sağlayıp aynı bağlanma modunun tekrar bulunmasına katkıda bulunur.



Şekil 4.32. APT2- DDT kenetlenmesi ve Aptamerin kendi hibritleşmesine benzer 3B yapı içerisinde C10,11 ve C32-33 bazları arasında oluşan hidroforbik cep

Bu ayırım, her iki aptamerin DDT'yi bağlama mekanizmalarının farklı olmasına rağmen, girişimci pestisitlere kıyasla daha güçlü ve özgül bir etkileşim sergilediğini göstermektedir. APT-1 için DDT bağlanmasının daha çok bağlanma enerjisi ve intermoleküler enerji bileşenleriyle ilişkili olduğu, APT-2 için ise elektrostatik katkıların daha baskın olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, APT-3'ün analizden çıkarılması durumunda bile PCA sonuçları, DDT'nin APT-1 ve APT-2 tarafından girişimci moleküllerden istatistiksel olarak ayırt edilebildiğini ve hesaplamalı seçiciliğin korunduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle diğer deneysel sonuçlar ile birlikte ele alındığında, APT-2'de T8, G9, A31 ve G30 ile desteklenmiş 10,11 ve 32-33 numaralı C ile oluşan bir mikro cebin aktif olduğu değerlendirilmiştir (Şekil 4.32). DDT'nin

bağlanmasında, klasik hidrojen bağı ağlarından ziyade, sitozin bazlarının oluşturduğu apolar ve geometrik olarak kısıtlı bir mikro-cep belirleyici olmaktadır.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tarım alanlarının ve tarımsal verimliliğin çok önemli olduğu günümüzde, verimi bir şekilde artırmanın zorunlu olduğu bilinmektedir. Tarımsal verimi artırmak için yaygın olarak kullanılan pestisitlerin, insan sağlığı açısından önemli riskler engelleyebilmek için ya pestisit kullanımı çok sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir ya da gıdaların içerisinde bulunması muhtemel pestisit analizine önem verilmelidir. Pestisit içeren ve hayatımızda çok önemli bir yer tutan süt ve süt ürünleri de ne yazık ki pestisit tehdidi altındadır.

Bu çalışma, süt içerisindeki DDT kalıntılarını hızlı ve hassas bir şekilde tespit edebilen bir aptasensör geliştirmeyi amaçlamıştır. Literatürde daha önce SELEX yöntemi ile DDT'ye özgü seçilen tek zincirli DNA aptamerleri (Zhang ve diğ., 2020) kullanılarak aptamer üretimine odaklanılmışken, bu çalışmada elektrot tasarımı üzerine yoğunlaşmıştır. Hem primerli hem de primersiz aptamerlerin DDT'ye bağlanma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca yine aynı çalışmada elde edilen diğer aptamerler arasından ve şekil, katlanma, A/C/T/G dağılımı ile enerji düzeyi bakımından ilk seçilen aptamere en yakın olan aptamer ile kantitatif ölçüm sonuçları karşılaştırılmıştır. Seçilen aptamerler, Au elektrot yüzeyine immobilize edilmiş ve aptasensör performansı, aptamer inkübasyon süreleri, süt ile bloklama süreleri ve DDT içeren süt örnekleri ile etkileşim süreleri optimize edilerek değerlendirilmiştir. Aptasensör yanıtları hem CV hem de EIS yöntemleri kullanılarak izlenmiştir.

APT-1 aptameri ile 2 saatlik aptamer bağlanmasının ardından 2 saatlik bloklama ve 1 saatlik DDT içeren süt ile etkileşim sonrası hazırlanan aptasensörün tayin aralığı, Rct değerlerinin konsantrasyona karşı çizdirilen grafiklerinden 9,18 – 20 µg DDT/kg süt olarak tanımlanmıştır. Bu sonuç da kantitatif ölçümünün 20 µg DDT/kg süt konsantrasyondan düşük olan sütler için kullanılabileceği, ancak bu durumda izin verilen sınırlar içerisinde dahi olsa daha yüksek konsantrasyonlarda ölçümünün yapılamadığı belirlenmiştir.

En belirgin sensör yanıtının, 2 saatlik aptamer bağlanmasının ardından 2 saatlik bloklama ve 1 saatlik DDT içeren süt ile etkileşim sonrası APT-2 aptameri ile hazırlanan sensör ile elde edildiği anlaşılmıştır. Yüksek bir R^2 değeri (0,9974) ile çizdirilen kalibrasyon eğrisinden yola çıkarak tayin aralığı 11,81 – 40 µg DDT/kg süt olarak

tanımlanmıştır. Bu aptasensör ile yasal sınır olan 40 µg DDT/kg süt konsantrasyonunun altında kantitatif ölçüm alınabileceği gösterilmiştir.

R_{ct} değerlerinde meydana gelen artış ile APT-1 ve APT-2'nin K_d değerleri belirlenmiştir. APT-1 ve APT-2 için bu değerler sırasıyla 0,00256 ve 0,00268 µg DDT/kg süt olarak hesaplanmıştır.

I_{pa} değerlerindeki değişim, $\log(C_{DDT})$ 'ye karşı grafiğe geçirildiğinde ise %99,9 aralığında ve daha güvenli bir sonuç olan; çalışma aralıklarının her ikisi için de 5-80 µg DDT/kg süt olduğu görülmüştür. Aptasensörlerin LOD değerleri de sırasıyla 22,506 ve 20,724 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen analitik veriler, APT-2 modifikasyonunun APT-1 sistemine kıyasla daha iyi doğrusal yanıt ve daha düşük LOD sağlaması sayesinde süt matrisi içerisinde DDT tayini için daha uygun bir sensör yaklaşımı olduğunu ortaya koymaktadır.

Hazırlanan iki ayrı sensör, aynı temel aptamer dizisine sahip olup, bunlardan biri primer dizilerini içerirken (APT-1), diğeri primerler olmadan kullanılmıştır (APT-2). APT-1 ile daha yüksek R_{ct} değerlerine ulaşılmış, dolayısıyla DDT ile daha fazla bağlanma göstermişken APT-2 daha düşük R_{ct} değerleri göstermesine rağmen, standart sapması daha düşük çalışmalar ile daha geniş tayin aralığı değerine ulaşılmıştır. Bu duruma değinen literatürde kaynakları incelendiğinde primerli ve primersiz aptamer karşılaştırmaları karşımıza çıkmaktadır. Primer bölgelerin, seçilen aptamerlerin afinitesi, özgüllüğü ve seçiciliği üzerinde de belirleyici etkiler gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (Yang ve diğ., 2018, Kohlberger ve Gadermaier, 2021)

Bu çalışma kapsamında APT-1 ve onun primersiz formu olan APT-2 ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması, primer bölgelerin uzaklaştırılmasının sensör yanıtı üzerindeki etkilerini değerlendirme açısından önemli bir yaklaşım sunmuş ve primersiz aptamer kullanımının analitik performansa olan katkısının deneysel olarak ortaya konmasına olanak sağlamıştır.

Langmuir modeli ile yapılan eğri uyumlandırmaları sonucunda, primerli APT-1 aptameri için K_d değeri 0,00256 µg DDT/kg süt, primersiz APT-2 aptameri için ise 0,00286 µg DDT/kg süt olarak hesaplanmıştır. Her iki aptamer için elde edilen düşük K_d değerleri, DDT'ye karşı yüksek bağlanma afinitesine işaret etmekle birlikte, APT-1 aptamerinin APT-2'ye kıyasla daha düşük K_d değeri sergilemesi, primer dizilerinin aptamerin hedef molekülünü tanıyan üç boyutlu yapısının stabilizasyonuna katkı sağladığını düşündürmektedir. Buna karşın, primersiz APT-2 aptamerinin benzer büyüklükte bir K_d değeri göstermesi, hedef bağlanma bölgesinin primer dizilerinden bağımsız olarak da

etkinliğini koruduğunu ve aptamerin fonksiyonel bağlanma bölgesinin DDT ile güçlü bir etkileşim kurabildiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, primer dizilerinin bağlanma afinitesini sınırlı ölçüde iyileştirdiğini, ancak bağlanmanın esas olarak aptamerin özgül tanıma bölgesi tarafından belirlendiğini göstermektedir.

APT-1 ve APT-2 alınan sonuçların devamında çalışılan APT-3 ile sensör üretiminden ise kantitatif ölçümler için olumlu sonuçların alınamadığı belirlenmiştir. APT-3 ile DDT ölçülememesinin farklı nedenleri olabileceği literatürde araştırılmış ve olası farklı nedenler karşımıza çıkmıştır;

- Eğer aptamerlerden biri SELEX ile spesifik olarak DDT'ye karşı seçilmişse ve diğeri seçilmemişse, diziler ne kadar benzer olursa olsun seçim baskısı sayesinde yalnızca bir aptamerin doğru bağlanma topolojisine sahip olması beklenir. Bu hedefe özgül evrimsel seçim farkı, bağlanma performansındaki ayrışmayı açıklayabilir (Chatterjee ve diğ., 2020).
- Nükleotit kompozisyonu (A, G, C, T oranları) ve genel ikincil yapı motifleri açısından benzerlik göstermelerine rağmen, aptamerlerin hedef molekülü bağlama performansları belirgin farklılıklar gösterebilmektedir. Bunun temel nedeni, aptamer-hedef etkileşiminin yalnızca baz oranları veya genel ikincil yapı ile değil, üç boyutlu (3B) konformasyon, yüzey topolojisi ve bağlanma ceplerinin geometrik uygunluğu ile belirlenmesidir. Aptamerlerin üçüncül yapı düzeyinde gösterdiği küçük konformasyonel değişiklikler bile, hidrofobik etkileşim bölgelerini, hidrojen bağı donör-akseptör dizilimlerini önemli ölçüde değiştirebilir. Dolayısıyla iki aptamerin halka ve sarmal bölgeleri benzer olsa dahi, hedef molekülün bağlanmasını mümkün kılan özgül bağlanma cebinin konformasyonu yalnızca uygun dizilime sahip olan aptamerde oluşmuş olabilir. (Xu ve diğ., 2023).
- Benzer yapısal özelliklere sahip olsalar bile aptamerlerin hedefe yaklaşma, bağlanma ve ayrılma hızları farklı olabilir. Yetersiz bağlanma kinetiği, bir aptamerin pratik koşullarda hedefi yakalayamamasıyla sonuçlanabilir.
- Ek olarak, aptamerlerin katlanma stabilitesi, iyonik ortamla etkileşimleri, metal iyonlarına bağımlı katlanma motifleri ve hedef molekülün bağlanma sırasında indüklediği konformasyonel uyum farklılıkları da bağlanma kapasitesi üzerinde belirleyici rol oynayabilir. Bu nedenle, iki aptamerin genel yapısal benzerliklerine rağmen yalnızca birinin hedef kimyasalı bağlayabilmesi, üçüncül yapı farklılıklarının hedefe özgül etkileşim bölgelerini desteklemesiyle açıklanabilir (Krauss ve diğ., 2012).

- Kimi zaman da bazı aptamerler, deney koşullarında kararlı bağlanma yapısına geçmeden önce kısa süreli metastabil yapılarda takılabilir. Bu durum, hedefle karşılaşma anında uygun bağlanma formunun oluşmasını engelleyebilir (Bian ve diğ, 218).

DDT molekülüne yapısal olarak benzer olan ve OCP'ler sınıfına dahil çeşitli bileşiklerle (atrazin, aldrin, dieldrin ve β -endosülfan) gerçekleştirilen girişim deneylerinin dönüşümlü voltammogramlarına ve EIS spektrumları incelenmiştir. Girişim kontrolü amacıyla süt örneklerine farklı konsantrasyonlarda kimyasallar eklenerek yapılan analizlerde elde edilen bulgular, süt içerisindeki DDT ile eşdeğer konsantrasyonlarda bulunan ya da aptamer ile etkileşim potansiyeline sahip maddelerin aptasensör cevabı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını belirlenmiştir. R_{ct} değerlerinde artış olmaması APT-2 aptameri ile üretilmiş sensörlerin atrazin, aldrin, dieldrin ve β -endosülfan gibi OCP'ler üzerine tanımlayıcı olmadığını ortaya koymuştur.

Ticari olarak temin edilen süt, yoğurt ve kefir örneklerinde DDT varlığının araştırılması amacıyla, APT-2 aptameri kullanılarak hazırlanmış empedimetrik aptasensörler kullanılmıştır. Yapılan analizlerde, incelenen ürünlerin büyük çoğunluğunda DDT tespit edilmemekle birlikte, bir market markasına ait UHT süt örneğinde mevzuatın izin verdiği sınırlar içinde dahi olsa ölçülebilir düzeyde DDT kalıntısına rastlanmıştır. Bu sonuç, geliştirilen sensörün gerçek gıda matrisleri içerisinde DDT varlığını ayırt edebilecek duyarlılığa sahip olduğunu göstermesi açısından önem taşımaktadır.

Ayrıca sensörlerin kısa süreli raf ömrü değerlendirilmiş ve üretim sonrası 7 ve 15 günlük depolama sürelerine bağlı performans değişimleri incelenmiştir. Sensörlerin başlangıçtaki R_{ct} değerleri ile karşılaştırıldığında, 7 günlük depolama sonrasında yaklaşık %42 oranında, 15 günlük depolama sonrasında ise %56 oranında performans kaybı gözlenmiştir. Bu bulgular, aptasensörlerin fonksiyonel stabilitelerinin kısa süreli depolama koşullarından etkilendiğini ve optimum performans için sensörlerin üretimden kısa bir süre sonra kullanılmasının daha uygun olduğunu ortaya koymaktadır.

Genel olarak, bu çalışma hem gerçek numunelerde DDT tayininin başarıyla yapılabilirdiğini hem de geliştirilen aptasensörün kısa dönem kullanım için pratik bir tanı platformu sunduğunu göstermektedir.

Literatürde sulu çözeltilerde, bazı meyve ve sebzelerde, sularda ve tampon çözeltilerde DDT tespiti için geliştirilmiş sensörler olmasına rağmen süt ve süt ürünleri içerisinde bulunabilecek DDT miktarını ölçmek amacıyla herhangi bir sensör çalışmasına rastlanmamıştır. Bu açıdan bu tez çalışması literatüre bir katkı niteliğindedir. Ayrıca DDT

içeriğinin belirlenmesi için literatürde, kolorimetrik optosensör, amperometrik biyosensöre rezonans sensörü, piezoelektrik sensör, elektrokimyasal empedans sensörü ve immunosensör çalışmalarına rastlanmıştır. DDT belirlemeye yönelik bir empedimetrik aptasensör çalışmasına literatürde rastlanmaması, bu tez çalışmasını özgün bir çalışma olduğunu göstermektedir.

5.2 Öneriler

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, aptasensör üretimi ile sıvı bir gıda olan süt içerisindeki DDT miktarının belirlenmesi işlemi, literatüre kaynak sağlayacaktır. DDT dışında diğer pestisitler için de bazen günlerce ve genellikle saatlerce süren analizlere alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Au elektrot ile yapılan çalışmaların hem Au elektrodunun pahalı olmasından hem de ölçüm sırasında çok miktarda çözeltiye ihtiyaç duymasından dolayı daha ekonomik yollar DDT analizi amacıyla kapı açabilir. Çalışmalar, baskı devre karbon elektrodu ile çalışılarak, daha az miktarlarda kimyasallar ve aptamerle çalışılarak DDT tayininde maliyet kalemi çok rahat düşürülebilir.

Süt ve süt ürünlerinde bulunması gereken maksimum miktar Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'ne göre 40 µg/kg süt olarak belirlenmiştir (Anonim, 2022b). Öncelikle bu sınır ve bu sınırın altındaki pestisit içeriğini belirleyebilmek için farklı koşullarda çalışmalar denenerek analiz sınırları net bir şekilde belirlenebilir, ya da çalışma kapsamında RSM gibi istatistiksel yöntemler kullanılarak, maksimum verime daha hızlı ulaşılabilir.

Raf ömrü çalışmalarından elde edilen verilere göre, çapraz bağlayıcı kimyasallar ile modifikasyon yapılması veya farklı destek tabanlarının kullanımı gibi raf ömrünü uzatacak denemeler yapılarak aptasensörlerin kullanım ömrü arttırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Acar, Ö. Ç., 2015, Pestisit Analizleri Eğitim Notu, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Kalıntı Pestisit Birimi
- Afshar, M. T., Nematzdeh, S., Nejad, M. A. M., 2021, In silico design of novel aptamers utilizing a hybrid method of machine learning and genetic algorithm, *Molecular Diversity*, 25:1395–1407
- Aktar, W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009, Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards, *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1): 1–12
- Akyüz, D., Keleş, T., Bıyıklıoğlu, Z., Koca, A., 2017, Electrochemical pesticide sensors based on electropolymerized metallophthalocyanines, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 804, 53–63
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B., 2006, Residue analysis of 500 high priority pesticides Better by GC MS or LC MS MS, *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 838–865
- Amin, Z., M., 2024, Developing an Electrochemical Aptasensor for Detection of Extracellular Vesicles, Doktora tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, University of Newcastle, Australia, 25,86
- Anonim, 2019, Preventing Disease Through Healthy Environments, [Recommended Classification of Pesticides by Hazard and guidelines to classification](#), World Health Organization
- Anonim, 2022a, Pesticide residues in food, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>
- Anonim, 2022b, Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği Rehberi
- Anonim, 2022c, Toxicological Profile for DDT, DDE, and DDD, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services.
- Anonim, 2024, Tarım İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği, TİSİT,
- Anonim, 2025a, TÜİK Merkezi Dağıtım sistemi, Süt ve Süt Ürünleri İstatistikleri, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=85&locale=tr>
- Anonim, 2025b, Resmi Tarımsal İlaç İstatistikleri, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Yıllar İtibarıyla Bitki Koruma Ürünlerinin (Gruplara Ayrılmış Olarak) Kullanım Miktarları, 2006-2024
- Anonim, 2024, Tarım İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği, TİSİT,
- AOAC Official method, 2007, Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate, *Journal of AOAC International*, 90, 485–520, 249, 505-510

- Aristov, N., Habekost, A., 2015, Cyclic Voltammetry - A Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes, *World Journal of Chemical Education*, Vol.3, No.5, 115-119
- Armbruster, D. ve Pry, T., 2008, Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation, *Clin. Biochem Rev.*, 29, 49-52
- Aydın, S., Aydın, M. E., Beduk, F., Ulvi, A., 2019, Organohalogenated pollutants in raw and UHT cow's milk from Turkey: a risk assessment of dietary intake, *Environ Sci Pollut Res*, 26:12788–12797
- Ayoub, M. M., Desoki M. E., Hassanin A. S., Thabet, W. M., Mansour, M. H., Loutfy N., M., Amal, R., 2012, Detection of pesticide residues in milk and some dairy products, *J. Plant Prot. and Path.*, Mansoura Univ., 3 (8) 865 – 880
- Baghban, H. N., Hasanzadeh, M., 2023, Multifunctional one-droplet microfluidic chemosensing of ractopamine in real samples: a user-oriented flexible nano-architecture for on-site food and pharmaceutical analysis using optical sensors, *Anal. Methods*, 15, 4506-4517
- Bakos, I., Vass, A., Muckley, E. S., Ivanov, I. N., Keresztes, Z., 2021, Indirect electrochemical method for high accuracy quantification of protein adsorption on gold surfaces, *Electrochemistry Communications*, 124, 106961
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., 2001, Electrochemical methods fundamentals and applications, 2nd. Ed., Ed: Elizabeth Swain, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, 386
- Barragan-Huerta, B. E., Costa-Perez, C., Peralta-Cruz, J., Barrera-Cortes, J., Esparza-Garcia, F., Rodríguez-Vazquez, R., 2007, Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee, *International Biodeterioration & Biodegradation* 59, 239–244
- Bedi J. S., Gill, J. P. S., Kaur, P., Aulakh, R. S., 2018, Pesticide residues in milk and their relationship with pesticide contamination of feedstuffs supplied to dairy cattle in Punjab (India), *Journal of Animal and Feed Sciences*, 27, 18–25
- Bian, Y., Song, F., Cao, Z., Zhao, L., Yu, Jiafeng, Guo, X., Wang, J., 2018, Fast-Folding Pathways of the Thrombin-Binding Aptamer G-Quadruplex Revealed by a Markov State Model, *Biophysical Journal*, 114(7), 1529-1538
- Bilal, M., Iqbal, H. M. N., Barceló D., 2001, Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems, *Science of the Total Environment*, 695, 133,896
- Bizinti, C., Soulis, D., Kourti, D., Geka, G., Kokkinos, C., Nemtsov, L., Speliotis, T., Aconomou, A., 2025, Microfabricated electrochemical aptasensing chip modified with dual-function antifouling linker for single-drop label-free assay of oxytetracycline in milk, *Microchimica Acta*, 192:527

- Borah, H., Gogoi, S., Kalita, S., Puzari, P., 2018, A broad spectrum amperometric pesticide biosensor based on glutathione Stransferase immobilized on graphene oxide-gelatin matrix, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 828, 116–123
- Boudebouz, A., Boudalia, S., Boussadia, M. I., Gueroui, Y., Habila, S., Bousbia, A., Symeon, G., K., 2022, Pesticide residues levels in raw cow's milk and health risk assessment across the globe: A systematic review, *Environmental Advances*, 9, 100266
- Brugger, K. E., Cole, P. G., Newman, I. C., Parker, N., Scholz, B., Suvagia, P., Walker, G., Hammond, T. G., 2010, Selectivity of chlorantraniliprole to parasitoid wasps, *Pest Manag Sci*, 66, 1075–1081
- Buglak, A. A., Samokhvalov, A. V., Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B., 2020, Methods and Applications of In Silico Aptamer Design and Modeling, *Int. J. Mol. Sci*, 21, 8420;
- Bulut, S., Akkaya, L., 2011, Organochlorine pesticide (OCP) residues in cow's, buffalo's, and sheep's milk from Afyonkarahisar region, Turkey, *Environ Monit Assess.*, 181, 555–562
- Burr, S. A., 2005, DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane), Plymouth University Peninsula Schools of Medicine and Dentistry, Ed: Benny L. Blaylock, 1, 725–727
- Caglayan, M. O., Üstündağ, Z., Şahin, S., 2022, Spectroscopic ellipsometry methods for brevetoxin detection, *Talanta*, 237, 22897
- Cammann, K., 1977, Bio-sensors based on ion-selective electrodes, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 287, 1-9
- Campanellaa, L., Ereminb, S., Leloa, D., Martinia, E., Tomassetia, M., 2011, Reliable new immunosensor for atrazine pesticide analysis, *Sensors and Actuators B*, 156, 50–62
- Chatterjee, B., Kalyani, N., Anand, A., Khan, E., Das, S., Bansal, V., Kumar, A., Sharma, T., K., 2020, GOLD SELEX: a novel SELEX approach for the development of high-affinity aptamers against small molecules without residual activity, *Microchimica Acta*, 187, 618
- Cheng, R., Liu, S., Shi, H., Zhao, G., 2018, A highly sensitive and selective aptamer-based colorimetric sensor for the rapid detection of PCB 77, *J. Hazard Mater.* 341, 373–380
- Clark L. Jr, Lyons C., 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*, 102, 29– 45.
- Coşkun, T., Şanlı, T., 2016, Süt ve Süt Ürünlerinde Kalıntılar, *Akademik Gıda*, 14(1) (2016) 67-74
- Çakır, O., Bakhshpour, M., Yılmaz, F., Baysal, Z., 2018, Pestisit Tayini için Nanopartiküllerle Duyarlılığı Arttırılmış Moleküler Baskılama Temelli Yüzey

Plazmon Rezonans Sensörlerin Hazırlanması, *Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.* 8(3): 219-226

- Darko, G., Acquah, S. O., 2008, Levels of organochlorine pesticides residues in dairy products in Kumasi, Ghana, *Chemosphere* 71, 294–298
- Dasriya, V., Joshi, R., Ranveer, S., Dhundale, V., Kumar, N., Raghu, H. V., 2021, Rapid detection of pesticide in milk, cereal and cereal based food and fruit juices using paper strip-based sensor, *Scientific Reports*, 11, 18855
- Davies, T. G. E., Field, L., M., Usherwood, P. N. R., Williamson, M. S., 2007, DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels, *Life*, 59 (3), 151 – 162
- Dervişoğlu, M., Gül, O., Yazıcı, F., Aydemir, O., 2013, Süt ve süt ürünlerinde organik klorlu pestisit varlığı, *Journal of Food and Food Science Technology*, 13, 31-40
- Deti, H., Hymeye, A., Bekhit, A. A., Mohamed, A., M., Bekhit, A. A., 2014, Etiyopya'nın faeklı bölgelerinden toplanan inek ve keçi sütlerinde kalıcı organoklorlu pestisit kalıntıları, *Chemosphere*, 106, 70-74
- Dorozhko, E. V., Solomonenko, A. N., Erkovich, A. V., Koltsova, A. V. Korotkova, E. I., Kolobova, E. N., Semin, V. O., Nikulin, L. G., Mikhailova, T. V., Kazachinskaya, E. I., Saqib, M. S., 2026, Copper-enhanced electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for the quality control of hepatitis A virus vaccines, *Talanta*, 297, 128579
- Dos Santos, J., S., Schwanz, T. G., Coelho, N. A., Heck-Marques, M. C., Mexia, M. M., Emanuelli, T., Costabeber, Ijoni, 2014, Estimated daily intake of organochlorine pesticides from dairy products in Brazil, *Food Control*, 53, 23-28
- 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.
- Dzyadevych, S. V., 2004, Conductometric biosensors: Theory, technology and applications, *Analytica Chimica Acta*, 505,1–14
- Eddleston, M., Buckley, N. A., Eyer, P., Dawson, A. H., 2008, Management of acute organophosphorus pesticide poisoning, *Lancet*, 371: 597–607
- Ellington A. D., ve Szostak J. W., 1990, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346,818-822
- Engrishi, N., Rountree, K. J., McCartky, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., Dempsey, J. L., 2018, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.* 2018, 95, 197–206

- Famulok, M., 1994, Molecular Recognition of Amino Acids by RNA- Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder, *J. Am. Chem. SOC.*, I 16, 1698-1, 706
- Ferapontova, E. E., 2018, DNA Electrochemistry and Electrochemical Sensors for Nucleic Acids, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2018. 11,197–218
- Gallocchio, F., Moressa, A., Stella, R., Rosin, R., Basilicata, L., Bille, L., Toson, M., Biancotto, G., Lega, F., Angeletti, R., Binato, G., 2021, Fast and simultaneous analysis of carbamate pesticides and anticoagulant rodenticides used in suspected cases of animal poisoning, *Forensic Science International*, 323-110810
- Gonçalves, A. M. M., Rocha, C. P., Marques, J. C., Gonçalves, F. J. M., 2017, Fatty acids as suitable biomarkers to assess pesticide impacts in freshwater biological scales – A review, *Ecological Indicators*, 122, 107299
- Gupta S., Kaushal R., Shruti K, Sood G., Sharma R., Dipta B and Bhardwaj S, 2015, Biosensors, *International Journal of Recent Scientific Research*, 6, (10), 6968-6973
- Gupta, R. K., Pandnya, R., Sieffert, T., Meyyappan, M., Koehne, J. E., 2016, Journal of Electroanalytical Chemistry, 773, 53-62
- Gutierrez, R., Ortiz, R., Vega, S., Schettino, B., Ramirez, M. L. Perez, J. J., 2013, Residues levels of organochlorine pesticide in cow's milk from industrial farms in Hidalgo, Mexico, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48, 935–940
- Gutierrez, R., Ruiz, J. L., Ortiz, R., Vega, S., Schettino, B., Yamazaki, A., Ramirez, M. L., 2012, Organochlorine Pesticide Residues in Bovine Milk from Organic Farms in Chiapas, Mexico, *Bull Environ Contam Toxicol*, 89, 882–887
- Hasegawa, H., Savory, N., Abe, K., Ikebukuro, K., 2016, Methods for Improving Aptamer Binding Affinity, *Molecules*, 21, 421
- Hayatsu, M., Mizutani, A., Hashimoto, M., Sata, K., Hayano, N., 2001, Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Arthrobacter* sp. RC100, *FEMS Microbiology Letters*, 201, 99-103
- He, P., Aga, D. S., 2019, Comparison of GC-MS/MS and LC-MS/MS for the analysis of hormones and pesticides in surface waters: advantages and pitfalls, *Anal. Methods*, 11, 1436-1448
- Herne, T. M. Tarlov, M. J., 1997, Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 8916-8920
- Hezard, T., Fajerweg, K., Evrard, D., Colliere, V., Behra, P., Gros, P., 2012, Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 664, 46–52

- Hianik, T, Wang, J., Electroanalysis 2009, *Electrochemical Aptasensors – Recent Achievements and Perspectives*, 21, No. 11, 1223 – 1235
- Hogendoorn, E., Zoonen, P. V., 2000, Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis, *Journal of Chromatography A*, 892, 435–453
- Jaffrezic-Renault, N., Dzyadevych, S. V., 2008, Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring, *Sensors*, 8(4), 2569-2588
- Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P., 2016, Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment, *Interdiscip Toxicol.*, 9(3–4): 90–100
- Jiao, Y., Jia, H., Guo, Y., Zhang, H., Wang, Z., Sun, X., Zhao, J., 2016, An ultrasensitive aptasensor for chlorpyrifos based on ordered mesoporous carbon/ferrocene hybrid multiwalled carbon nanotubes, *RSC Advances*, 6, 58541
- Jiao, Y., Hou, W., H., Fu, J., Guo, Y., Sun, X., Wang, X., Zhao, J., 2017, A nanostructured electrochemical aptasensor for highly sensitivedetection of chlorpyrifos, *Sensors and Actuators B*, 243, 1164–1170
- John, P.J., Bakore, N., Bhatnagar, P., 2001, Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India, *Environment International*, 26, 231-236
- Jolliffe, I. T., Cadima, J., 2016, Principal component analysis: a review and recent developments, *Phil. Trans. R. Soc. A*, 374, 20150202, 1-16
- Kamış, H., 2022, Konya Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Biyosensör dersi notları
- Kan, C. A., Meijer, G. A. L., The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed, *Animal Feed Science and Technology*, 133, 84–108
- Kampire, E., Kiremire, B. T., Nyanzi, S. A., Kishimba, M., 2011, Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets, *Chemosphere* 84, 923–927
- Karakaya, M. ve Boyraz, N., 1992, Gıda kirlenmesinde pestisitler ve korunma yolları, *Çevre Dergisi*, 1(4), 11-15
- Kariper, I. A., Üstündağ, Caglayan, M. O., 2021, A sensitive spectrophotometric ellipsometry based Aptasensor for the vascular endothelial growth factor detection, *Talanta*, 225, 121982
- Katz, E., Willner, I., 2003, Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors, *Electroanalysis*, 15, 913-947

- Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S., 2019, Pesticides Classification and its Impact on Environment, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 8(3), 1889-1897
- Kaushik, C. P., Kaushik, A., Sharma, H. R., 2014, Seasonal Trends in Organochlorine Pesticide Residues in Raw Bovine Milk from Rural Areas of Haryana, India, *Bull Environ Contam Toxicol*, 92:15–22
- Kesimci, E., 2021, Zehirlenmelerin Yoğun Bakımda Tedavileri, Tarım İlaçları ile Zehirlenmeler, Ed. Karabıyık L., *Ankara: Türkiye Klinikleri*, 50-55
- Khaniki, R. J., 2007, Chemical Contaminants in Milk and Public Health Concerns: A Review, *Int. J. Dairy Sci*, 2 (2), 104-115
- Kissinger, P.T. and Heineman, W.R., 1983, Cyclic Voltammetry, *Journal of Chemical Education*, 60(9), 702-706
- Kohlberger, M., Gadermaier, G., 2022, *Biotechnol Appl Biochem.*, 69, 1771–1792
- Krauss, I. R., Merlino, A., Randazzo, A., Novellino, E., Mazzarella, L., Sica, F., 2012, High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity, *Nucleic Acids Research*, 40(16), 8119-8128
- Kubackova, J., Fabriciova, G., Miskovsky, P., Jancura, D., Sanchez-Cortes, D., 2015, Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Detection of Organochlorine Pesticides by Alkyl Dithiol-Functionalized Metal Nanoparticles-Induced Plasmonic Hot Spots, *Anal. Chem.*, 87, 1, 663–669
- Lasia, Andrzej, 2014, Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications, *Springer*, New York, 301-3002
- Lee, S. J., Cho, J., Lee, B, Hwang, D., Park, J., 2023, Design and Prediction of Aptamers Assisted by In Silico Methods, *Biomedicines*, 11, 356
- Lisa, M., Chouhan, R. S., Vinayaka, A. C., Manonmani, H. K., Thakur, M. S., 2009, Gold nanoparticles based dipstick immunoassay for the rapid detection of dichlorodiphenyltrichloroethane: An organochlorine pesticide, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 224–227
- Lisdat, F., Schafer, D., 2008, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1555–1567
- Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., Whitesides, G. M., 2005, Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem Rev.*, 105, 1103-1169
- Manap, R. Y., Günenç, E., Doğaç, E., 2023, Pesticides: Their classification, Toxicological effects, and Detection, *J. Ata-Chem.*, 3(2), 9-23

- Manavi, M. A., Nasab, M. H., Daghighi, S. M., Baeri, M., 2023, Neonicotinoids, *Encyclopedia of Toxicology*, (4th Ed.), 6, 695-705
- Martinez, M. P., Angulo, R., Pozo R., Jodral, 1997, Organochlorine Pesticides in Pasteurized Milk and Associated Health Risks, *Food and Chemical Toxicology* 35, 621-624
- Matsuda, K., Ihara, M., Sattelle, D. B., 2020, Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 60, 241-255
- Mauriz, E., Calle, A., Manclus, J. J., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lechuga, L. M., 2007a, Optical immunosensor for fast and sensitive detection of DDT and related compounds in river water samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1410–1418
- Mauriz, E., Calle, A., Manclus, J. J., Montaya, A., Lechuga, L. M., 2007b, Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides, *Anal Bioanal Chem*, 387:1449–1458
- Mauriz, E., Calle, A., Montoya, A., Lechuga, L. M., 2006, Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor, *Talanta*, 359–364
- McKeague, M., Giamberardino, A., DeRosa, M. C., 2011, Advances in Aptamer-Based Biosensors for Food Safety, *Environmental Biosensors*, Prof. Vernon Somerset (Ed.), 31, 1-20
- Mehrotra, P., 2016, Biosensors and their applications A review, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6, 153 – 159
- Mehta, J., Rouah-Martin, E., Van Dorst, B., Maes, B., Herrebout, W., Scippo, M.-L., Dardenne, F., Blust, R., Robbens, J., 2012, Selection and characterization of PCB-binding DNA aptamers, *Anal. Chem.*, 84 (3), 1669–1676
- Melis, L. V. J., Bak, T., Peerdeman, A. M., van Kleef, R. G. D. M., Wopken, J. P., Westerink, R. H. S., 2022, Acute, prolonged, and chronic exposure to organochlorine insecticides evoke differential effects on in vitro neuronal activity and network development, *Neurotoxicology*, 111, 103308
- Mengitsu, D. A., Geremew, A., Tessema, R. A., Wolfing, T., Concentrations of DDT metabolites in different food items and public health risk in Africa regions: systematic review and meta-analysis, *Public Health*, 13:1511012
- Miao, J., Liu, A., Wu, L., Yu, M., Wai, W., Liu, S, Magnetic ferroferric oxide and polydopamine molecularly imprinted polymer nanocomposites based electrochemical impedance sensor for the selective separation and sensitive determination of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), *Analytica Chimica Acta*, 1095, 82-92

- Morou, E., İsmail, H. M., Dowd, A. J., Hemingway, J., Labrou, N., Paine, M., Vontas, J., 2008, A dehydrochlorinase-based pH change assay for determination of DDT in sprayed surfaces, *Anal. Biochem.*, 378, 60–64
- Mulholland, C., Jesrtabova, I., Sett, A., Ondrus, M., Sykorova, V., Manzanares, C. L., Simoncik, O., Muller, P., Hock, M., 2023, The selection of a hydrophobic 7-phenylbutyl-7-deazaadenine-modified DNA aptamer with high binding affinity for the Heat Shock Protein 70, *Communications Chemistry*, 6:65
- Müller, P., 1948, Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane and Newer Insecticides, Nobel Lecture., <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1948/muller/lecture/>>
- Oberhaus, F. V., Frense, D., Beckmann, D., Immobilization Techniques for Aptamers on Gold Electrodes for the Electrochemical Detection of Proteins: A Review, *Biosensors*, 10, 45
- O'Mullane, A. P., Ippolito, S. J., Sabri, Y. M., Bansaş, V., Bhargava, 2009, Premonolayer Oxidation of Nanostructured Gold: An Important Factor Influencing Electrocatalytic Activity, *Langmuir*, Vol. 25, 6, 3845-3852
- Nag, S. K., Raikwar, M. K., 2008, Organochlorine Pesticide Residues in Bovine Milk, *Bull Environ Contam Toxicol*, 80, 5–9
- Pang, L. Yang, P., Pang, R., Li, S., 2017, Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide-based frozen ionic liquid for the hollow-fiber solid-phase microextraction of dichlorodiphenyltrichloroethane and its main metabolites, *Journal of separation science*, vol. 40, 16, 3311-3317
- Ponzo, I., Möller, F., M., Daub, H., Matscheko, N., A DNA-Based Biosensor Assay for the Kinetic Characterization of Ion-Dependent Aptamer Folding and Protein Binding, *Molecules*, 24, 2877
- Prasad, B. B., Jauhari, D., 2015, A dual-template biomimetic molecularly imprinted dendrimer-based piezoelectric sensor for ultratrace analysis of organochlorine pesticides, *Sensors and Actuators B*, 207, 542–551
- Prodromidis, M. I., Karayannis, M. I., Enzyme Based Amperometric Biosensors for Food Analysis, *Electroanalysis*, 14, 4, 241-261
- Proske D., Blank, M., Buhmann, R., Resch, A., 2005, Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, 367–374
- Radi, A. E., 2011, Electrochemical Aptamer-Based Biosensors: Recent Advances and Perspectives, *International Journal of Electrochemistry*, 2011, 863196, 17
- Rao, S. V., Anderson, K. W., Bachas, L. G., 1998, Oriented Immobilization of Proteins, *Mikrochim. Acta* 128, 127-143

- Rêgo, I. C. V., dos Santos, G. N. V., Ribeiro, J. S., Lopes, R. B., dos Santos, S. B., de Sousa, A., Mendes, R. A., Taketomi, A. T. F., Vasconcelos, A. A., Taube, P. S., 2019, Organochlorine pesticides residues in commercial milk: a systematic review, *Acta Agronómica*, 68 (2), 25-33
- Ricci, F., Lai, R. Y., Heeger, A. J., Plaxco, K. W., Sumner, J. J., 2007, Effect of Molecular Crowding on the Response of an Electrochemical DNA Sensor, *Langmuir*, 23, 6827-6834
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., Heineman, W. R., 2008, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1747–1763
- Roy, G., Gupta, R., Sahoo, S. R., Saha, S., Asthana, D., Mondal, P. C., 2022, Ferrocene as an iconic redox marker: from solution chemistry to molecular electronic devices, *Coordination Chemistry Reviews*, 473, 15, 214816
- Sandstroma, M. W., Nowell, L. H., Mahler, B., J., Van Metrec, P. C., 2022, New-generation pesticides are prevalent in California's Central Coast streams, *Science of the Total Environment*, 806, 150683
- Sarikaya, A. G., Osman, B., Çam, T., Denizli, A., Molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensor for uric acid determination, *Sensors and Actuators B*, 251, 763–772
- Sassolas, A., Leca-Bouvier, D., Blum, L. J., 2008, DNA Biosensors and Microarrays, *Chem. Rev.*, 108, 109–139
- Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O'Donoghue, M. B., Tan W., 2010, Development of DNA aptamers using Cell-SELEX, *Nature protocols*, 5 (6), 1169-1185,
- Shaker, E. M., Elsharkawy, E. E., Organochlorine and organophosphorus pesticides residues in raw buffalo milk from agroindustrial areas in Assiut, Egypt, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39, 433-440
- Shen, W. Li S., Park, M-K, Zhang, Z., Cheng, Z., Petrenko, V. A., Chin, M-K, 2012, Blocking Agent Optimization for Nonspecific Binding on Phage Based Magnetoelastic Biosensors, *Journal of The Electrochemical Society*, 159(10), B818-B823
- Song S., Wang L., Li J., Zhao, J., Fan, C, 2008, Aptamer-based biosensors, *Trends in Analytical Chemistry*, 27(2), 108-117
- Song, S., Xu, H., Fan, C., Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions, *International Journal of Nanomedicine*, 1(4) 433–440
- Song, K. M., Lee, S., Ban, C., 2012, Aptamers and Their Biological Applications, *Sensors*, 12, 612-631

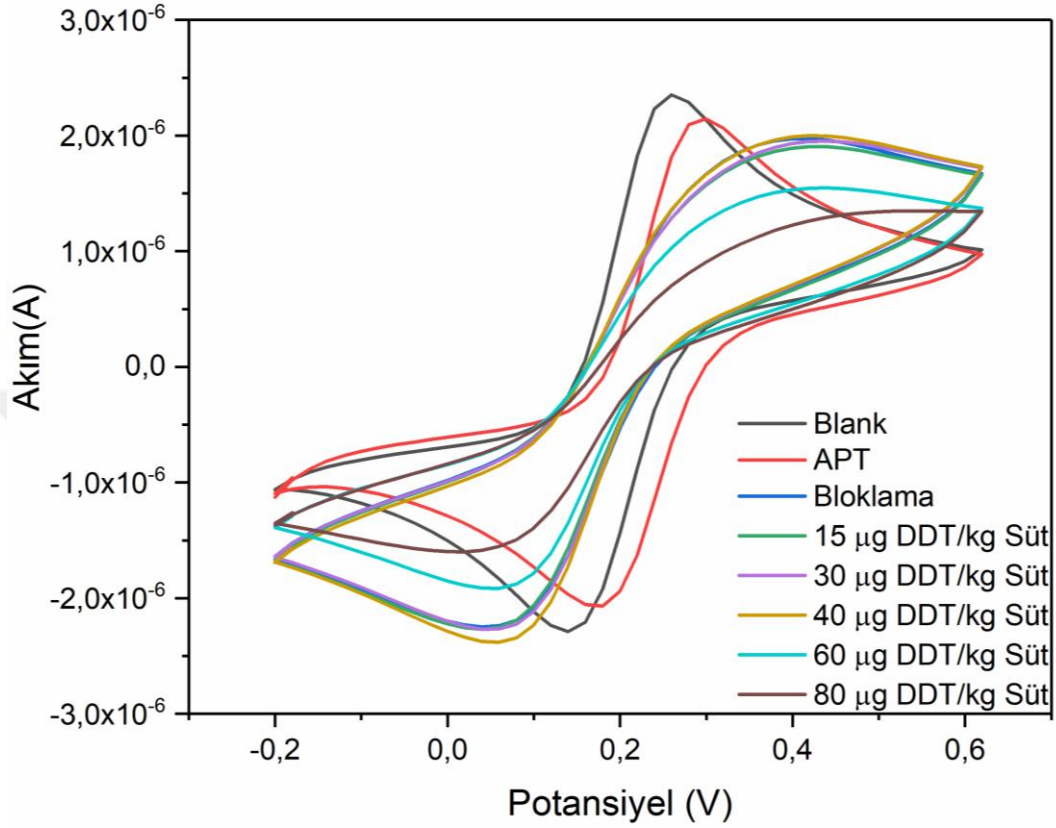
- Soon, S., Nordin, N. A., 2019, *In silico* predictions and optimization of aptamers against *Streptococcus agalactiae* surface protein using computational docking, *Materials Today: Proceedings*, 16, 2096–2100
- Steel, A. B., Herne, T. M., Tarlov, M. J., 1998, Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold, *Anal. Chem.* 1998, 70, 4670-4677
- Şahin, S., Kaya, Ş., Üstündağ, Z., Çağlayan, 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, 907–915
- Teixeira, L. A., Andaloro, J. T., 2013, Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1-3
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S., 2001, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, (1–2), 121-131
- Tuerk C. ve Gold L., 1990, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase, *Science*, 249, 505-510
- Turner, A. P. F., 2013, Biosensors: sense and sensibility, *Chem. Soc. Rev.*, 42, 3184
- Türkoğlu, E. A., Yavuz, H., Uzun, L., Akgöl, A., Denizli, A., 2012, The fabrication of nanosensor-based surface plasmon resonance for IgG detection, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41: 213–221
- Umulisa, V., Kalisa, D., Skutlarek, D., Reischert, B., 2020, First evaluation of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) residues and other Persistence Organic Pollutants in soils of Rwanda: Nyabarongo urban versus rural wetlands, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110574
- Vadhva, P., Hu, J., Johnson, M. J., Stocker, R., Braglia, M., Brett, D. J. L., Rettie, A. J. E., 2021, Electrochemical Impedance Spectroscopy for All-Solid-State Batteries: Theory, Methods and Future Outlook, *Chem. Electro. Chem.*, 8, 1930–1947
- Villalonga, A., Parrado, C., Diaz, R., Sanchez, A., Mayol, B., Martinez-Ruiz, P. Vilela, D., Villalonga, R., 2022, Supramolecular Enzymatic Labeling for Aptamer Switch-Based Electrochemical Biosensor, *Biosensors*, 12 (7), 514
- Wang, J., 2006, Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1887–1892
- Wang, Y., Feng, J., Tan, Z., Wang, H., 2014, Electrochemical impedance spectroscopy aptasensor for ultrasensitive detection of adenosine with dual backfillers, *Biosensors and Bioelectronics*, 60, 218–223

- Wang, W., Wang, W., Davis, J.J., 2015, Ultrasensitive and selective voltammetric aptasensor for dopamine based on a conducting polymer nanocomposite doped with graphene oxide, *Microchim Acta* 182, 1123–1129
- Waxman, M. F., 1998, Agrochemical and Pesticide Safety Handbook, *Lewis Publishers*, CRC Press, 41
- Wu, L., Qi, P., Fu, X., Liu, H., Li, J., Wang, Q., Fan, H., 2016, A novel electrochemical PCB77-binding DNA aptamer biosensor for selective detection of PCB77, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 771, 15, 45-49
- Yan, Z., Gan, N., Wang, D., Cao, Y., Chen, M., Li, T., Chen, Y., 2015, A “signal-on” aptasensor for simultaneous detection of chloramphenicol and polychlorinated biphenyls using multi-metalions encoded nanospherical brushes as tracers, *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 718–724
- Yang, D.-K., Chou, C.-F., Chen, L.-C., 2018, Selection of aptamers for AMACR detection from DNA libraries with different primers, *RSC Adv.*, 8, 19067-19074
- Yousef, H., Liu, Y., Zheng, L., 2022, Nanomaterial-Based Label-Free Electrochemical Aptasensors for the Detection of Thrombin, *Biosensors*, 12, 253
- Zacharia, J. T., 2011, Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis, Edited by Dr. Margarita Stoytcheva, Chapter 1, Identity, *Physical and Chemical Properties of Pesticides*, 978-953-307-437-5
- Zeng, S., Yong, K-T, Roy, I., Dinh, X. Q., Yu, X., Luan, F., 2011, A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications, *Plasmonics*, 6, 491–506
- Zhang, W., Li, D., Zhang, J., Jiang, L., Li, Z., Lin, S., 2020, Preparation and Characterization of Aptamers Against O,p'-DDT, *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 2211
- Zhang, Y., 2020, Electrochemical Aptamer Biosensors for the Detection of Amyloid-beta Oligomers, Yüksek lisans tezi, *Matematik, Enformatik ve Fen Bilimleri Fakültesi*, RWTH Aachen Üniversitesi, 19, 28
- Zhong, W., Xu, D., Chai, Z., Mao, X., 2001, survey of organochlorine pesticides in retail milk from Beijing, P. R. China, *Food Additives and Contaminants*, 20(3), 254–258
- Zhu, C., Yang, G, Li H., Du D., Lin, Y., 2015, Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures, *Anal. Chem.*, 87, 230–249



7. EKLER

EK-1. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan CV Grafikleri



Şekil 7.1. APT-1 aptameri ile S(1-1-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar ve EIS Nyquist grafikleri

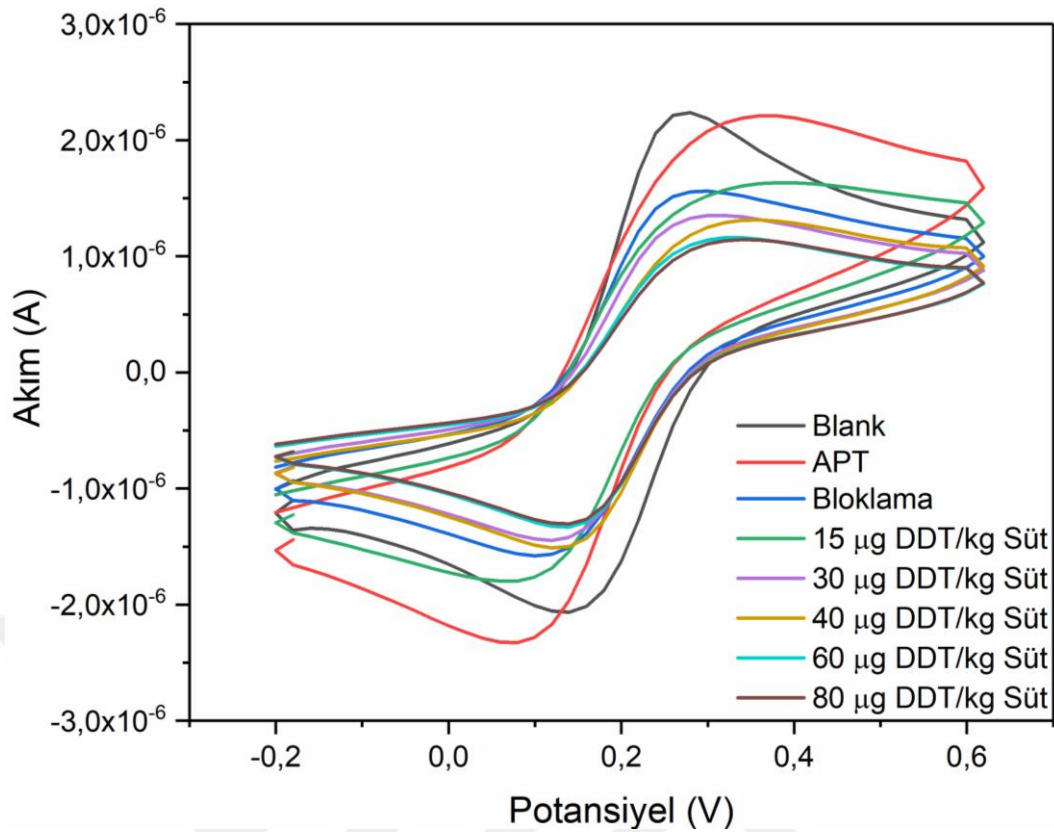
Şekil 7.1’de S(1-1-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} ve I_{pc} ise 2,29 μA olarak belirlenmiştir.

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redoks çifti, hızlı elektron transfer kinetiğine sahip olması nedeniyle elektrokimyasal çalışmalarda yaygın olarak tersinir bir sistem olarak kabul edilmektedir. Tersinir sistemlerde, anodik ve katodik pik akımları arasında $I_{pa} \approx I_{pc}$ olacak şekilde bir benzerlik beklenir. Bu çalışmada da elde edilen CV sonuçlarında I_{pa} ve I_{pc} değerlerinin birbirine eşit veya çok yakın olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, sonuçların

değerlendirilmesinde karşılaştırma parametresi olarak yalnızca I_{pa} değerleri kullanılmıştır.

Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,30 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,18 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 2,15 μA 'e düşerken ΔE_p 120 mV'a gerilemiştir. Teorik olarak aptamer tabakasının yük transferini kısmen engellenmesi, ΔE_p değerinde APT ile muamele sonrası azalma gözlemlenmiştir. Bu durumun, ölçümlerde gözlenen nispeten yüksek standart sapma değerlerinden ve grafiklerin üç farklı AuE elde edilen ölçümlerin ortalaması kullanılarak oluşturulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bloklama sırasında modifiye edilmemiş elektrot bölgelerinin yağız süt ile bloke edilmesi ise I_{pa} 'nin daha da azalmasına (1,97 μA) ve ΔE_p 'nin 380 mV'a yükselmesine neden olmuştur ki bu durum bloklama ajanının yüzeyi kaplayarak redoks prosesini daha fazla sınırlandırdığını doğrulamaktadır.

Bu basamaktan sonra 15 μg DDT/kg süt çözeltisi ile inkübasyon yapıldığında ΔE_p 'de kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Devamında yapılan 30 ve 40 μg DDT/kg süt örnekleri ile inkübasyonlar sonrasında her ikisinde de ise ΔE_p değerleri 400 mV, I_{pa} değerleri ise 1,95 μA ' olarak ölçülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlarda tepe akımı noktalarının düzensiz olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (60 ve 80 μg DDT/kg süt) I_{pa} değerleri sırasıyla 1.55 μA ve 1.25 μA değerlerine gerilemiştir. Buna karşın ΔE_p değerleri düzenli bir artış göstermemiş; 60 μg için 0,44 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,06 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler sonucu ΔE_p 380 mV, 80 μg için 0,54 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,04 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler sonucu ΔE_p ise 500 mV olarak ölçülmüştür.



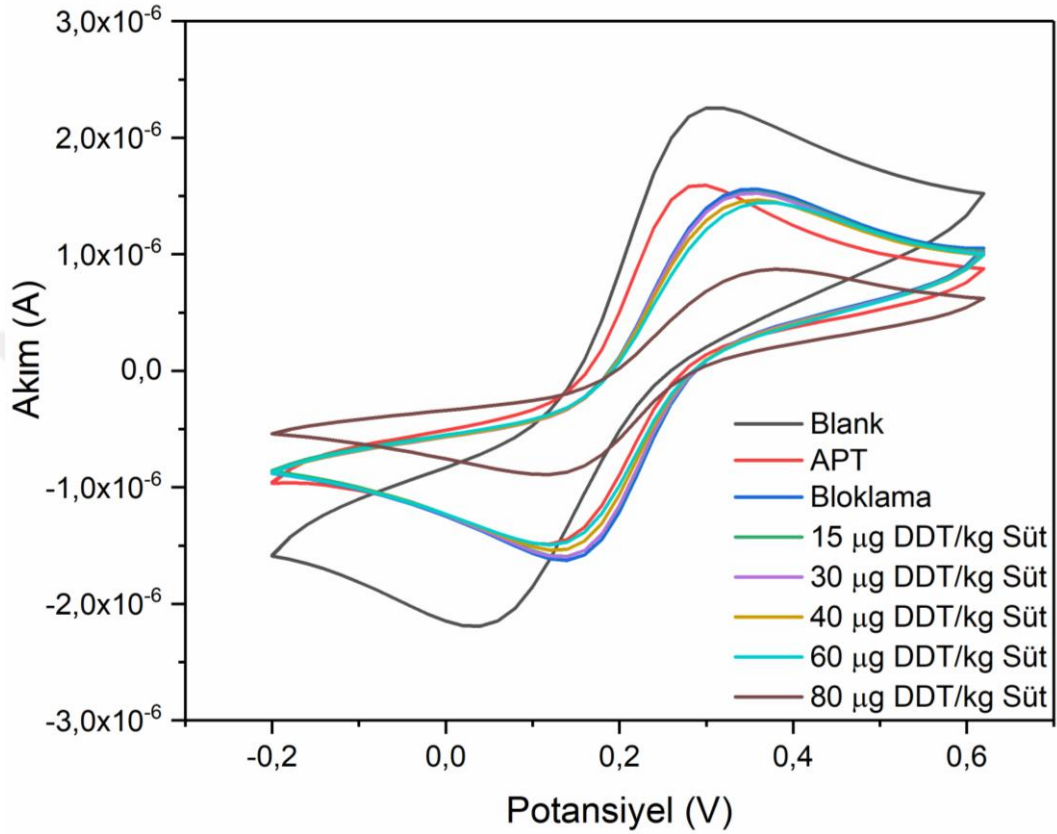
Şekil 7.2. APT-1 aptameri ile S(1-1-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.2’de verilen S(1-1-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} ve I_{pc} ise 2,24 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,32 V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,06 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 2,19 μA ’e düşerken ΔE_p 260 mV’a yükselmiştir.

Bloklama adımı sırasında ΔE_p değerinde artış beklenmesine rağmen bu değer 200 mV’a gerileyerek azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, yüzeyin bloklanması sonucunda I_p değerinde beklenen azalma gerçekleşmiş ve 1,56 μA olarak ölçülmüştür. Bu durum, bloklama ajanının elektrot yüzeyine bağlanarak yük transferini daha fazla kısıtladığını doğrulamaktadır.

15 μg DDT/kg süt örneği ile gerçekleştirilen inkübasyon sonrasında I_p değerinin beklenen aksine 1,60 μA ’a yükseldiği; 0,32V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,10 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler sonucu ΔE_p ’nin 220 mV’a,

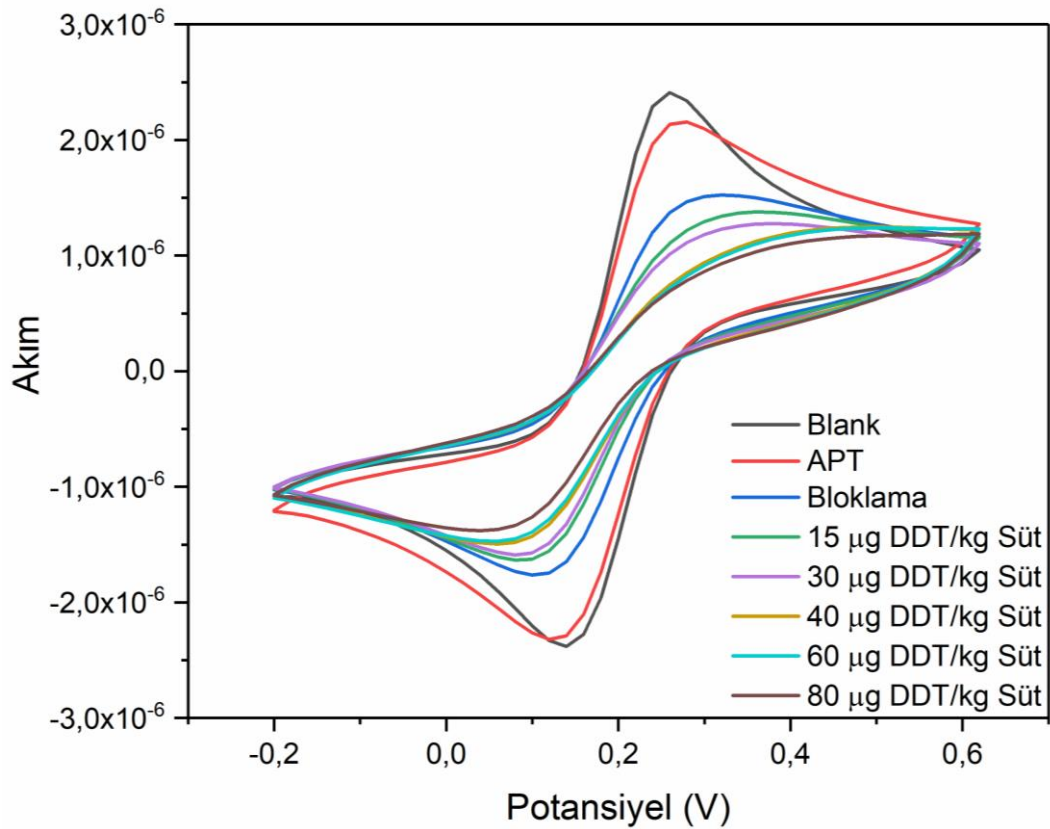
ulaştığı belirlenmiştir. DDT konsantrasyonunun artırıldığı 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt örnekleri ile yapılan inkübasyonlar sonrasında I_p değerleri sırasıyla 1,35; 1,31; 1,16 ve 1,14 μA olarak azalma eğilimi göstermiştir. Buna karşın ΔE_p değerlerinde düzenli bir artış saptanamamış; bu değerler sırasıyla 200, 240, 220 ve 260 mV olarak ölçülmüştür.



Şekil 7.3. APT-1 aptameri ile S(1-1-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.3'te verilen S(1-1-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Aptamerin elektrot yüzeyine immobilizasyonu 0,30 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,12 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 180 mV, I_{pa} ve I_{pc} ise 1,59 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından yağsız süt ile bloke edilmesi, modifiye edilmemiş yüzey bölgelerinin kaplanarak redoks çiftinin elektrota erişiminin kısıtlanmasına yol açmış, 0,36 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,14 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 1,56 μA 'e düşerken ΔE_p 220 mV'a yükselmiştir.

Bloklama adımı takiben 15 ve 30 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt ile yapılan inkübasyonlarda ΔE_p değerinde belirgin bir artış gözlemlenmemiş, 0,36 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,14 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir, ΔE_p 220 mV değerinde sabit kalmıştır. Buna karşın I_{pa} değerleri sırasıyla 1,53 ve 1,52 μA olarak kaydedilmiştir. Daha yüksek derişimlerde yapılan 40 ve 60 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt inkübasyonları sonrasında 0,36 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,12 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir, ΔE_p 240 mV değerinde sabit kalmıştır. I_{pa} değerleri ise sırasıyla 1,46 ve 1,44 μA 'e düşmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 80 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt inkübasyonu sonrasında I_{pa} 'de belirgin bir azalma gözlenmiş ve değer 0,87 μA 'e kadar düşmüştür; buna karşılık 0,38 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,12 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenerek, ΔE_p 'nin 260 mV'a yükseldiği tespit edilmiştir.



Şekil 7.4. APT-1 aptameri ile S(1-2-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

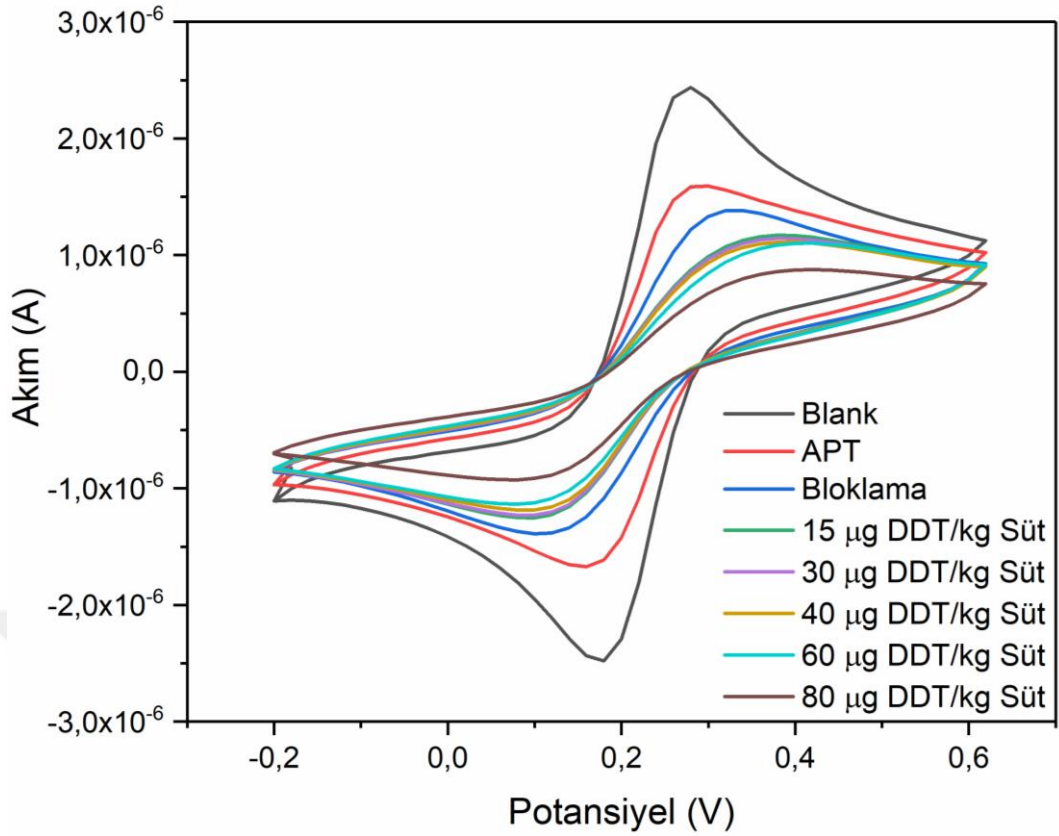
Şekil 7.4'te S(1-2-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,26 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$

'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 120 mV, I_{pa} ise 2,41 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,28 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,12 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 2,15 μA 'e düşmüş ve ΔE_p 160 mV'a yükselmiştir.

Bloklama aşamasında 0,32 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,10 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 220 mV değerine yükselmiş, I_{pa} ise 1,52 μA değerine düşmüştür.

Bu basamaktan sonra 15 μg DDT/kg süt çözeltisi ile inkübasyon yapıldığında ΔE_p değerinin arttığı ve anodik pikin 0,36 V ve katodik pikin 0,04 V değeriyle birlikte ΔE_p 'nin 320 mV'a çıktığı; I_{pa} değerinin ise 1,38 μA 'e gerilediği belirlenmiştir.

30 μg DDT/kg süt ile yapılan inkübasyon sonrasında ise ΔE_p 'nin artması beklenirken yüksek standart sapma değerine bağlı olduğu düşünülen ortalama bir gerileme ile, anodik pikin 0,38 V, katodik pikin 0,08 V değerleri verdiği ve bu değerlerden de ΔE_p 'nin 300 mV'a düştüğü; buna karşın I_{pa} değerinin beklendiği üzere 1,29 μA 'e gerilediği görülmüştür. Ardından 40 ve 60 μg DDT/kg süt ile yapılan inkübasyonlarda her iki derişimde de 0,50 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,06 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir ΔE_p 'nin 440 mV olduğu; I_{pa} değerlerinin ise sırasıyla 1,25 ve 1,24 μA olarak ölçüldüğü tespit edilmiştir. 80 μg DDT/kg süt ile inkübasyon sonrasında ise I_{pa} değeri 1,55 μA 'e düşerken, anodik piki 0,62 V ve katodik piki 0,04 V olacak şekilde ΔE_p değeri 580 mV'a yükselmiştir.



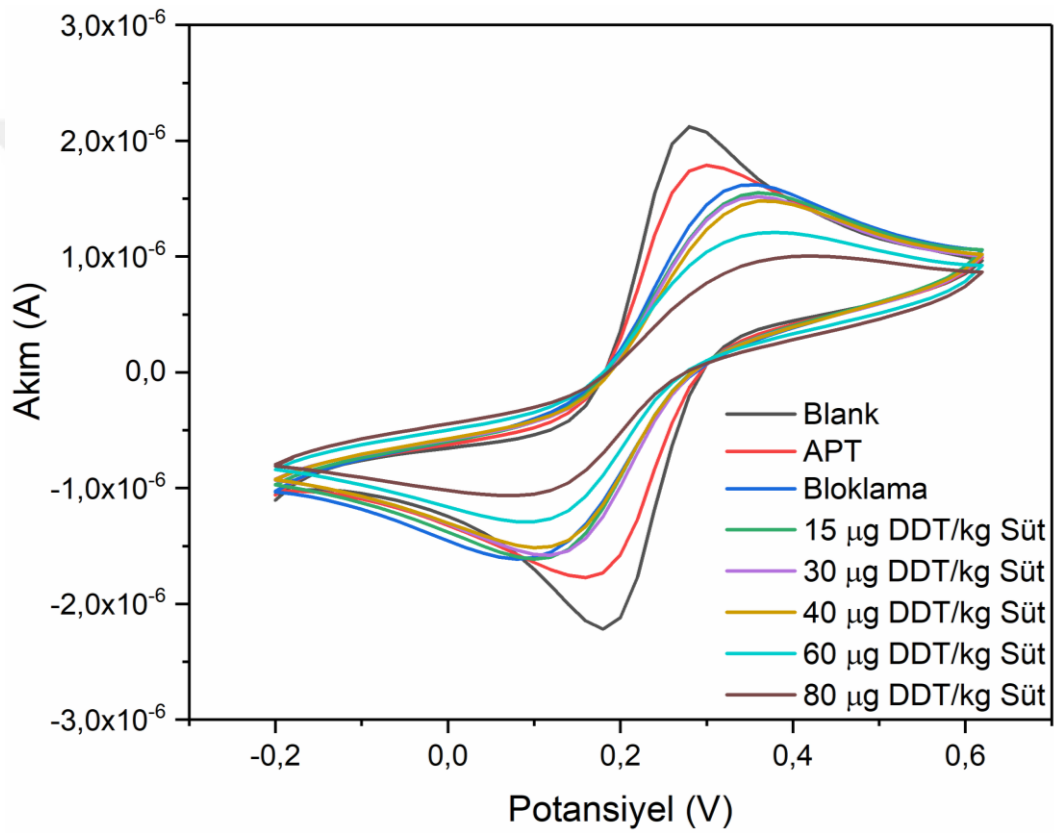
Şekil 7.5. APT-1 aptameri ile S(1-2-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.5 'te, S(1-2-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,18 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 100 mV, I_{pa} ise 2,44 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,30 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,16 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 1,59 μA 'e düşmüş ve ΔE_p 140 mV'a yükselmiştir.

Bloklama aşamasında 0,34 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,10 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 240 mV'a yükselmiş, I_{pa} ise 1,38 μA değerine düşmüştür.

Bu basamaktan sonra 15 ve 30 μg DDT/kg süt çözeltisi ile inkübasyon yapıldığında ΔE_p değerinin arttığı ve anodik pikin 0,38 V ve katodik pikin 0,10 V değeriyle birlikte ΔE_p 'nin 280 mV'a çıktığı; I_{pa} değerinin ise sırasıyla 1,17 ve 1,14 μA 'e gerilediği belirlenmiştir.

40 ve 60 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt inkübasyonları sonrasında ΔE_p artmaya devam ederek sırasıyla 40 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt için anodik pikin 0,40 V ve katodik pikin 0,08 V değeriyle birlikte ΔE_p 'nin 320 mV'a çıktığı, 60 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt için ise anodik pikin 0,42 V ve katodik pikin 0,08 V değeriyle birlikte ΔE_p 'nin 340 mV'a çıktığı hesaplanmıştır. I_{pa} değerleri düşerek 1,11 μA ve 1,10 μA değerlerini almıştır. En yüksek konsantrasyon olan 80 $\mu\text{g DDT/kg}$ süt inkübasyonu sonrasında I_{pa} 'de belirgin bir azalma gözlenmiş ve değer 0,87 μA 'e kadar düşmüştür; buna karşılık anodik ve katodik pik potansiyelleri değişmediğinden ΔE_p 'nin sabit kaldığı tespit edilmiştir.



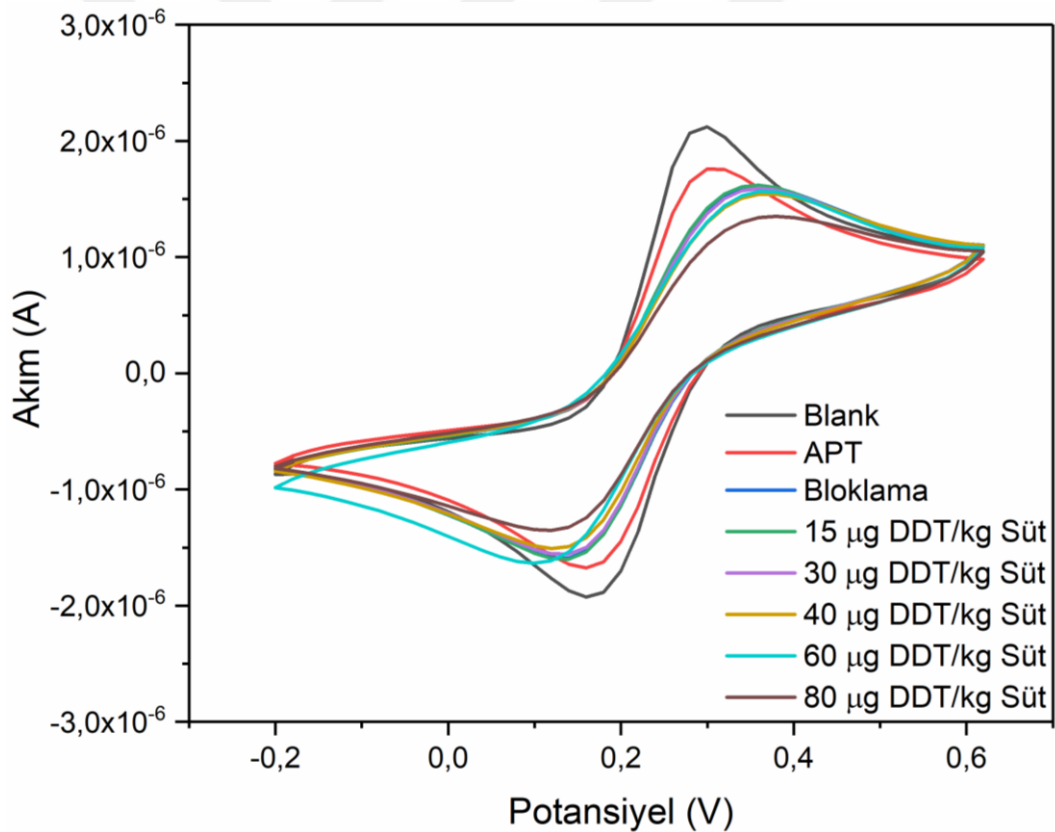
Şekil 7.6. APT-1 aptameri ile S(1-2-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.6.'da S(1-2-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Aptamerin elektrot yüzeyine immobilizasyonu öncesinde 0,28 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,18 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler, immobilizasyondan sonra sırasıyla 0,3 V ve 0,16 V değerine ulaşmıştır. Bu voltammogramlarda ΔE_p değerlerinin sırasıyla 100 mV ve 140 mV olarak arttığı belirlenmiştir. I_{pa} ise sırasıyla 2,12 ve 1,79 μA olarak azaldığı gözlenmiştir.

Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,36 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,08 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri $1,62 \mu A$ 'e düşerken ΔE_p 280 mV'a yükselmiştir.

Bloklama adımını takiben $15 \mu g$ DDT/kg süt ile yapılan inkübasyonlarda ΔE_p değerinde belirgin bir artış gözlemlenmemiş, 0,36 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,14 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiş, ΔE_p 260 mV değerine düşmüştür. Buna karşın I_{pa} değerleri $1,55 \mu A$ değerine düşmüştür.

Daha yüksek derişimlerde yapılan 40, 60 ve $80 \mu g$ DDT/kg süt inkübasyonları sonrasında yükseltgenmeye karşılık gelen anodik pik değerleri sırasıyla 0,36 V, 0,38 V ve 0,42 V olarak ölçülürken ve indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler 0,10, 0,10 ve 0,08 V olarak gözlenmiştir. Bu değerlerle birlikte ΔE_p değerindeki yükseliş de sırasıyla 260, 280 ve 340 mV olarak belirlenmiştir. I_{pa} değerleri ise sırasıyla 1,48, 1,21 ve $1,00 \mu A$ olacak şekilde düştüğü belirlenmiştir.



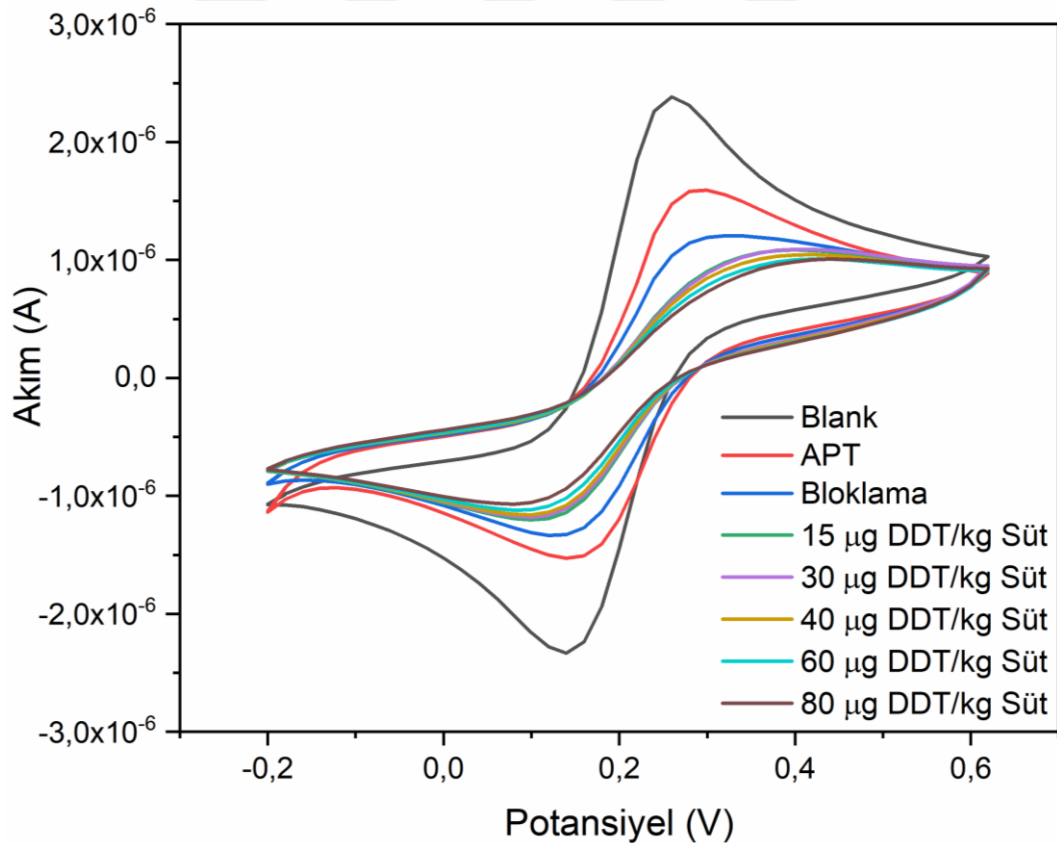
Şekil 7.7. APT-1 aptameri ile S(2-1-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.7'de S(2-1-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank

ölçümünde ve aptamer bağlanma aşamasından sonra elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde her ikisinde de 0,30 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,16 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p değeri 140 mV olarak hesaplanmış, I_{pa} ise sırasıyla 2,12 ve 1,76 μA olarak belirlenmiştir.

Elektrot yüzeyinin bloklanmasını ve ardından 15 ve 30 μg DDT/kg süt ile yapılan inkübasyonlarda 0,36 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,14 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri sırasıyla 1,61, 1,62 ve 1,59 μA olarak belirlenirken ΔE_p değerleri 220 mV'ta sabit kalmıştır.

Ardından 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt ile yapılan inkübasyonların her birinden elde edilen ΔE_p değerleri 260 olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değerlerinin ise sırasıyla 1,54 μA , 1,57 μA ve 1,35 μA olarak değişmiştir. 40 ve 80 μg DDT/kg süt ile inkübasyon sonrasında anodik piki 0,38 V ve katodik piki 0,12 V değerinde çıkarken, 60 μg DDT/kg süt inkübasyonları sonrasında bu değerler 0,36 ve 0,10 V çıkmıştır.



Şekil 7.8. APT-1 aptameri ile S(2-1-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

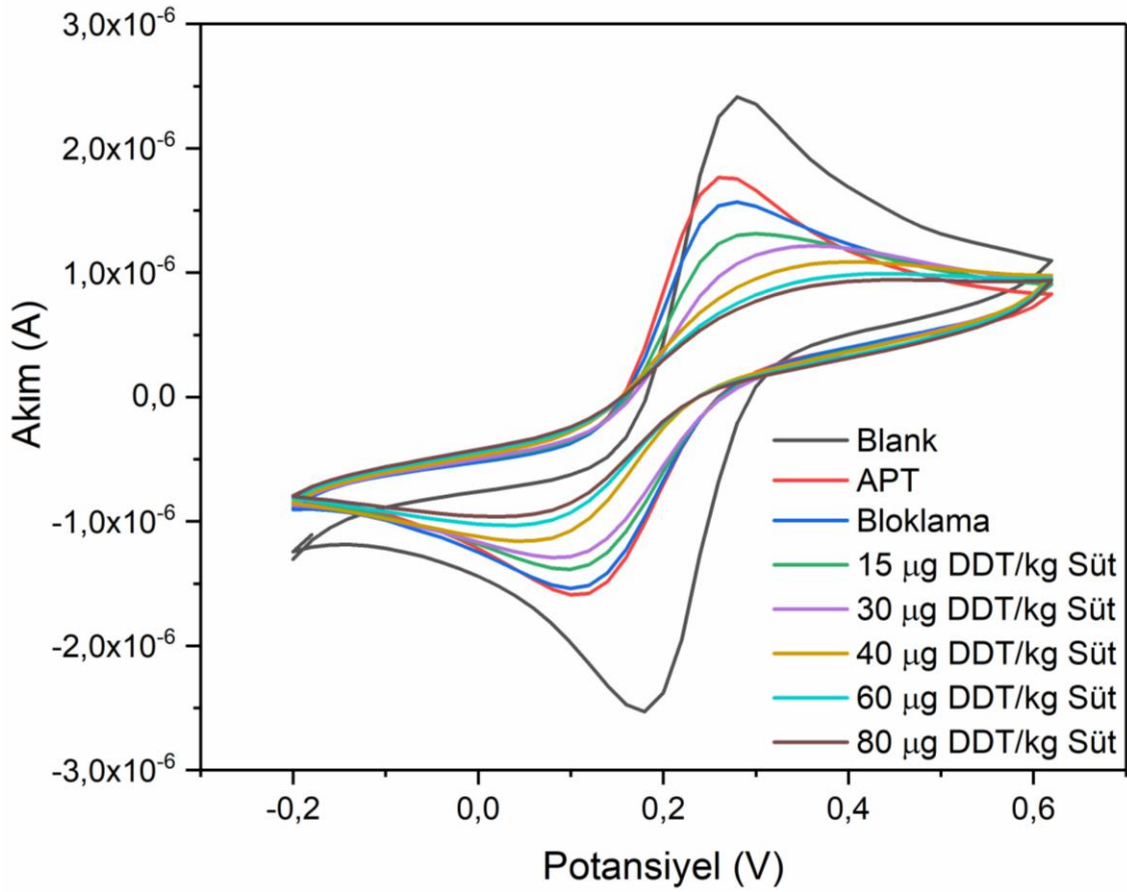
Şekil 7.8’de S(2-1-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,26 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 120 mV, I_{pa} ise 2,38 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,30 V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,14 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 1,59 μA ’e düşmüş ve ΔE_p 160 mV’a yükselmiştir.

Bloklama aşamasında 0,32 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,12 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 200 mV’a yükselmiş, I_{pa} ise 1,21 μA değerine düşmüştür.

Bu basamaktan sonra 15 μg DDT/kg süt çözeltisi ile inkübasyon yapıldığında anodik pikin 0,40 V ve katodik pikin 0,12 V değeriyle birlikte ΔE_p ’nin 320 mV’a çıktığı; I_{pa} değerinin ise sırasıyla 1,08 μA ’e gerilediği belirlenmiştir.

Ardından 30 ve 40 μg DDT/kg süt ile yapılan inkübasyonlarda her iki derişimde de 0,42 V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,10 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiş, ΔE_p değerleri değişmeyerek 320 mV’ta kalmıştır. I_{pa} değerlerinin ise sırasıyla 1,09 ve 1,04 μA olarak azaldığı tespit edilmiştir. 80 μg DDT/kg süt ile inkübasyon sonrasında ise I_{pa} değeri 1,55 μA ’e düşerken, anodik piki 0,62 V ve katodik piki 0,04 V olacak şekilde ΔE_p değeri 580 mV’a yükselmiştir.

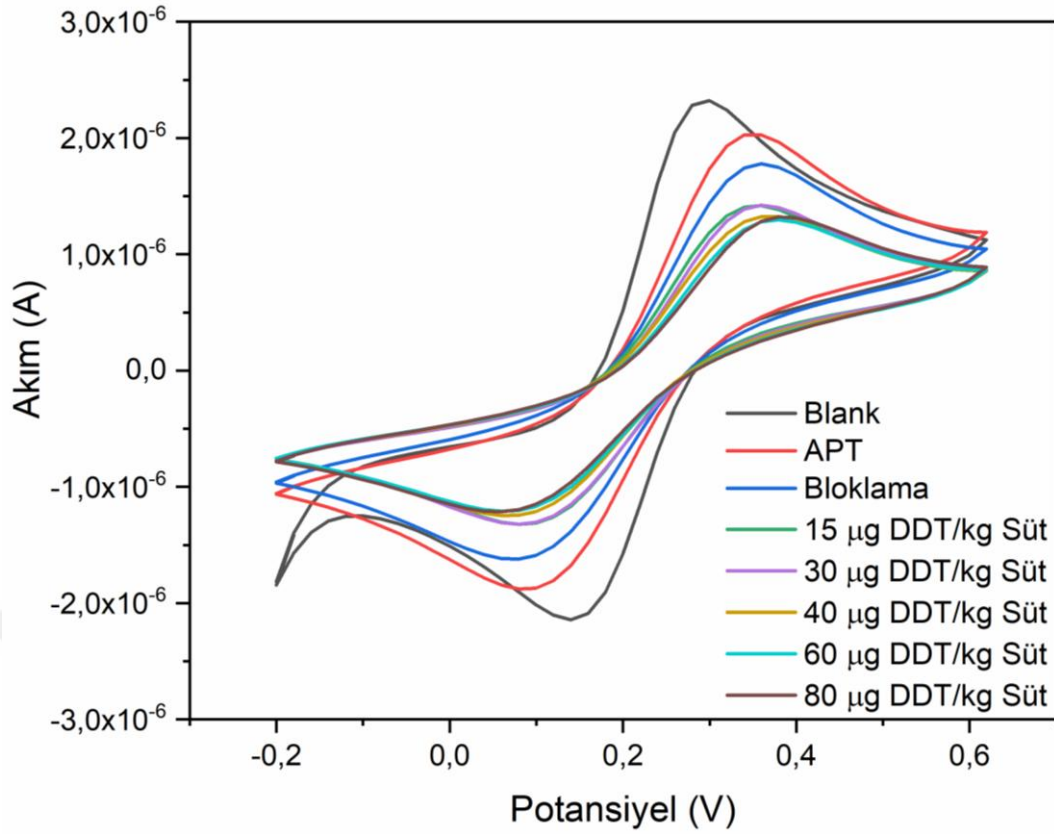
60 ve 80 μg DDT/kg süt inkübasyonları sonrasında ΔE_p artmaya devam ederek sırasıyla 60 μg DDT/kg süt için anodik pikin 0,42 V ve katodik pikin 0,08 V değeriyle birlikte ΔE_p ’nin 340 mV’a çıktığı, 80 μg DDT/kg süt için ise anodik pikin 0,44 V ve katodik pikin 0,08 V değeriyle birlikte ΔE_p ’nin 360 mV’a çıktığı hesaplanmıştır. Her iki ölçümde de I_{pa} değerleri 1,01 μA değerlerinde sabit kalmıştır.



Şekil 7.9. APT-1 aptameri ile S(2-1-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.9'da S(2-1-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünden itibaren tüm aşamalarda ΔE_p değerlerinde artış gözlenmiştir. Anodik ve katodik pik tepe noktaları blank ölçümü için sırasıyla, 0,28 V ve 0,18 V, aptamer ölçümü için 0,26 V ve 0,10 V, bloklama için 0,28 V ve 0,10 V olarak ölçülmüş, ΔE_p değerleri yine sırasıyla 100 , 160 ve 180 mV olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değerlerinin ise 2,41; 1,77 ve 1,57 μA olacak şekilde düşüş eğiliminde olduğu gözlenmiştir.

15, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt inkübasyonları için anodik pikler sırasıyla 0,30 V; 0,36 V; 0,40 V; 0,44 V; ve 0,46 V olarak belirlenmiştir. katodik pikler için ise bu değerler 0,10 V; 0,08 V; 0,04 V; 0,04 V ve 0,02 V olarak voltammogram değerlerinden okunmuştur. ΔE_p değerleri sırasıyla 200, 280, 320, 360 ve 400 mV olarak hesaplanmış. I_{pa} değerleri ise sırasıyla 1,31 μA , 1,22 μA , 1,09 μA , 0,92 μA ve 0,94 μA olarak belirlenmiştir.

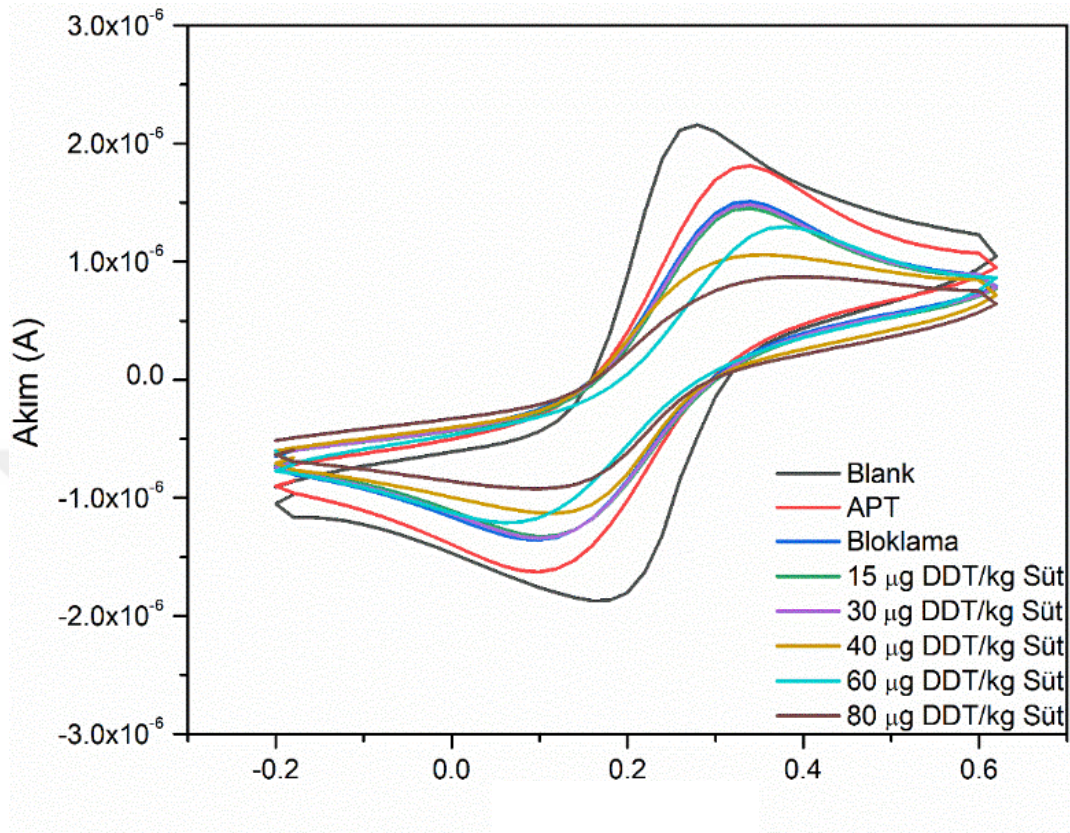


Şekil 7.10. APT-1 aptameri ile S(2-2-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.10'da S(2-2-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,30 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 160 mV, I_{pa} ise 2,32 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 30 μg DDT/kg süt konsantrasyonuna kadar alınan tüm ölçümlerde 0,36 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,08 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiş ve ΔE_p değeri sabit kalarak 280 mV olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değerleri ise sırasıyla 2,08; 1,78; 1,42; ve 1,42 μA değerini aldıkları belirlenmiştir.

40 μg DDT/kg süt ile inkübasyon sonrasında anodik pik değeri 0,36 V'a yükselirken katodik pik değeri 0,60 a düşmüştür. ΔE_p ise 300 mV'a ulaşırken I_{pa} 1,33 μA ölçülmüştür. 60 ve 80 μg DDT/kg süt örnekleri ile yapılan inkübasyonlar sonrasında I_p değerleri sırasıyla 1,30 ve 1,32 μA değerlerini alarak artma eğilimi göstermiştir. Buna

karşın anodik ve katodik pik potansiyelleri her ikisinde de sırasıyla 0,38 ve 0,06 olarak belirlenip ΔE_p değerleri 320 mV olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7.11. APT-1 aptameri ile S(2-2-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

S(2-2-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları Şekil 7.11’de gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V’da $Fe(CN)_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,16 V’da $Fe(CN)_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 120 mV, I_{pa} ise 2,16 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 40 μg DDT/kg süt konsantrasyonuna kadar alınan tüm ölçümlerde 0,34 V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,10 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiş ve ΔE_p değeri sabit kalarak 280 mV olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değerleri ise sırasıyla 1,81; 1,51; 1,45; 1,48 ve 1,06 μA değerini aldıkları belirlenmiştir.

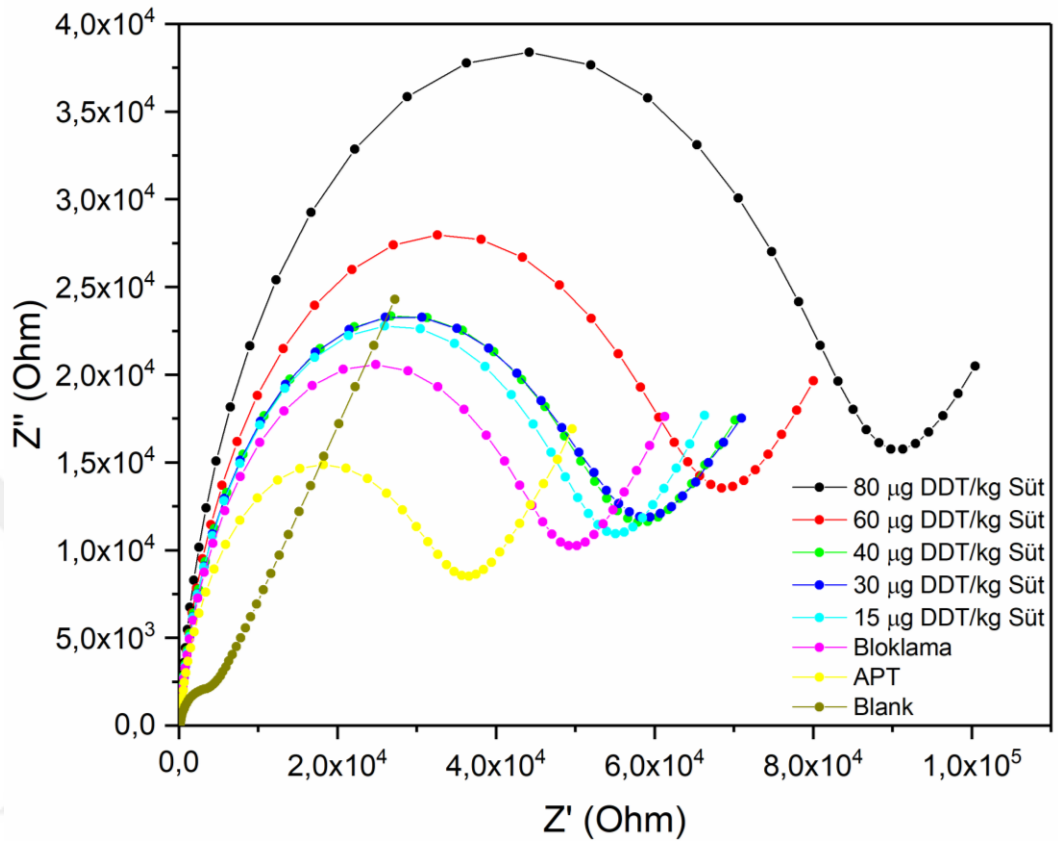
60 ve 80 μg DDT/kg süt örnekleri ile yapılan inkübasyonlar sonrasında I_p değerleri sırasıyla 1,30 ve 1,32 μA değerlerini alarak artma eğilimi göstermiştir. Bununla birlikte anodik ve katodik pik potansiyelleri 40 μg DDT/kg süt için sırasıyla 0,40 ve 0,10

mV 40 µg DDT/kg süt için ise 0,46 ve 0,04 V olarak belirlenmiştir. ΔE_p değerleride 340 V ve 420 V olarak hesaplanmıştır.



EK 2. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan EIS

Nyquist Grafikleri



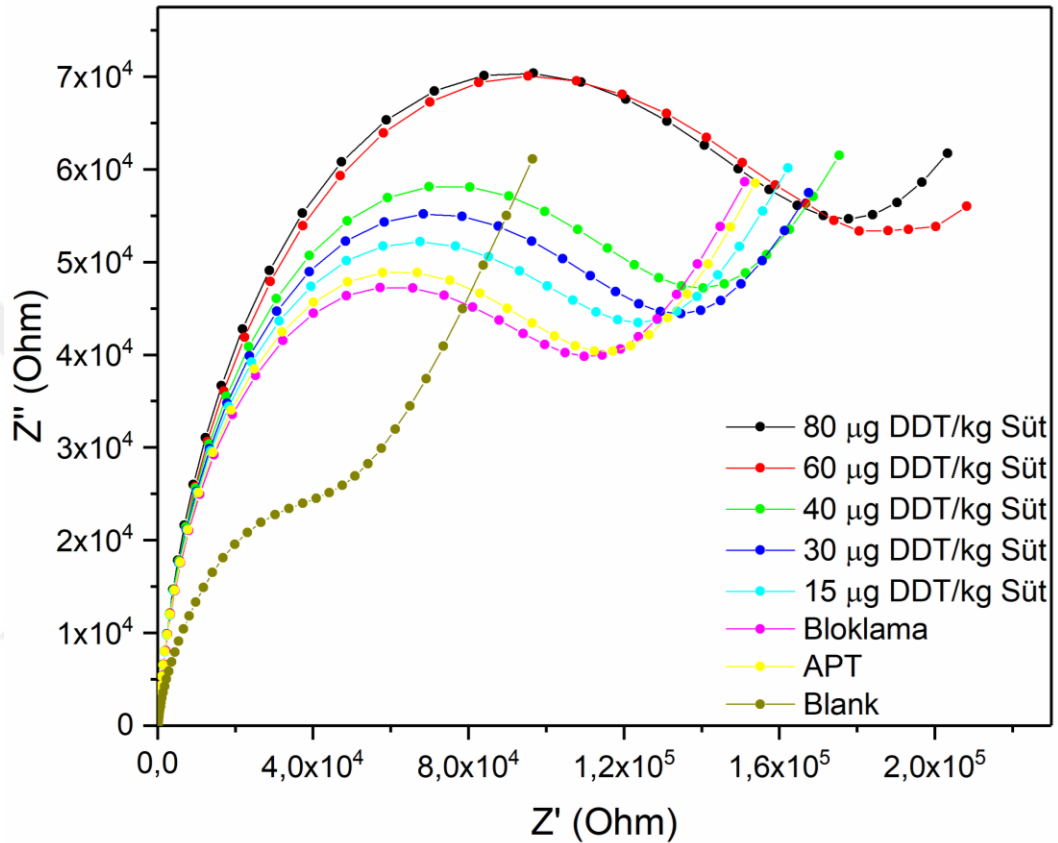
Şekil 7.12. APT-1 aptameri kullanılarak S(1-1-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.12’de S(1-1-0,5) koşuluyla hazırlanmış olan elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri verilmiştir. Elde edilen EIS spektrumları incelendiğinde, aptamer bağlanması ve bloklama aşamalarının ardından elektrot yüzeyinde yük transferine karşı fiziksel bir bariyer oluştuğu ve bunun sonucunda R_{ct} değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Bu noktadan sonra, elektrot üzerine eklenen DDT içeren süt çözeltilerinin derişimi arttıkça R_{ct} değerinde de artış beklenmektedir; ancak 15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında, bloklama aşamasına kıyasla R_{ct} ’nin 1,0 kΩ azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, daha yüksek DDT derişimlerinde beklenen davranış yeniden görülmüş; DDT bağlanmasıyla elektron transferine karşı oluşan ek direnç nedeniyle R_{ct} değerlerinde kademeli ve belirgin bir artış meydana gelmiştir. Numune çözeltilerindeki DDT miktarı arttıkça aptamer tabakasına bağlanan hedef molekül sayısının da artması, elektrot

yüzeyindeki elektron transferini daha fazla sınırlandırmış ve yük transfer direncinin yükselmesine yol açmıştır.

Nitekim 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt ile gerçekleştirilen inkübasyonlar sonrasında Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerlerinde artış görülmüş ve sırasıyla 9,9; 10,6; 15,3 ve 30,9 $\text{k}\Omega$ olarak hesaplatılmıştır.

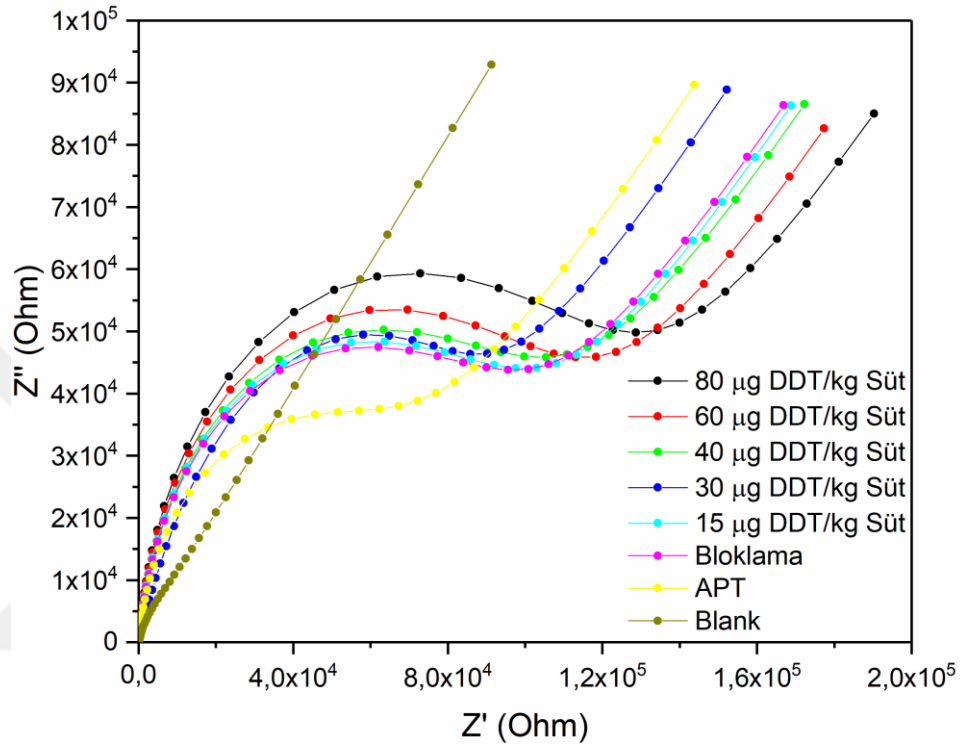


Şekil 7.13. APT-1 aptameri kullanılarak S(1-1-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.13'te S(1-1-1) koşuluyla hazırlanmış olan elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri verilmiştir. Elde edilen EIS spektrumları incelendiğinde 15 μg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında, bloklama aşamasına kıyasla R_{ct} 'nin 3,9 $\text{k}\Omega$ arttığı, bununla birlikte daha yüksek DDT derişimlerinde bu artışın devam ettiği gözlenmiştir. DDT bağlanmasıyla elektron transferine karşı oluşan ek direnç nedeniyle R_{ct} değerlerinde kademeli ve belirgin artış meydana gelmiş ve bu artış 80 μg DDT/kg süt konsantrasyonuna kadar sürmüştür.

30, 40 ve 60 μg DDT/kg süt ile gerçekleştirilen inkübasyonlar sonrasında Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{ct} değerlerinde artış görülmüş ve bloklamaya ait R_{ct} değeri ile

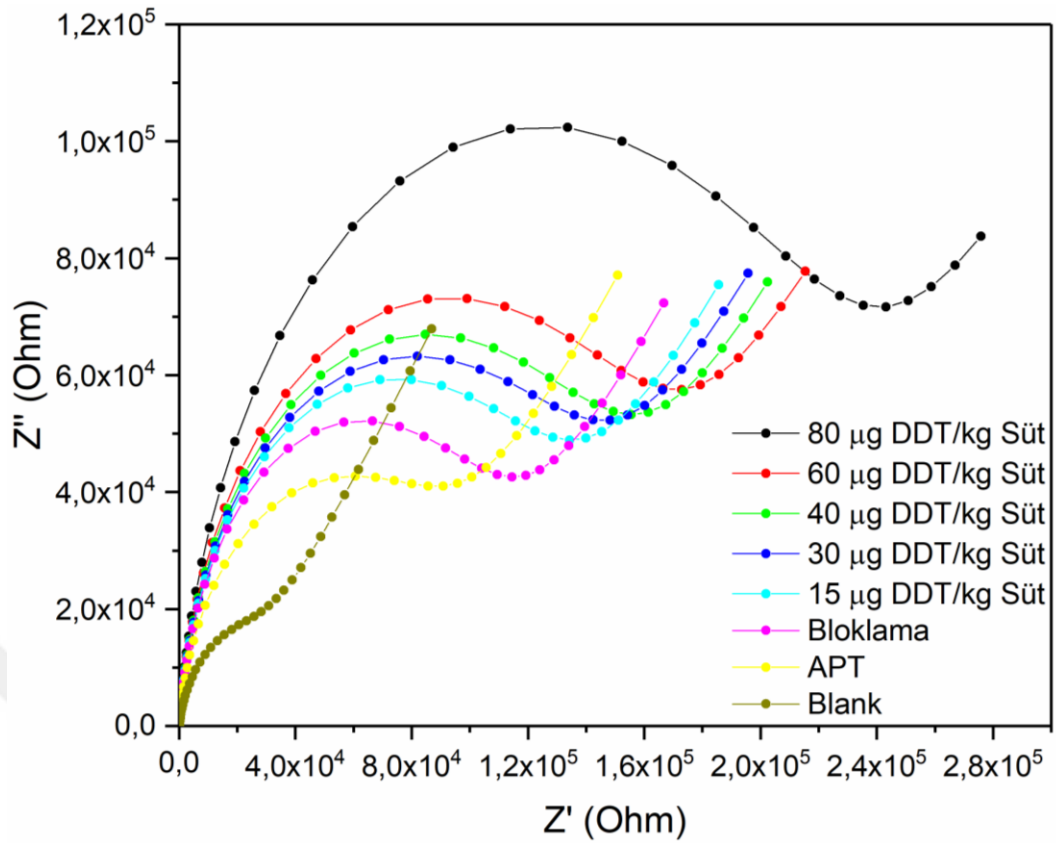
aralarındaki fark sırasıyla 5,0; 29,9; 46,9 k Ω olarak hesaplatılmıştır. En yüksek derişim olan 80 μg DDT/kg süt örneğinin R_{ct} değeri ile bloklama değeri arasındaki fark azalarak 44,7 k Ω 'a düştüğü gözlenmiştir. Bu durum, yüksek derişimlerde aptamer-DDT etkileşiminin doyum noktasına yaklaşılması nedeniyle sensör yüzeyindeki ek direnç artışının sınırlanmaya başladığını göstermektedir.



Şekil 7.14. APT-1 aptameri kullanılarak S(1-1-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.14'da S(1-1-2) koşuluyla hazırlanmış olan elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri gösterilmiştir. Elde edilen EIS Nyquist eğrileri incelendiğinde, 15 μg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında bloklama aşamasına kıyasla R_{ct} 'nin 6,63 k Ω arttığı belirlenmiştir.

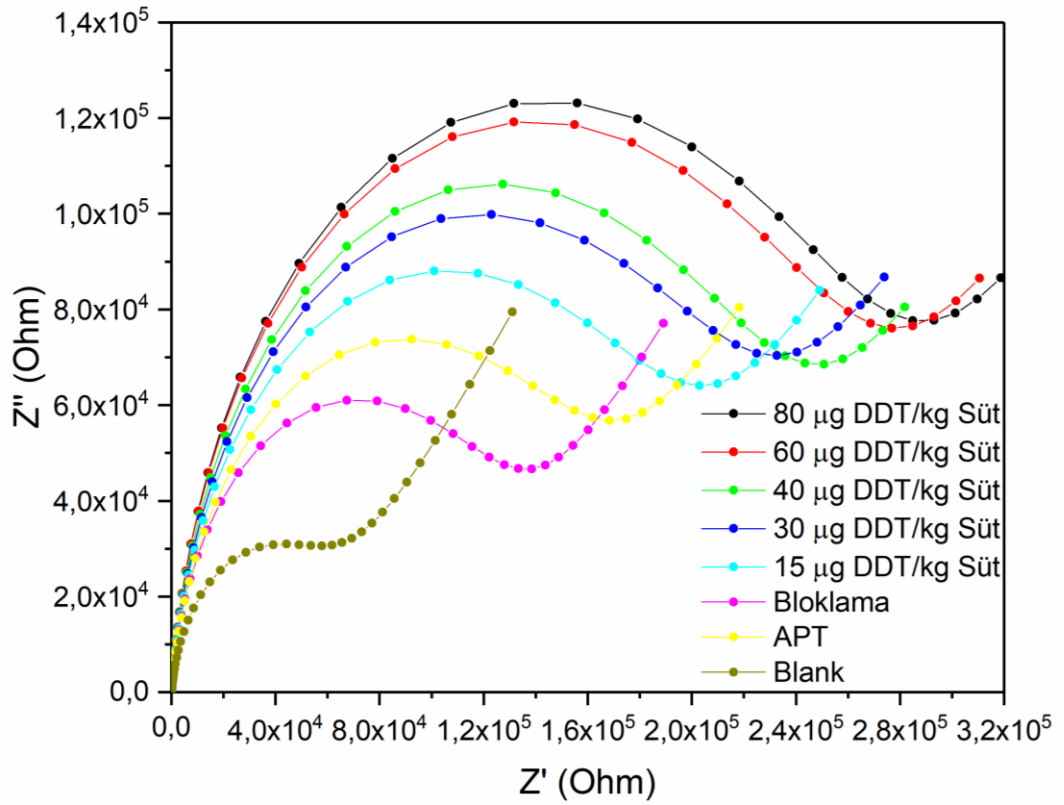
Bunun ardından gerçekleştirilen 30 μg DDT/kg süt inkübasyonunda ise beklenen eğilimin dışında bir davranış gözlenmiş ve bloklama aşamasına göre R_{ct} farkının 6,6 k Ω 'a gerileyerek hafifçe azaldığı tespit edilmiştir. Ancak daha yüksek DDT derişimlerinde beklenen artış eğilimi yeniden ortaya çıkmış; 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt ile gerçekleştirilen inkübasyonlar sonrasında bloklama R_{ct} değerine göre fark sırasıyla 8,1; 19,9 ve 25,2 k Ω olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. APT-1 aptameri kullanılarak S(1-2-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 4.15'te verilen S(1-2-0,5) koşuluyla hazırlanmış olan elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri incelendiğinde 15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında, bloklaama aşamasına kıyasla R_{ct} 'nin 5,1 k Ω arttığı ve daha yüksek DDT derişimlerinde bu artışın sürdüğü görülmüştür.

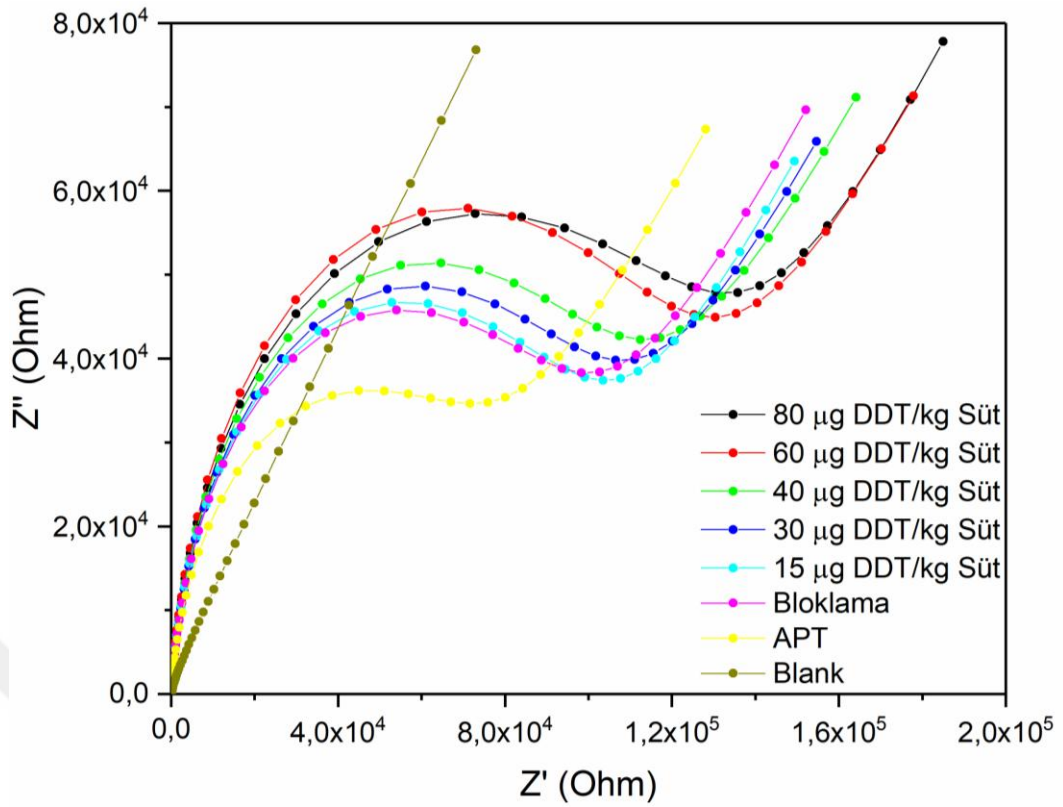
R_{ct} değerlerinde kademeli ve belirgin bir yükselme meydana gelmiş; 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt örneklerinden elde edilen R_{ct} artış değerleri sırasıyla 13,6; 22,9; 34,4 ve 89,9 olarak hesaplanmıştır. Bu durum, sensör yüzeyinde artan aptamer-DDT etkileşimi ile elektron transferinin giderek daha fazla kısıtlandığını ve yüksek konsantrasyonlarda bağlanmanın daha yoğun gerçekleşmesi nedeniyle empedans değişiminin güçlendiğini göstermektedir.



Şekil 7.16. APT-1 aptameri kullanılarak S(1-2-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.16’da S(1-2-1) koşuluyla hazırlanmış elektrot kullanılarak elde edilen EIS Nyquist grafikleri değerlendirildiğinde, 15 µg DDT/kg süt inkübasyonunun ardından R_{ct} değerinde bloklama aşamasına kıyasla 57,8 kΩ’luk belirgin bir artış ortaya çıktığı görülmektedir.

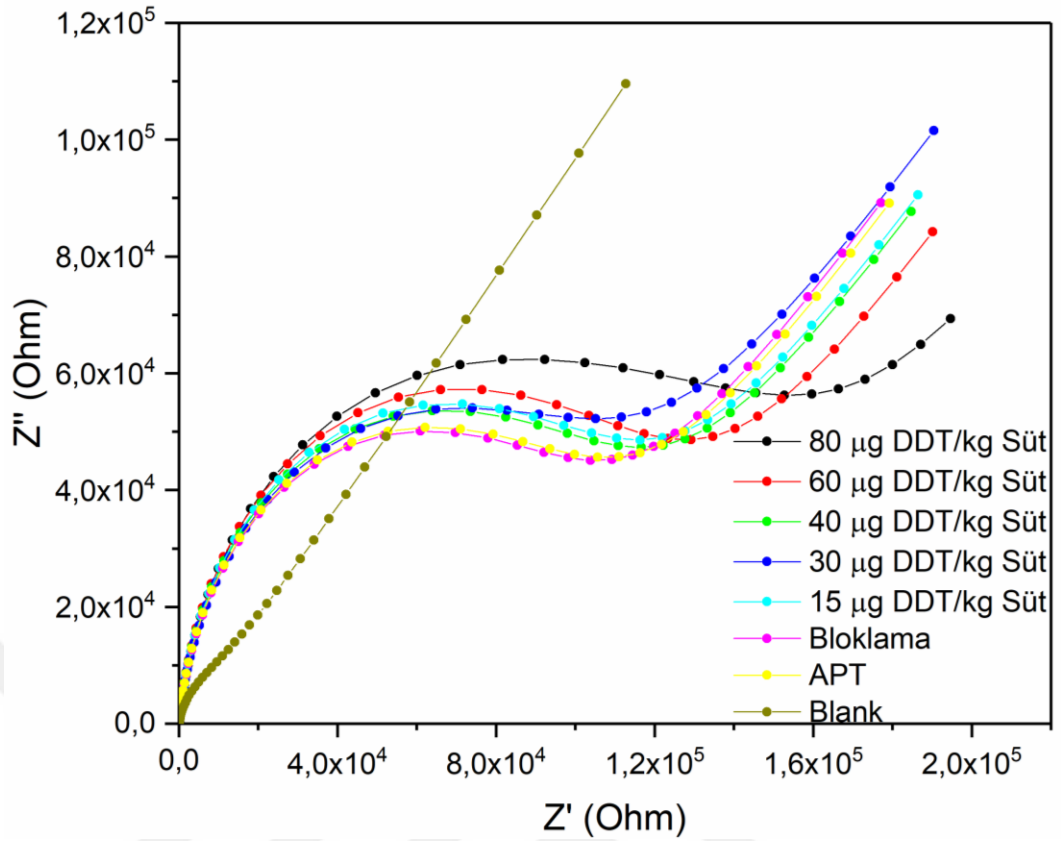
DDT konsantrasyonunun yükselmesiyle bu eğilim devam etmiş ve 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt inkübasyonlarında hesaplanan R_{ct} artışları sırasıyla 81,6; 91,33; 115,4 ve 118,0 kΩ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, sensörün artan analit miktarına karşı güçlü ve konsantrasyon bağımlı bir empedans yanıtı verdiğini göstermektedir.



Şekil 7.17. APT-1 aptameri kullanılarak S(1-2-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.17’de S(1-2-2) koşuluyla hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri incelendiğinde, 15 μg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında R_{ct} değerinin bloklama aşamasına göre yalnızca 0,9 $\text{k}\Omega$ arttığı ve başlangıçta sınırlı bir empedans değişimi olduğu görülmektedir.

DDT derişiminin artırılmasıyla birlikte sensör tepkisinin belirginleştiği ve 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt için hesaplanan R_{ct} artışlarının sırasıyla 5,1; 13,1 ve 25,1 $\text{k}\Omega$ seviyelerine ulaştığı belirlenmiştir. Bu bulgular, sensörün düşük konsantrasyonlarda zayıf bir yanıt verse de konsantrasyon yükseldikçe empedans değişimlerinin daha belirgin hâle geldiğini ve duyarlılığın arttığını göstermektedir.



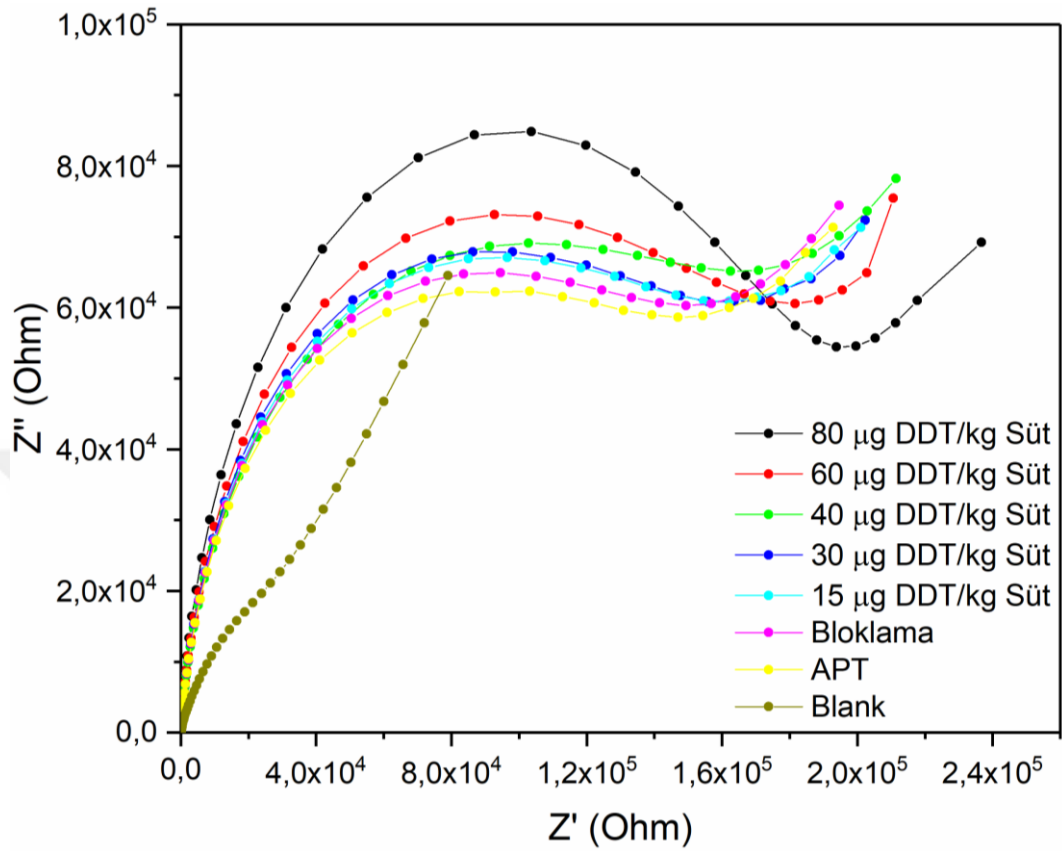
Şekil 7.18. APT-1 aptameri kullanılarak S(2-1-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.18’de S(2-1-0,5) koşuluyla hazırlanan elektrotta ait EIS Nyquist grafikleri sunulmaktadır. Spektrumlar incelendiğinde, aptamer immobilizasyonu ve bloklama aşamalarının ardından elektrot yüzeyinde yük transferini zorlaştıran bir bariyer oluştuğu ve bunun R_{ct} değerlerinde belirgin bir artışa yol açtığı görülmüştür.

15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında, bloklama aşamasına göre R_{ct} ’nin 16,7 kΩ arttığı belirlenmiştir. Ancak daha yüksek derişimlere geçildiğinde beklenen eğilim bozulmuş; 30 ve 40 µg DDT/kg süt inkübasyonlarında bloklamaya kıyasla R_{ct} ’nin sırasıyla 13,2 ve 10,1 kΩ’a düştüğü görülmüştür. Bu düşüşün, sensör yüzeyinde gerçekleşen olası konformasyon değişiklikleri, aptamer–hedef etkileşimindeki doyunluluk etkisi veya yüzeydeki moleküler düzenin geçici olarak bozulması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

DDT konsantrasyonu artırılmaya devam edildiğinde ise sensör yanıtının yeniden beklenen doğrultuda arttığı gözlenmiş ve R_{ct} değerleri 60 ve 80 µg DDT/kg süt için sırasıyla 15,5 ve 24,4 kΩ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, sensörün genel olarak yüksek konsantrasyonlarda, konsantrasyon artışına duyarlı bir davranış sergilediğini,

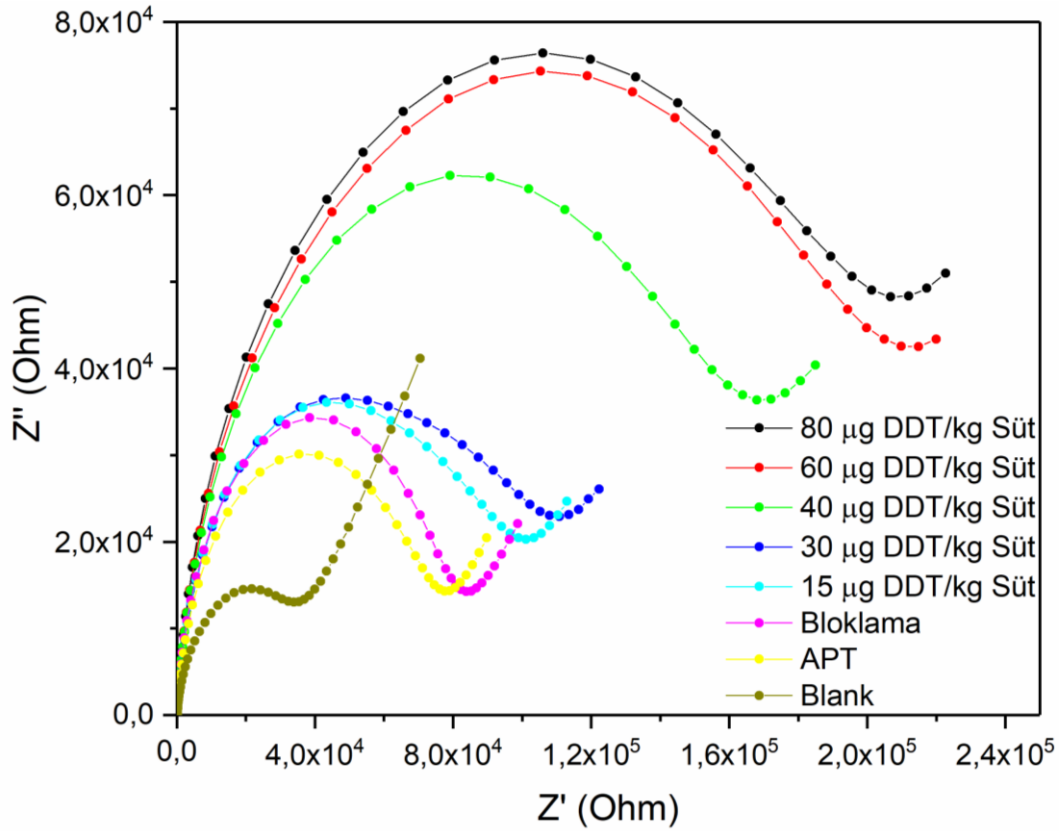
ancak orta derişim aralığında yüzey etkileşimlerinden kaynaklı geçici bir sapma oluşabileceğini göstermektedir.



Şekil 7.19. APT-1 aptameri kullanılarak S(2-1-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 4.21’de sunulan S(2-1-1) koşuluyla hazırlanmış elektrota ait EIS Nyquist grafikleri değerlendirildiğinde, 15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında bloklama aşamasına göre R_{ct} ’nin 3,7 kΩ arttığı ve daha yüksek DDT derişimlerinde bu artış eğiliminin devam ettiği görülmektedir.

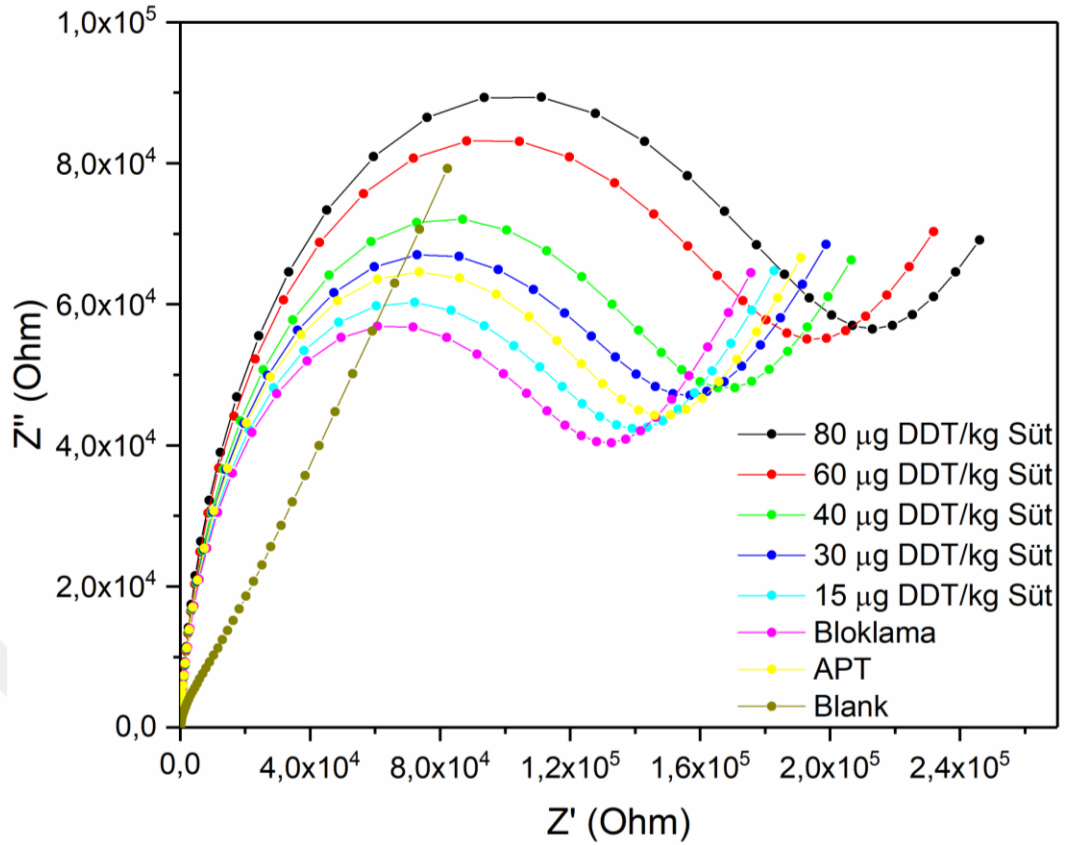
DDT konsantrasyonu yükseldikçe R_{ct} değerlerinde kademeli ve belirgin bir artış meydana gelmiş; 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için hesaplanan artış miktarları sırasıyla 4,7; 9,8; 13,8 ve 43,7 kΩ olarak bulunmuştur. Bu eğilim, sensör yüzeyindeki aptamer-DDT etkileşimlerinin konsantrasyonla birlikte güçlendiğini, bunun sonucunda elektron transferinin giderek daha fazla sınırlandığını ve özellikle yüksek analit seviyelerinde empedans yanıtının belirgin şekilde yoğunlaştığını göstermektedir.



Şekil 7.20. APT-1 aptameri kullanılarak S(2-1-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.20’de sunulan S(2-1-2) koşuluyla hazırlanmış elektrota ait EIS Nyquist grafikleri değerlendirildiğinde, 15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında bloklama aşamasına göre R_{ct} ’nin 8,2 kΩ arttığı ve daha yüksek DDT derişimlerinde bu artış eğiliminin sürdüğü görülmektedir.

DDT konsantrasyonu yükseldikçe R_{ct} değerlerinde kademeli ancak giderek daha belirgin bir artış ortaya çıkmış; 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için hesaplanan artışlar sırasıyla 10,8; 50,4; 77,6 ve 82,0 kΩ olarak belirlenmiştir. Özellikle 40 µg/kg ve üzerindeki derişimlerde gözlenen orantısız yükseliş, sensör yüzeyinde bağlanma alanlarının daha yoğun biçimde dolmasıyla birlikte elektron transferinin ani şekilde kısıtlanmasına bağlanabilir. Bu durum, yüksek analit seviyelerinde aptamerlerin konformasyon değişikliği ve yüzeydeki yük dağılımının değişmesi gibi etkilerin bir araya gelerek empedans yanıtını güçlendirmesiyle ilişkili olabilir.

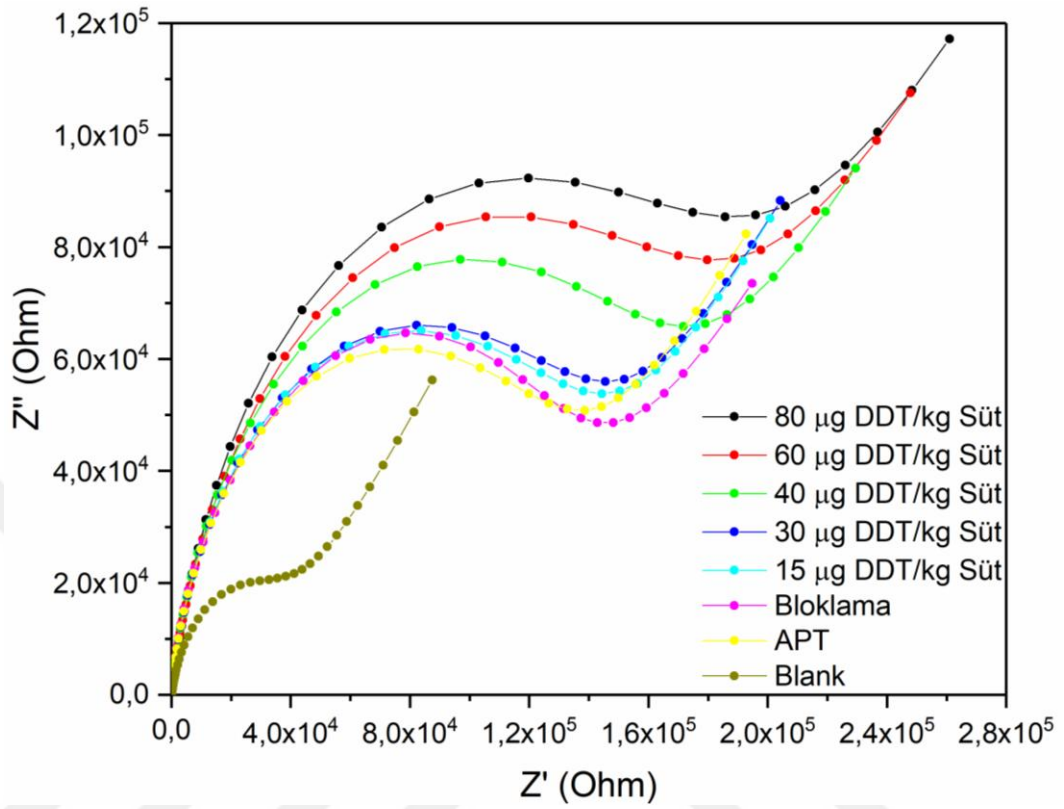


Şekil 7.21. APT-1 aptameri kullanılarak S(2-2-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.21’de S(2-2-0,5) koşuluyla hazırlanan elektrota ait EIS Nyquist grafikleri sunulmaktadır. Spektrumlar incelendiğinde, 15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında bloklama aşamasına göre R_{ct} ’nin 43,4 kΩ arttığı belirlenmiştir. Ancak DDT konsantrasyonu biraz yükseldiğinde beklenen artış eğilimi bozulmuş ve 30 µg DDT/kg süt inkübasyonunda bloklamaya kıyasla R_{ct} ’nin 20,1 kΩ’a gerilediği görülmüştür. Bu düşüş, orta derişim aralığında sensör yüzeyinde meydana gelebilecek yeniden düzenlenme, aptamer konformasyonunun kısmi gevşemesi veya yüzeydeki hedef–aptamer etkileşimlerinin geçici olarak zayıflaması gibi faktörlerden kaynaklanmış olabilir. Özellikle belirli bir derişimde yüzey doyumunun tam olarak gerçekleşmemesi, bağlanma dengesinde kısa süreli dalgalanmalara yol açarak R_{ct} ’nin beklenenden düşük ölçülmesine neden olabilir.

DDT konsantrasyonu artırılmaya devam edildiğinde ise sensör yanıtının yeniden beklenen doğrultuda yükseldiği görülmüş ve R_{ct} değerleri 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için sırasıyla 30,7; 56,0 ve 65,2 kΩ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, sensörün genel olarak yüksek konsantrasyon aralığında analit miktarındaki artışa duyarlı bir empedans

yanıtı verdiğini, ancak orta derişim seviyelerinde yüzey etkileşimlerinden kaynaklanan geçici bir sapma oluşabileceğini göstermektedir.



Şekil 7.22. APT-1 aptameri kullanılarak S(2-2-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

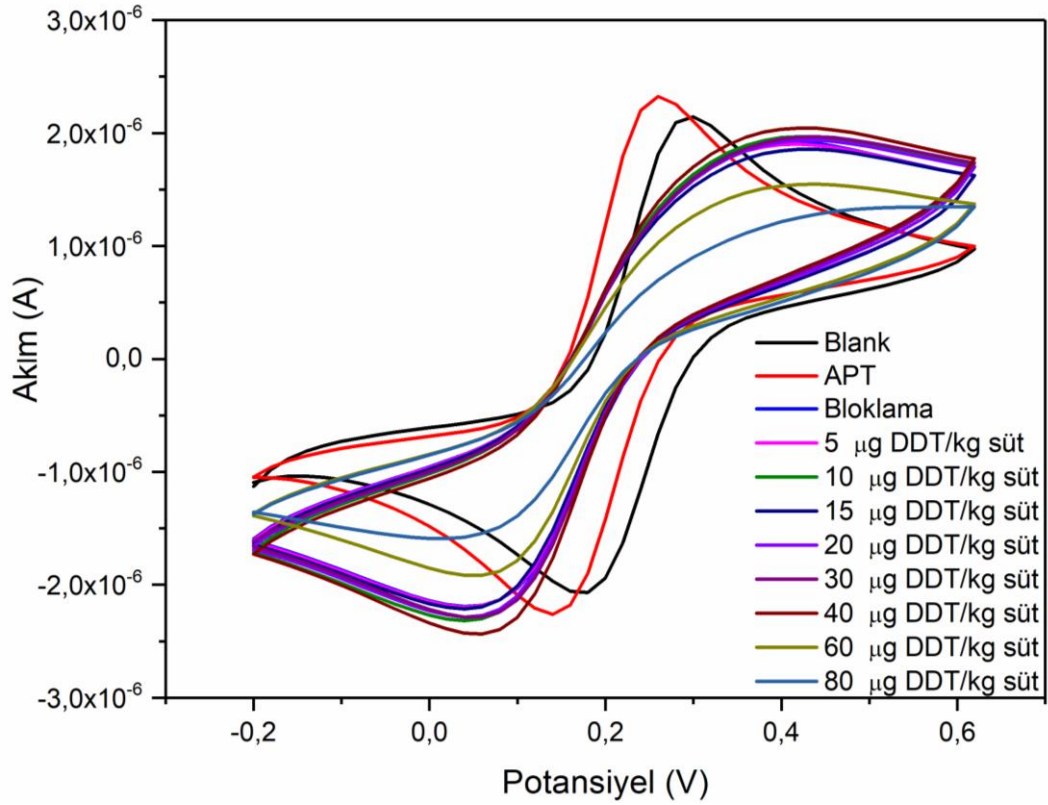
Şekil 7.22’de S(2-2-2) koşuluyla hazırlanmış elektrota ait EIS Nyquist grafikleri sunulmaktadır. Spektrumlar incelendiğinde, 15 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında blokla aşamasına kıyasla R_{ct} ’nin 3,4 kΩ artarak hafif bir yükseliş gösterdiği belirlenmiştir. Ancak DDT konsantrasyonu 30 µg DDT/kg süt seviyesine çıkarıldığında beklenen artış eğilimi bozulmuş ve bloklamaya göre R_{ct} farkının 2,5 kΩ’a gerilediği görülmüştür. Bu düşüşün, orta derişim aralığında sensör yüzeyinde meydana gelebilecek yeniden düzenlenme, aptamer konformasyonunun kısmi gevşemesi veya hedef–aptamer etkileşimlerinin geçici olarak zayıflaması gibi faktörlerden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir.

DDT konsantrasyonunun artırılmaya devam edilmesiyle sensör yanıtı yeniden beklenen doğrultuda yükselmiş ve R_{ct} değerleri 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için sırasıyla 22,6; 43,0 ve 56,9 kΩ olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, sensörün özellikle yüksek konsantrasyon aralığında analit miktarındaki artışa karşı belirgin ve konsantrasyon

bağımlı bir empedans yanıtı sergilediğini; ancak orta derişimlerde yüzey etkileşimlerinden kaynaklı geçici bir sapma ortaya çıkabileceğini göstermektedir.



EK-3. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan CV Grafikleri



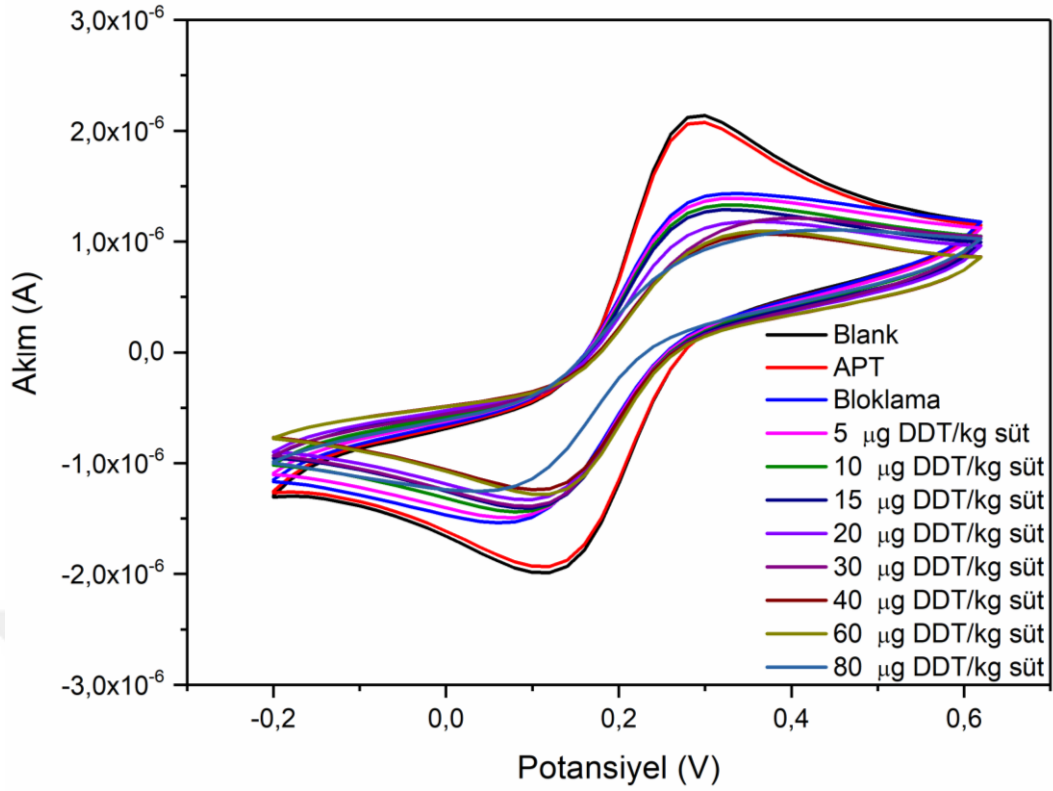
Şekil 7.23. APT-2 aptameri ile S(1-1-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.23'te, S(1-1-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,30 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,18 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 120 mV, I_{pa} 2,15 μA olarak belirlenmiştir.

Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,30 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,14 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 2,32 μA 'e çıkarken ΔE_p 120 mV değerini korumuştur. Bloklama sonrasında ise I_{pa} 'nin daha da azalmasına (1,92 μA) ve ΔE_p 'nin 380 mV'a yükselmesine neden olmuştur ki bu durum bloklama ajanının yüzeyi kaplayarak redoks prosesini daha fazla sınırlandırdığını doğrulamaktadır.

Bu basamaktan sonra 5, 10 ve 15 μg DDT/kg süt çözeltisi ile inkübasyon yapıldığında ΔE_p 'değerleri sabit kalmış, anodik pik tepe noktaları ve katodik pik tepe noktaları sırasıyla 0,42 V ve 0,04 V değerlerinde sabit kalmıştır. I_{pa} değerleri de sırasıyla 1,90 μA , 1,97 μA ve 1,86 μA şeklinde düzensiz bir gidişat izlemiştir. Devamında yapılan 20 ve 30 μg DDT/kg süt örnekleri ile inkübasyonlar sonrasında her ikisinde de ise ΔE_p değerleri 400 mV, anodik tepe potansiyelleri 0,44 V, katodik tepe potansiyelleri 0,04 V değerlerinde sabit kalmıştır. I_{pa} değerlerinin ise sırasıyla 1,94 μA ve 1,97 μA olarak arttığı belirlenmiştir.

Daha yüksek konsantrasyonlarda tepe akımı noktalarının düzensiz olarak değiştiği gözlemlenmiştir. 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt örnekleriyle yapılan ölçümlerde I_{pa} değerleri sırasıyla 2,05; 1,55 ve 1,35 μA olup tutarlı bir azalış trendi gözlenmemiştir. Buna karşın ΔE_p değerleri düzenli bir artış göstermiş; 40 μg DDT/kg süt rneği için 0,42 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,06 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler sonucu ΔE_p 360 mV, 60 μg DDT/kg süt rneği için 0,44 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,06 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler sonucu ΔE_p ise 380 mV ve 80 μg DDT/kg süt rneği için 0,60 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,10 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler sonucu ΔE_p ise 500 mV olarak ölçülmüştür.



Şekil 7.24. APT-2 aptameri ile S(1-1-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

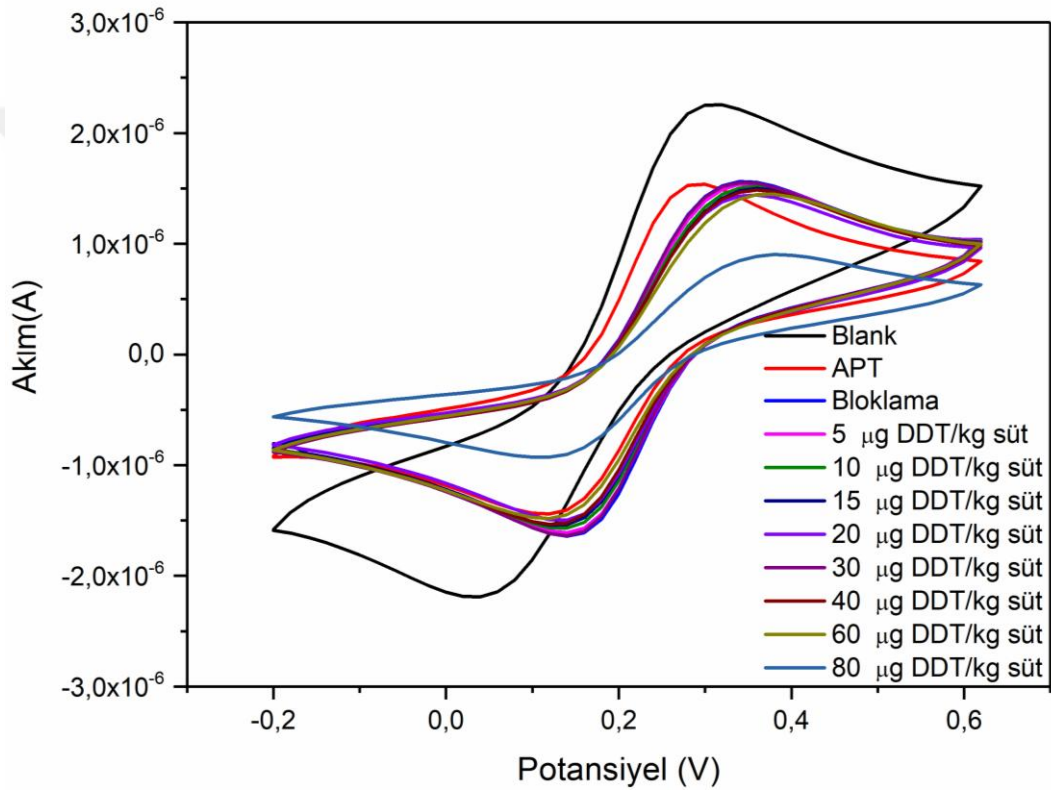
Şekil 7.24'te, S(1-1-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} 2,14 μA olarak belirlenmiştir.

Aptamer immobilizasyonunun ardından gelen anodik ve katodik pik tepe noktalarında ve ΔE_p değerinde bir fark gözlenmemişken I_{pa} değeri 2,08 μA 'e düşmüştür. Bloklama sonrasında ise I_{pa} 'nin azalarak 1,43 μA 'e düştüğü, 0,34 anodik pik akımı ve 0,06 katodik pik akımıyla hesaplanan ΔE_p 'nin 280 mV'a yükseldiği gözlenmiştir. Bloklama sonrası I_p 'nin 1,43 μA 'a azalması ve ΔE_p 'nin 280 mV'a yükselmesi, yüzeyde elektron transferini sınırlandıran bir tabaka oluştuğunu göstermektedir.

Bu basamaktan sonra 5 ve 15 μg DDT/kg süt çözeltisi ile inkübasyon yapıldığında ΔE_p değerlerinin azaldığı tespit edilmiştir. 5 μg DDT/kg süt için anodik pik tepe noktaları ve katodik pik tepe noktaları sırasıyla 0,34 ve 0,06 V değerlerine gelmiş, ΔE_p değeri 260 mV'a düşmüştür. 10 μg DDT/kg süt için ise pik potansiyelleri sırasıyla 0,34 V ve 0,08 olarak ΔE_p değeri 240 mV olarak hesaplanmıştır. 15 μg DDT/kg süt ile yapılan

ölçümlerde ise 0,32 ve 0,10 mV anodik ve katodik tepe değerlerine karşı ΔE_p 220 mV olarak hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonlardaki I_{pa} değerleri de sırasıyla 1,39; 1,33 ve 1,29 μA ile azalma eğilimi devam etmiştir.

Daha yüksek konsantrasyonlarda tepe akımı noktalarının düzensiz olarak değiştiği gözlemlenmiştir. 20, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt örnekleriyle yapılan ölçümlerde I_{pa} değerleri sırasıyla 1,18; 1,21; 1,07; 1,09 ve 1,10 μA olup tutarlı bir azalış trendi gözlenmemiştir. DDT konsantrasyonu arttıkça ΔE_p değerlerindeki dalgalanmalar devam etmiş ve sırasıyla 260, 300, 280, 260 ve 400 V olarak hesaplanmıştır.



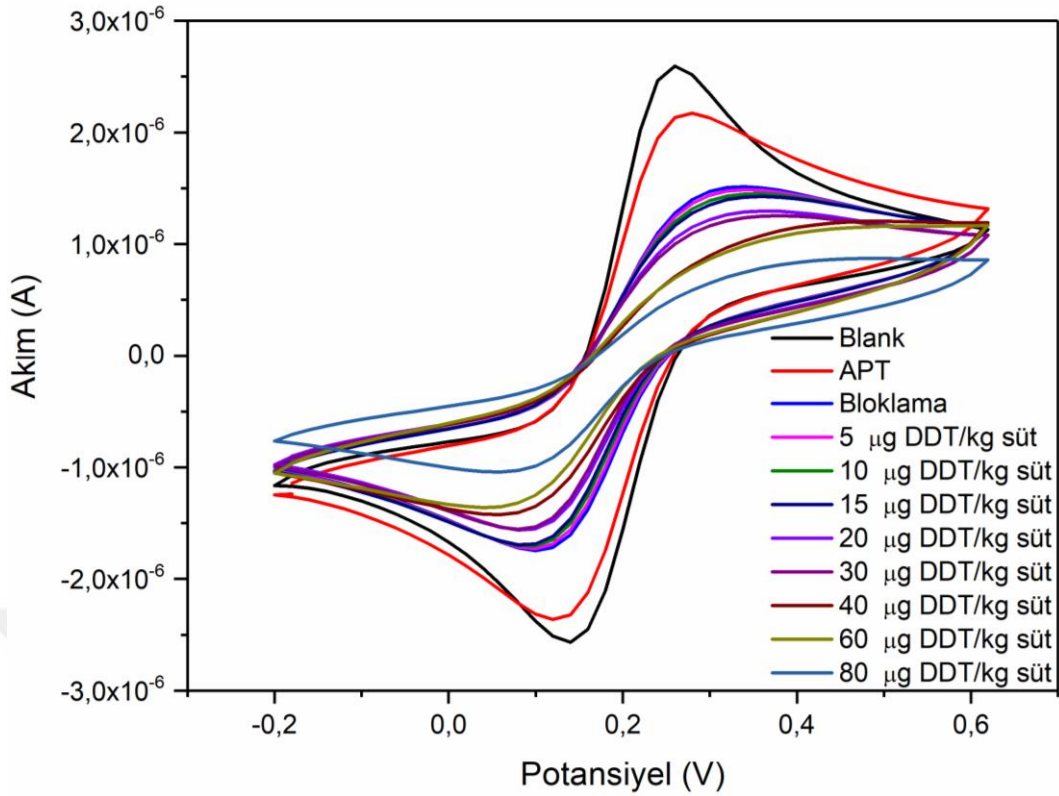
Şekil 7.25. APT-2 aptameri ile S(1-1-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.25'te, S(1-1-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,22 V'da $Fe(CN)_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,06 V'da $Fe(CN)_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 160 mV, I_{pa} 2,25 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,30 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,12 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik

pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri $1,54 \mu A$ 'e düşerken ΔE_p $180 mV$ değerini korumuştur. Bloklama sonrasında ise I_{pa} değeri artarak $1,56 \mu A$ 'e ulaşmıştır. ΔE_p 'nin anodik ve katodik pik akımlarının sırasıyla $0,34 V$ ve $0,14 V$ değerlerini aldığı ölçülmüş ve ΔE_p 'nin $200 mV$ 'a yükseldiği hesaplanmıştır.

Bloklama adımının ardından gerçekleştirilen 5 ve $10 \mu g$ DDT/kg süt inkübasyonlarında ΔE_p değerleri birbirine eşit olup $220 mV$ olarak ölçülmüştür. Her iki konsantrasyon değeri için alınan yükseltgenme ve indirgenme pikleri sırasıyla $0,36 V$ ve $0,14 V$ olarak alınmıştır. $15 \mu g$ DDT/kg süt konsantrasyonunda ΔE_p 'nin $240 mV$ 'a yükselmesi daha yüksek iki konsantrasyon olan 20 ve $30 \mu g$ DDT/kg süt inkübasyonlarında bu değerin tekrar azalarak sırasıyla 220 ve $200 mV$ 'a düşmesi tutarlı bir trende sahip olmadığını göstermiştir. Bu ölçümlerde elde edilen I_{pa} değerleri de $1,50$; $1,44$ ve $1,55 \mu A$ olarak elde edilmiş ve genel eğilimle uyumlu olmayan bir dalgalanma göstermiştir.

Daha yüksek DDT seviyelerinde (40 , 60 ve $80 \mu g$ DDT/kg süt) ΔE_p değerlerinin sırasıyla 240 , 260 ve $280 mV$ 'a yükseldiği hesaplanmıştır, anodik pik akımları sırasıyla $0,34$, $0,36$ ve $0,38 V$ değerini alırken, katodik pik akımları $0,10 V$ olarak değerini korumuştur.; I_{pa} değerlerinin ise $1,48$; $1,45$ ve $0,90 \mu A$ olacak şekilde genel olarak azaldığı kaydedilmiştir. Bu aralıkta ΔE_p 'nin nispeten daha tutarlı bir artış eğilimine girdiği, I_{pa} 'nin ise belirgin şekilde düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 7.26. APT-2 aptameri ile S(1-2-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

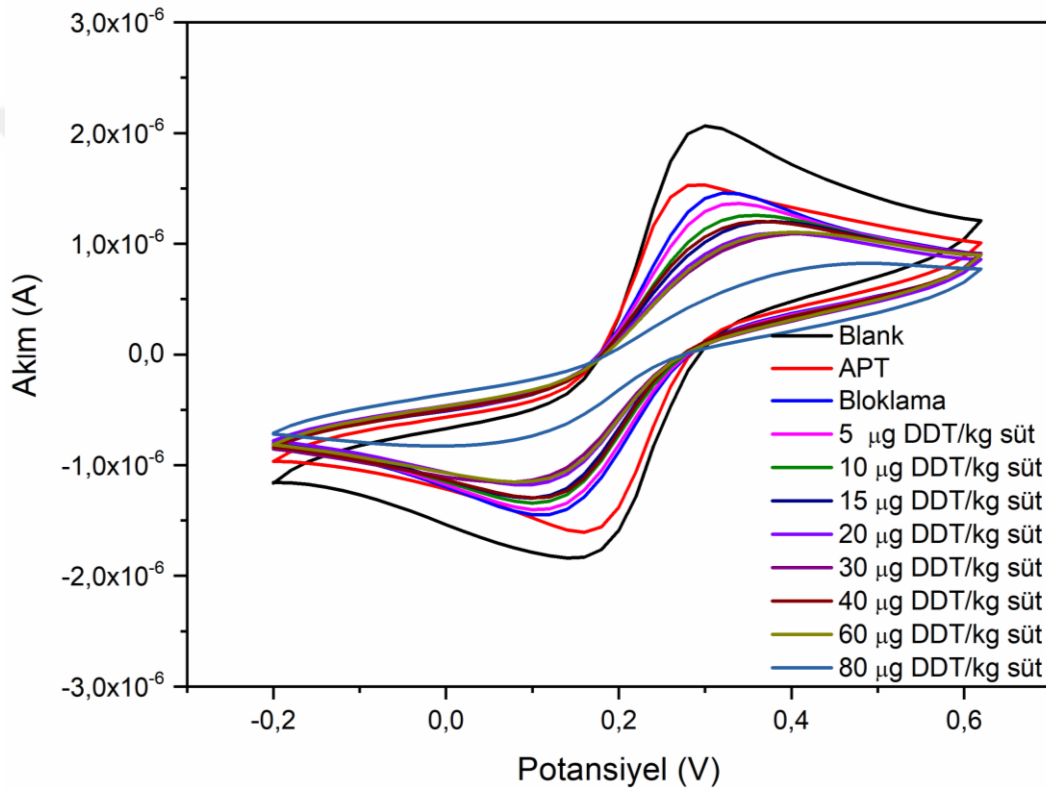
Şekil 7.26’da, S(1-2-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,26 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 120 mV, I_{pa} 2,60 μA olarak belirlenmiştir.

Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,28 V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,12 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 2,17 μA ’e düşerken, ΔE_p 160 mV değerine çıkmıştır. Bloklama sonrasında ise I_{pa} ’nin daha da azalmasıyla 1,5 μA değerini aldığı belirlenmiş, ΔE_p ’nin 340 mV’a yükseldiği hesaplanmıştır.

Bu basamaktan sonra 5 μg DDT/kg süt çözeltisi ile inkübasyon yapıldığında anodik ve katodik tepe noktaları, dolayısıyla ΔE_p değeri, bunun yanında da I_{pa} değerleri sabit kalmıştır. 10 ve 15 μg DDT/kg süt seviyelerinde ΔE_p ’nin sırasıyla 260 ve 280 mV’a yükseldiği belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlardaki anodik pik tepe noktaları 0,36 V değerlerinde sabit kalırken ve katodik pik tepe noktaları sırasıyla 0,10 ve 0,08 V

değerlerine düşmüştür. I_{pa} değerleri de sırasıyla 1,45 ve 1,43 μA şeklinde azalma izlemiştir. 20 μg DDT/kg süt örneğinde ΔE_p değeri ve pik noktalarında değişim gözlenmezken I_{pa} değeri 1,30 μA 'e düşmüştür. 30, 40 ve 60 μg DDT/kg süt örneklerinin 0,38 V, 0,52 V ve 0,62 V anodik pik değerleri; 0,80, 0,60 ve 0,4 V katodik pik değerleri ile hesaplanan ΔE_p 'leri 230, 440 ve 580 mV değerlerini almıştır.

En yüksek derişim olan 80 μg DDT/kg süt seviyesinde ise 0,50 anidik pik değeri ve 0,6 katodik pik değeri ile ΔE_p 'nin 440 mV'a gerilemesi beklenen trendden saptığını göstermektedir.



Şekil 7.27. APT-2 aptameri ile S(1-2-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

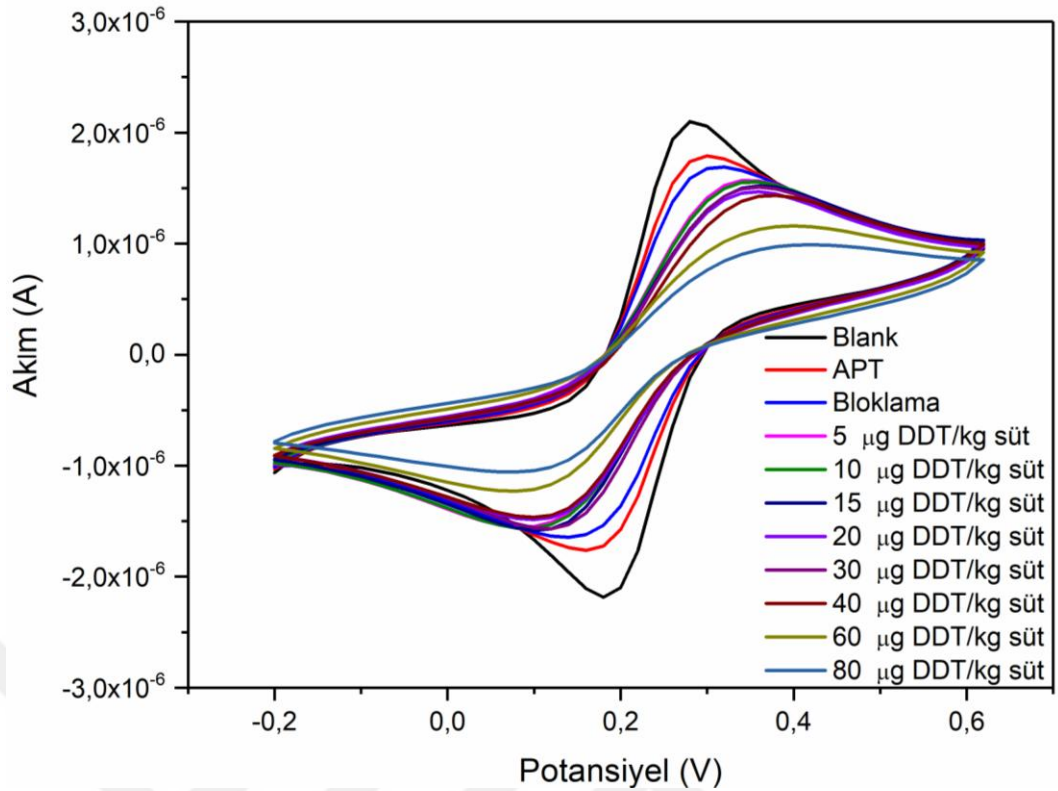
Şekil 7.27'de, S(1-2-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V'da $Fe(CN)_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V'da $Fe(CN)_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} değeri de 2,07 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonu ve bloklama işlemlerinin ardından belirlenen katodik pik değerleri sırasıyla 0,30 ve 0,32 V değerlerini

alırken, anodik pik değerleri 0,14V ve 0,10 V ölçülerek ΔE_p değerleri sırasıyla 160 mV ve 220 mV'a yükselmiş, yüzeyde elektron transferini sınırlandıran ek bir tabaka oluştuğunu göstermiştir. Aynı aşamalarda kaydedilen I_{pa} değerleri ise 1,53 ve 1,61 μA olup, akım açısından beklenen düzenli azalma trendinin sağlanamadığı görülmektedir.

Bloklama adımını takiben gerçekleştirilen 5 μg DDT/kg süt inkübasyonu, anodik ve katodik pik değerlerinin sırasıyla 0,36 V ve 0,10 V değerlerine gelmesine, ΔE_p 'nin de 240 mV olarak hesaplanmasına neden olmuştur. Bu sırada ve I_{pa} 'nin 1,36 μA 'a düşmesini, yüzeyde elektron transfer bariyerinin hedef bağlanması ile daha da güçlendiğini göstermektedir. Bunu izleyen 10, 15, 20 ve 30 μg DDT/kg süt konsantrasyonlarında ΔE_p değerlerinin sırasıyla 260, 280, 300 ve 360 mV'a ulaşması, DDT miktarı arttıkça yüzeyde daha belirgin bir engelleyici tabaka oluştuğunu desteklemektedir. Bu konsantrasyonlardaki anodik pik tepe noktaları sırasıyla 0,36 V, 0,38, 0,38 ve 0,42 V olurken, katodik pik tepe noktaları 0,10, 0,10, 0,08 ve 0,06 V olarak ölçülmüştür.

Bununla birlikte, 40 μg DDT/kg süt inkübasyonunda ΔE_p 'nin 260 mV'a düşmesi, artış eğiliminin bu noktada bozulduğunu ortaya koymaktadır. Aynı basamakta I_{pa} değeri de artarak 1,20 μA 'a yükselmiştir.

En yüksek konsantrasyonlar olan 60 ve 80 μg DDT/kg süt seviyelerinde ΔE_p 'nin sırasıyla 320 ve 460 mV'a yükseldiği belirlenmiştir. Bu aşamalarda I_{pa} değerlerinin 1,10 ve 0,80 μA seviyelerine düşmesi, elektron transferindeki kısıtlanmanın yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin hale geldiğini doğrulamaktadır.



Şekil 7.28. APT-2 aptameri ile S(1-2-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

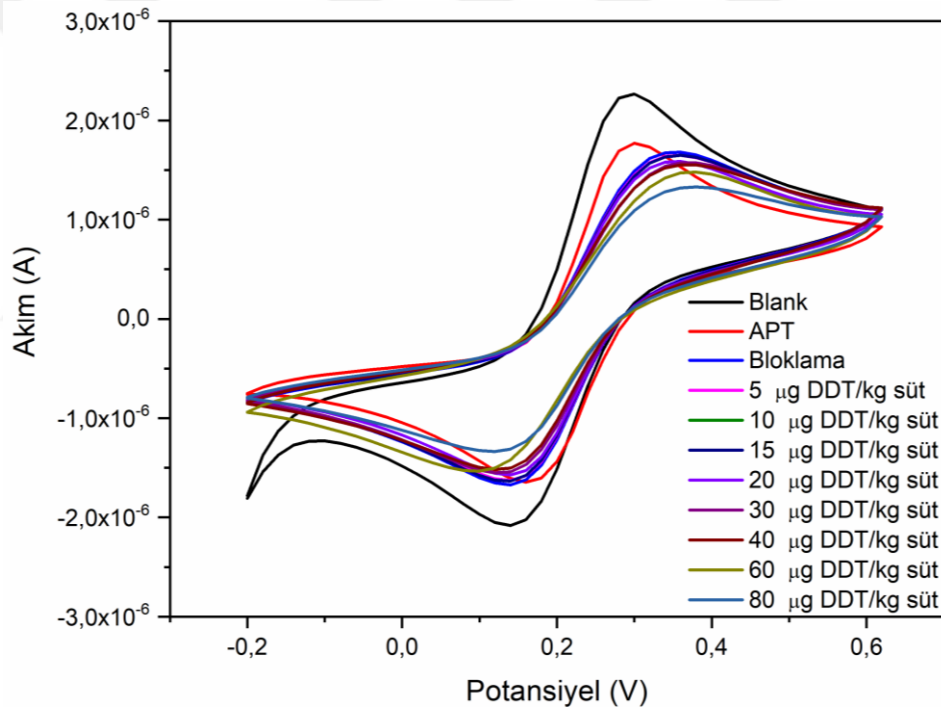
Şekil 7.28’de, S(1-2-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,18 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 100 mV, I_{pa} 2,10 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,30 V’ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,16 V’ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 1,79 μA ’e düşerken ΔE_p 140 mV değerine çıkmıştır. Bloklama sonrasında ise I_{pa} değeri artarak 1,69 μA ’e ulaşmıştır. ΔE_p ’nin anodik ve katodik pik tepe noktaları sırasıyla 0,32 V ve 0,14 V değerlerini aldığı ölçülmüş ve ΔE_p ’nin 180 mV’a yükseldiği hesaplanmıştır.

Bloklama adımının ardından gerçekleştirilen 5 μg DDT/kg süt inkübasyonlarında alınan yükseltgenme ve indirgenme pikleri sırasıyla 0,34 V ve 0,08 V olarak alınmış, ΔE_p değeri 240 mV olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değeri ise 1,57 μA ’e gerilemiştir.

Daha yüksek DDT seviyelerinde (10, 15 ve 20 μg DDT/kg süt) ölçümlerinde anodik pik tepe noktaları 0,36 V değerini alırken, katodik pik akımları 0,10 V olarak

değerini korumuştur. Bu konsantrasyonlarda I_{pa} değerlerinin 1,56; 1,52 ve 1,47 μA şeklinde düzensiz seyretmesi ise elektrot yüzeyindeki bağlanma dağılımının homojen olmamasının veya sensörün bu aralıktaki duyarlılığının düşük olmasının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

DDT derişiminin 40, 60 ve 80 μg DDT/kg seviyelerine yükseltilmesiyle anodik pik değerleri sırasıyla 0,38, 0,40 ve 0,42 V; katodik pik değerleri ise sırasıyla 0,10, 0,08 ve 0,08 olarak ölçülmüştür. Hesaplanan ΔE_p değerlerinin ise sırasıyla 280, 320 ve 440 mV'a ulaşması, yüzeydeki elektron transfer bariyerinin yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin hale geldiğini göstermektedir. Bu aşamalarda I_{pa} 'nin 1,44; 1,16 ve 0,99 μA 'a düşmesi ise artan DDT bağlanmasının akım üzerindeki engelleyici etkisinin giderek güçlendiğini doğrulamaktadır.



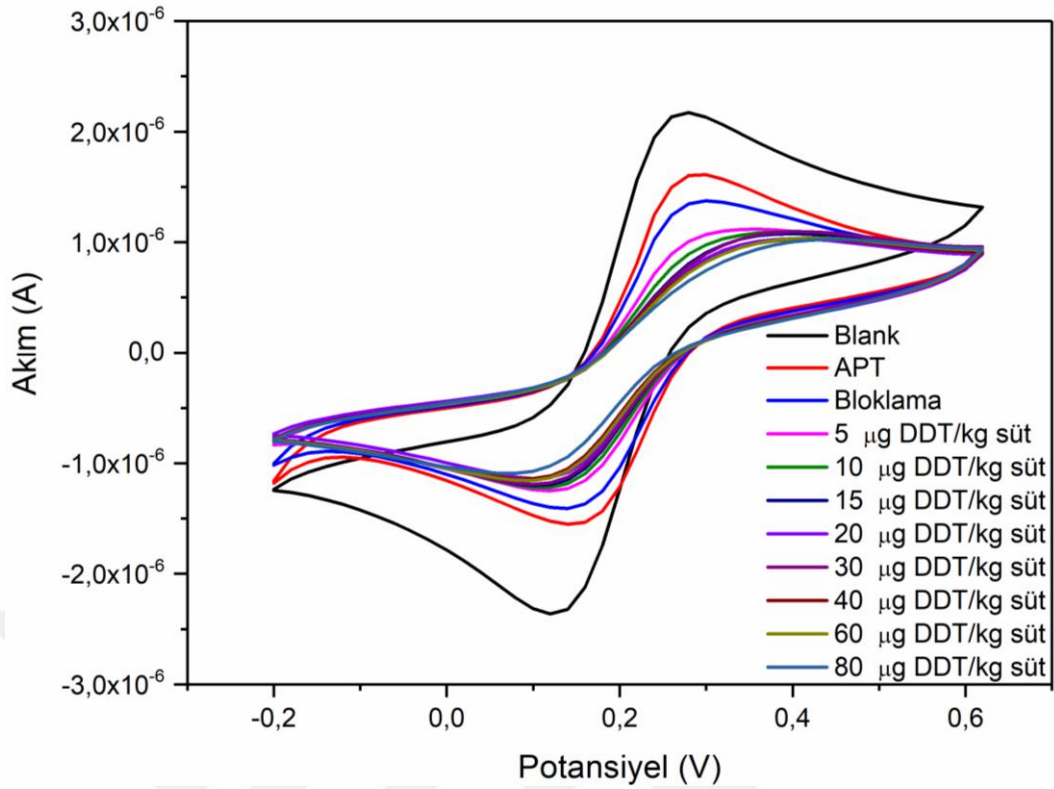
Şekil 7.29. APT-2 aptameri ile S(2-1-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

S(2-1-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları Şekil 7.29'da gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V'da $Fe(CN)_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V'da $Fe(CN)_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} 2,26 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonu ve bloklama basamaklarının

ardından anodik pik tepe değerleri 0,32 ve 0,36 V; katodik pik tepe değerleri ise 0,16 ve 0,14 V olarak ölçülmüş, ΔE_p değerlerinin 160 ve 220 mV'a yükselmesi, elektrot yüzeyinde elektron transferini kısıtlayan yeni bir tabakanın başarıyla oluştuğunu ortaya koymaktadır. Aynı aşamalarda I_{pa} değerlerinin 1,77 ve 1,68 μA olarak ölçülmesi ise akımın beklenen şekilde azaldığını ve yüzey modifikasyonunun etkin bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Bloklama adımının ardından gerçekleştirilen 5 ve 40 μg DDT/kg süt inkübasyonlarında alınan yükseltgenme ve indirgenme pikleri sırasıyla 0,36 V ve 0,12 V olarak değerini korumuş, ΔE_p değeri de tüm konsantrasyonlarda 240 mV olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değerlerinin 5–15 μg DDT/kg süt için 1,65 μA değerinde sabit kalması; 20, 30 ve 40 μg DDT/kg seviyelerinde ise 1,59; 1,57 ve 1,55 μA değerlerini vermesi, sistemin düşük ve orta konsantrasyon aralığında düzenli bir elektroanalitik yanıt üretmediğini göstermektedir.

DDT konsantrasyonunun daha da artırıldığı 60 ve 80 μg DDT/kg süt seviyelerinde de ΔE_p 'de beklenen artışın gerçekleşmemesi (sırasıyla 260 ve 240 mV), sensörün yüksek konsantrasyonlarda bile hedef bağlanmasına net bir voltametrik yanıt oluşturamadığını göstermektedir. Yüzeyde bir bariyer oluşumu beklense de ΔE_p 'nin tutarlı bir yükseliş göstermemesi, bağlanma veriminin sınırlı olduğunu düşündürmektedir. Bu örneklerden elde edilen I_{pa} değerleri ise sırasıyla 1,48 ve 1,33 μA değerlerini almıştır.



Şekil 7.30. APT-2 aptameri ile S(2-1-1) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

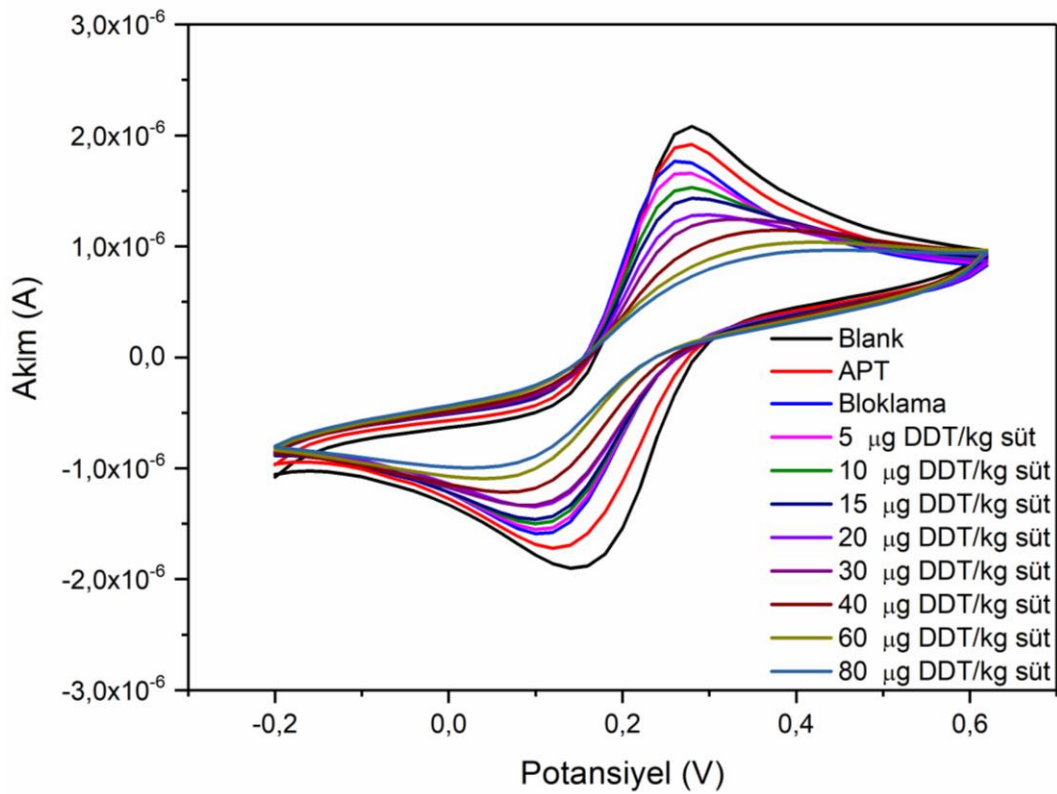
Şekil 7.30’da, S(2-1-1) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ’ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,12 V’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ’ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 160 mV olarak hesaplanmış, I_{pa} 2,17 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonu ve bloklama işlemlerinin ardından anodik ve katodik pik tepe değerlerinin sırasıyla 0,30 V ve 0,14 V değerlerinde sabit kalması, ΔE_p değerini değiştirmemiştir ve yüzeyde elektron transferini sınırlayan tabakanın oluşmasına rağmen bu parametrenin hassas bir yanıt üretmediğini düşündürmektedir. Aynı aşamalarda kaydedilen I_{pa} değerleri 1,61 ve 1,37 μA olarak ölçülmesi ise akımın beklenen şekilde azalması nedeniyle yüzey modifikasyonunun gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

Bloklama adımını takiben uygulanan 5, 10 ve 15 μg DDT/kg süt inkübasyonlarında elde edilen anodik pik tepe değerleri sırasıyla 0,36 V, 0,38 V ve 0,40 V olarak ölçülürken katodik pik tepe değerleri 0,12, 0,12 ve 0,10 V olarak belirlenmiştir. Bu elde edilen değerlerle ΔE_p ’nin sırasıyla 240, 260 ve 300 mV olarak artış göstermesi;

aynı konsantrasyonlarda I_{pa} 'nin 1,12; 1,09 ve 1,08 μA değerlerine düşmesi, sensörün düşük ve derişim aralığında nispeten düzenli bir elektroanalitik yanıt verdiğini göstermektedir.

Bununla birlikte, DDT seviyelerinin 20 ve 30 μg DDT/kg süt'e çıkarılmasıyla anodik ve katodik pik değerlerinin ve dolayısı ΔE_p değerinin sabit kalması, sensörün orta düzey konsantrasyonlarda hedef bağlanmasına tutarlı bir voltametrik yanıt oluşturamadığını göstermektedir. Bu aşamalarda I_{pa} 'nin sırasıyla 1,30 ve 1,10 μA olarak artış eğiliminde olması da akım davranışında beklenen azalma trendinin bozulduğuna işaret etmektedir.

Daha yüksek derişimlerde (40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt) ölçülen ΔE_p değerlerinin sırasıyla 340, 320 ve 360 mV olarak düzensiz biçimde değişmesi; I_{pa} 'nin ise 1,03; 1,04 ve 1,03 μA gibi birbirine çok yakın ve düzen içermeyen değerler vermesi, sensör yüzeyinin yüksek konsantrasyonlarda stabil bir yanıt üretemediğini göstermektedir.



Şekil 7.31. APT-2 aptameri ile S(2-1-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.31'de, S(2-1-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28V'da $Fe(CN)_6^{4-}$

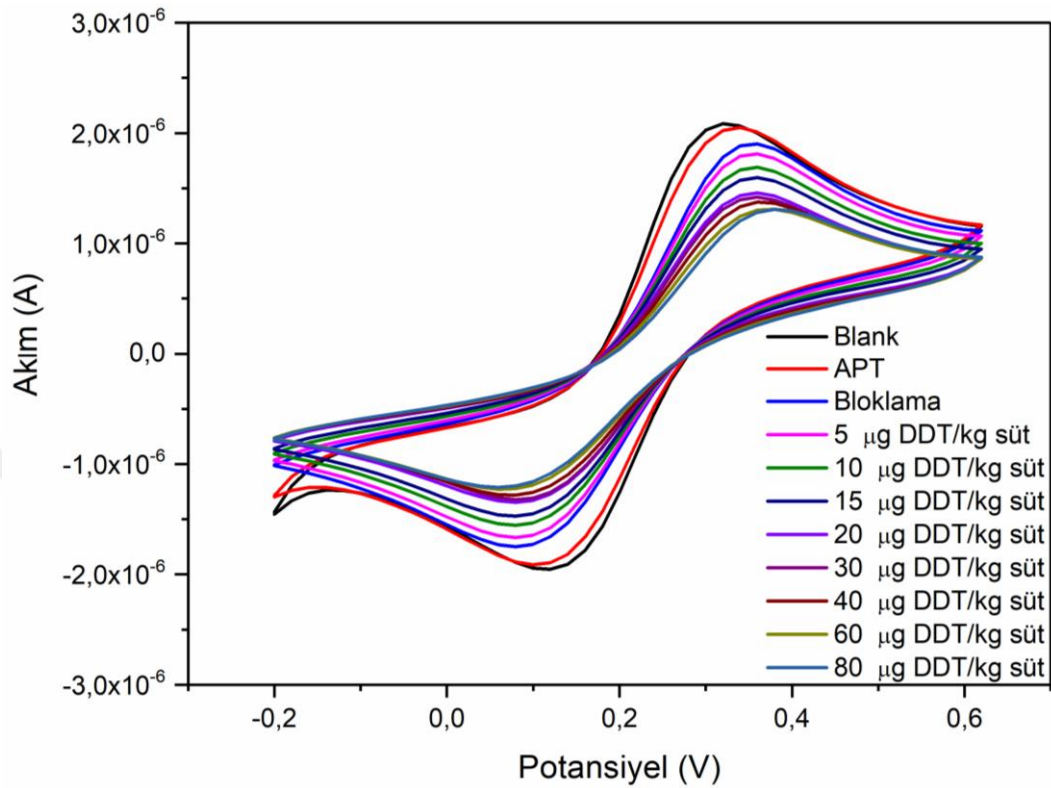
'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,14 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} 2,08 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonunun ardından 0,28 V'ta yükseltgenmeye karşılık gelen anodik ve 0,12 V'ta indirgenmeye karşılık gelen katodik pikler gözlenmiştir. I_{pa} değeri 1,92 μA 'e düşerken ΔE_p 160 mV değerine çıkmıştır. Bloklama sonrasında ise I_{pa} değeri azalarak 1,77 μA 'e ulaşmıştır. ΔE_p 'nin anodik ve katodik pik tepe noktaları sırasıyla 0,26 ve 0,10 V değerlerini alarak ve ΔE_p 'nin 160 mV değerinde sabit kaldığı belirlenmiştir.

Bloklama adımını takiben gerçekleştirilen 5, 10 ve 15 μg DDT/kg süt inkübasyonlarında anodik pik değerlerinin 0,28 V; katodik pik değerlerinin ise 0,10 V olarak sabit kalması, ΔE_p 'nin 180 mV değerini almasına neden olmuştur. ΔE_p 'nin sabit kalması, düşük DDT derişimlerinde aptamer bağlanma bölgelerinin henüz doygunluğa ulaşmamış olması nedeniyle bağlanan DDT miktarının yüzey elektron transfer direncinde ölçülebilir bir değişim yaratmamasından kaynaklanabilir. Aynı konsantrasyonlarda I_{pa} 'nin 1,66; 1,53 ve 1,43 μA değerlerine düştüğü gözlenmiştir. I_{pa} 'nin düzenli bir şekilde azalması, yüzeye bağlanan sınırlı miktardaki DDT'nin dahi elektron transfer hızını bir miktar kısıtlayarak akım üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

DDT derişiminin 40, 60 ve 80 μg DDT/kg seviyelerine yükseltilmesiyle anodik pik değerleri sırasıyla 0,38 V, 0,40 V ve 0,42 V; katodik pik değerleri ise sırasıyla 0,10 V, 0,08 V ve 0,08 V olarak ölçülmüştür. Hesaplanan ΔE_p değerlerinin ise sırasıyla 280, 320 ve 440 mV'a ulaşması, yüzeydeki elektron transfer bariyerinin yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin hale geldiğini göstermektedir. Bu aşamalarda I_{pa} 'nin 1,44; 1,16 ve 0,99 μA 'a düşmesi ise artan DDT bağlanmasının akım üzerindeki engelleyici etkisinin giderek güçlendiğini doğrulamaktadır.

DDT konsantrasyonu artırılarak gerçekleştirilen 20, 30, 40, 60 ve 80 μg DDT/kg süt konsantrasyonlarında anodik pik tepe değerleri sırasıyla 0,30, 0,34, 0,38, 0,42 ve 0,44 V değerini alırken, katodik pik tepe değerleri ise sırasıyla 0,10, 0,10, 0,06, 0,04 ve 0,02 V olarak ölçülmüştür. Bu değerlerden hesaplanan ΔE_p değerleri de sırasıyla 200, 240, 320, 380 ve 420 mV olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, özellikle orta ve yüksek konsantrasyonlarda aptamer-DDT etkileşiminin elektron transfer bariyerini güçlendirdiğini ve sensörün hedef bağlanmasına voltametrik olarak yanıt verebildiğini ortaya koymaktadır. Bu aşamalarda I_{pa} değerlerinin de sırasıyla 1,28; 1,24; 1,15; 1,04 ve 0,97 μA olarak düzenli bir azalma göstermesi, yüzeyde artan DDT bağlanmasının

elektron transferini aşamalı olarak kısıtladığını ve sensörün akım yönünden beklenen tepkimeyi verdiğini göstermektedir.

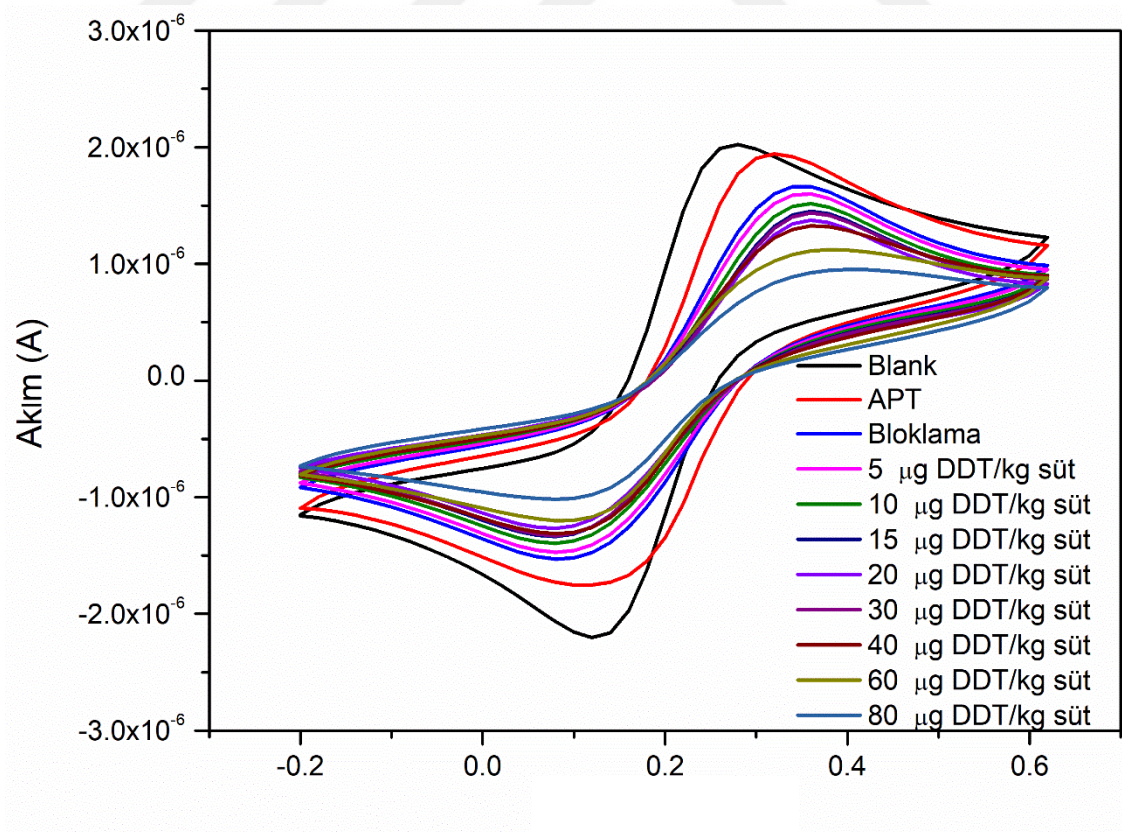


Şekil 7.32. APT-2 aptameri ile S(2-2-0,5) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

S(2-2-0,5) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir (Şekil 7.32). Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,26 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,12 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 140 mV, I_{pa} 2,08 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonu ve bloklama basamaklarının ardından anodik pik tepe değerleri 0,28 ve 0,32 V; katodik pik tepe değerleri ise 0,18 ve 0,16 V olarak ölçülmüş, ΔE_p değerlerinin 200 ve 260 mV'a yükselmesi, elektrot yüzeyinde elektron transferini kısıtlayan yeni bir tabakanın başarıyla oluştuğunu ortaya koymaktadır. Aynı aşamalarda I_{pa} değerlerinin 2,05 ve 1,90 μA olarak ölçülmesi ise akımın beklenen şekilde azaldığını ve yüzey modifikasyonunun etkin bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Bloklama adımının ardından gerçekleştirilen 5 ve 40 μg DDT/kg süt inkübasyonlarında alınan yükseltgenme ve indirgenme pikleri sırasıyla 0,36 V ve 0,08 V olarak değerini korumuş, ΔE_p değeri de tüm konsantrasyonlarda 280 mV olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değerlerinin 1,81; 1,69; 1,60; 1,46; 1,42 ve 1,37 μA değerlerini vermesi, yüzeye alınan DDT miktarının giderek artarak elektron transferini kısmen yavaşlattığını göstermektedir. Her ne kadar ΔE_p bu aralıkta belirgin bir değişim göstermese de, akım şiddetindeki düşüş, yüzeydeki bağlanma olaylarının elektrot kinetiğini etkilediğini göstermektedir.

DDT derişiminin 60 ve 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ süt seviyelerine yükseltilmesi sonrasında da anodik ve katodik pik tepe değerlerinin sırasıyla 0,38 ve 0,06 V seviyesinde sabitlenmesi ile her ikisi için ΔE_p değeri 320 mV olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde I_{pa} 'da 1,31 μA değerinde kalmış ve sistemin bu noktada bir tür plato davranışı sergilediğini göstermektedir. Bu noktada elektrot yüzeyinin büyük ölçüde doygunluğa ulaştığı, yani eklenen DDT moleküllerinin artık yüzey kinetiğinde ek bir değişiklik yaratmadığı anlaşılmaktadır. Aptamer yüzeyinde bağlanma kapasitesinin büyük oranda kullanıldığını ve voltametrik yanıtın maksimum sınıra eriştiğini düşündürmektedir.



Şekil 7.33. APT-2 aptameri ile S(2-2-2) koşulunda kaplanan elektrotlar ile farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramlar

Şekil 7.33'te, S(2-2-2) koşulunda hazırlanan elektrotlar ve farklı DDT konsantrasyonlarında elde edilen dönüşümlü voltammogramları gösterilmektedir. Blank ölçümünde elde edilen dönüşümlü voltammogram incelendiğinde 0,28 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'ün yükseltgenmesine karşılık gelen anodik ve 0,12 V'da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'ün indirgenmesine karşılık gelen katodik pikler gözlenmektedir. Bu voltammogramda ΔE_p 160 mV, I_{pa} 2,02 μA olarak belirlenmiştir. Aptamer immobilizasyonu ve bloklama basamaklarının ardından anodik pik tepe değerleri 0,32 ve 0,36 V; katodik pik tepe değerleri ise 0,12 ve 0,08 V olarak ölçülmüştür. ΔE_p değerlerinin 200 ve 280 mV'a yükselmesi, elektrot yüzeyinde elektron transferini kısıtlayan yeni bir tabakanın başarıyla oluştuğunu ortaya koymaktadır. Aynı aşamalarda I_{pa} değerlerinin 1,94 ve 1,66 μA olarak ölçülmesi ise akımın beklenen şekilde azaldığını ve yüzey modifikasyonunun etkin bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

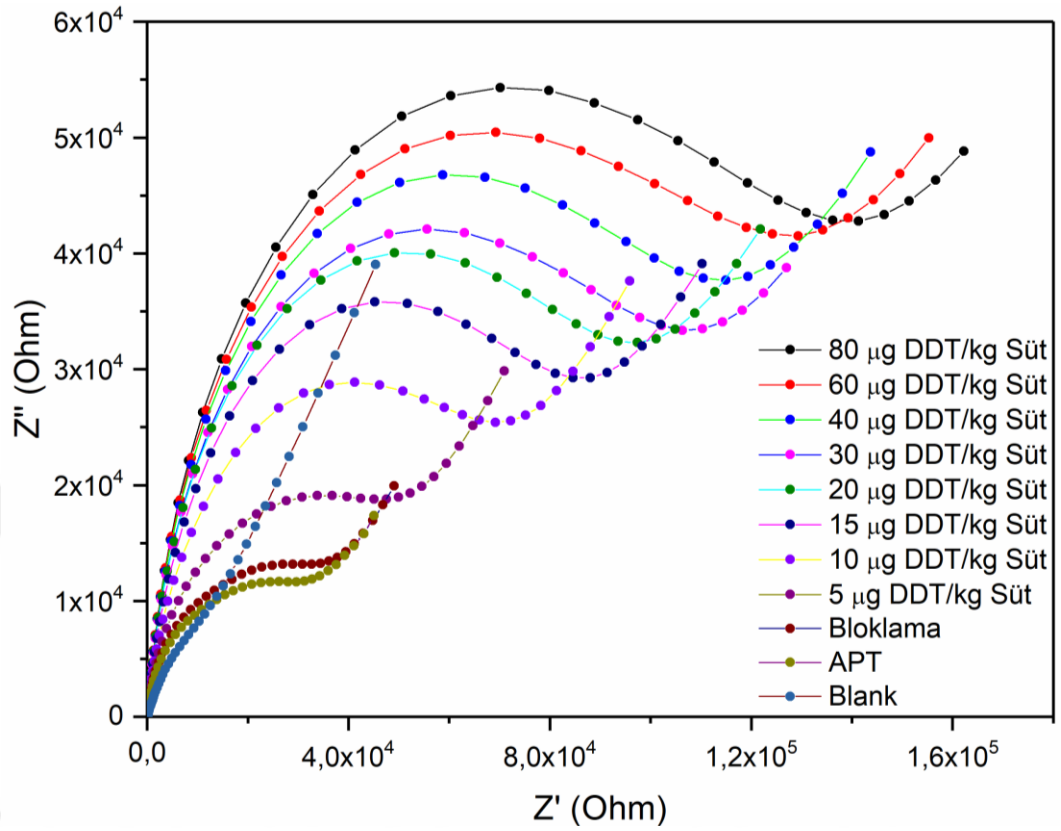
Bloklama adımının ardından gerçekleştirilen 5 ve 40 μg DDT/kg süt inkübasyonlarında alınan yükseltgenme ve indirgenme pikleri sırasıyla 0,36 V ve 0,08 V olarak değerini korumuş, ΔE_p değeri de tüm konsantrasyonlarda 280 mV olarak hesaplanmıştır. I_{pa} değerlerinin 1,60; 1,52; 1,45; 1,37; 1,44 ve 1,33 μA değerlerini vermesi, yüzeye alınan DDT miktarının giderek artarak elektron transferini kısmen yavaşlattığını göstermektedir. Her ne kadar ΔE_p bu aralıkta belirgin bir değişim göstermese de, akım şiddetindeki düşüş, yüzeydeki bağlanma olaylarının elektrot kinetiğini etkilediğini göstermektedir.

DDT derişiminin 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ süt örneğinde anodik ve katodik pik tepe değerlerinin sırasıyla 0,38 ve 0,08 V seviyesinde ; 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ süt örneğinde anodik ve katodik pik tepe değerlerinin sırasıyla 0,40 ve 0,08 V mV seviyesinde ölçülerek ΔE_p değerleri sırasıyla 300 ve 320 mV olarak hesaplanmıştır. Aynı konsantrasyonlarda I_{pa} 'da 1,12 ve 0,95 μA değerini almıştır.

Bu aşamalarda I_{pa} değerlerinin 1,12 μA ve 0,95 μA 'a inmesi ise artan DDT bağlanmasının elektron transferini daha da zorlaştırdığına işaret etmektedir. I_{pa} 'daki bu azalma, yüksek konsantrasyonlarda sensörün beklenen engelleyici yanıtı verebildiğini göstermektedir.

EK 4. APT-1 Aptameri Kullanılarak Hazırlanan Elektrotlardan Alınan EIS

Nyquist Grafikleri



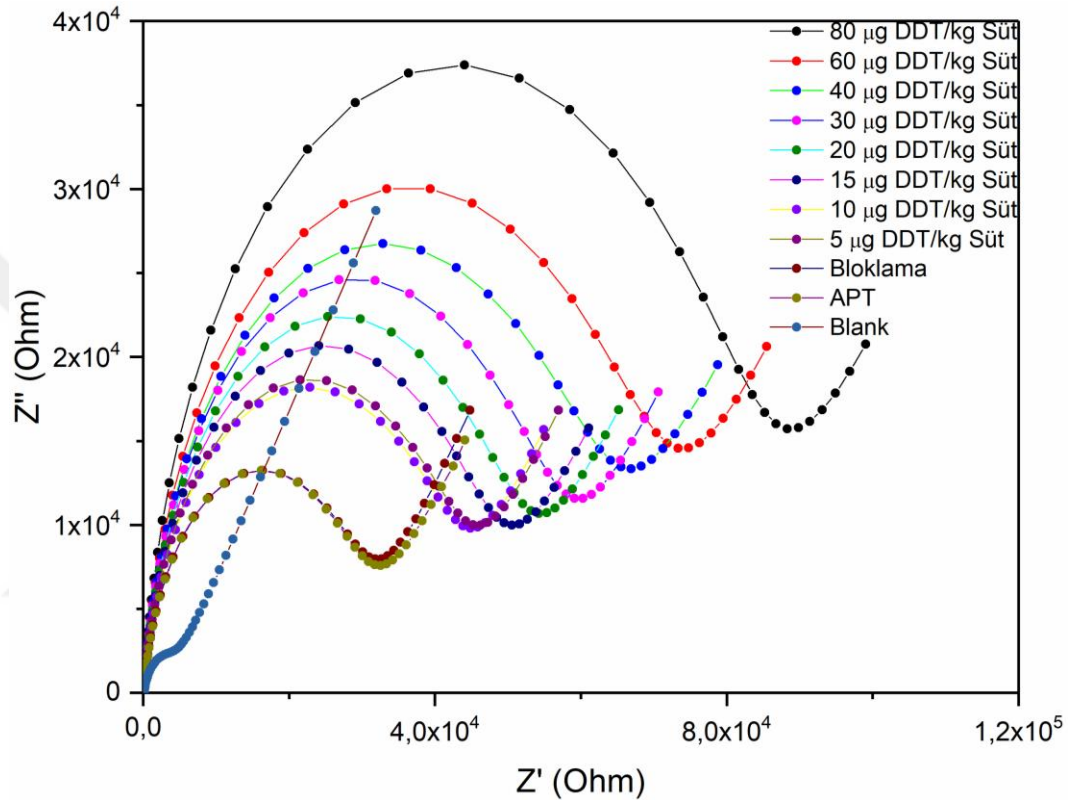
Şekil 7.34. APT-2 aptameri kullanılarak S(1-1-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.34'te sunulan S(1-1-0,5) koşuluyla hazırlanmış elektrota ait EIS Nyquist eğrileri incelendiğinde, blokla işleminden sonra uygulanan 5 µg DDT/kg süt inkübasyonunda R_{ct} 'nin yaklaşık 3,7 kΩ arttığı ve DDT derişimi yükseldikçe bu artış eğiliminin düzenli bir şekilde sürdüğü görülmektedir. DDT konsantrasyonundaki her artışın, eğrilerin sağa doğru genişlemesiyle uyumlu şekilde R_{ct} 'yi yükselttiği ve bu durumun elektron transfer sürecinin giderek daha fazla kısıtlandığını gösterdiği anlaşılmaktadır.

Artan derişimler için bloklamaya göre hesaplanan R_{ct} farkları 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için sırasıyla 18,0; 30,7; 38,9; 44,1; 51,1; 62,8 ve 71,0 kΩ olarak belirlenmiştir. Bu düzenli artış, sensör yüzeyinde aptamer-DDT etkileşiminin güçlü bir şekilde gerçekleştiğini ve hedef molekül bağlandıkça elektron transfer engelinin büyüdüğünü göstermektedir.

S(1-1-0,5) koşulu altında elde edilen bu belirgin R_{ct} artışlarının, aptamer tabakasının yüzeyde uygun konformasyonda immobilize olması ve DDT moleküllerinin

bu tanıma bölgelerine etkili şekilde bağlanabilmesiyle ilişkili olduğu şeklinde değerlendirilmektedir. Bağlanma sonrasında oluşan aptamer-DDT kompleksleri elektrot yüzeyinde ek bir fiziksel ve dielektrik bariyer oluşturarak yük transferini sınırlandırmakta ve bu durum Nyquist eğrilerinde gözlenen empedans artışını açıklamaktadır. Bu sonuçlar, S(1-1-0,5) modifikasyon koşulunun DDT tespiti için duyarlı olabileceğini göstermektedir.

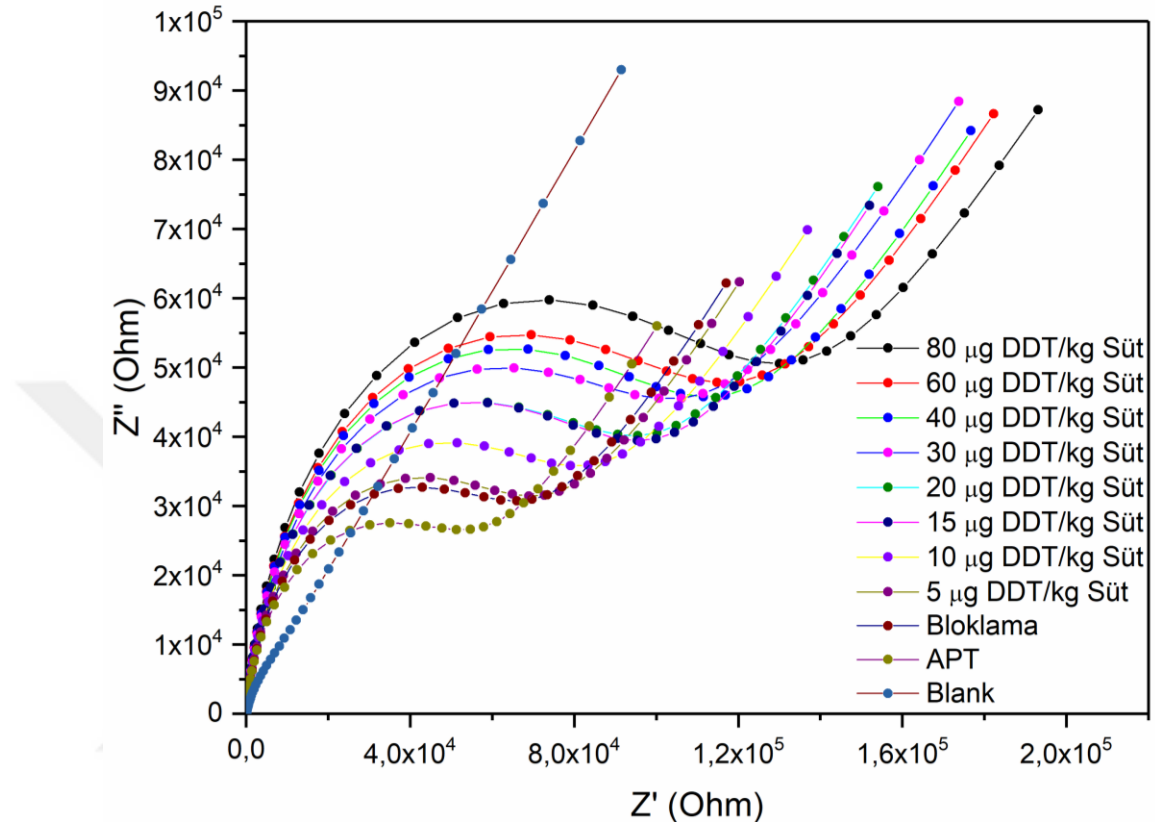


Şekil 7.35. APT-2 aptameri kullanılarak S(1-1-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.35'te verilen S(1-1-1) koşuluyla modifiye edilmiş elektrotlara ait Nyquist diyagramları incelendiğinde, bloklama adımının ardından uygulanan 5 µg DDT/kg süt inkübasyonunun R_{ct} değerini yaklaşık 17,3 kΩ artırdığı görülmektedir. DDT derişimi 10 µg DDT /kg süt seviyesine çıkarıldığında R_{ct} 19,3 kΩ olarak ölçülmüş, 15 µg DDT /kg süt için ise 19,2 kΩ ile çok sınırlı bir azalma kaydedilmiştir. Bu küçük sapmanın ardından, daha yüksek konsantrasyonlarda tüm ölçümlerde R_{ct} 'nin yeniden artış eğilimine girdiği ve derişimle uyumlu şekilde yükseldiği gözlenmiştir.

Bloklama değerine kıyasla hesaplanan R_{ct} farkları incelendiğinde; 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt derişimleri için sırasıyla 23,8; 25,7; 29,6; 34,0 ve 53,9 kΩ'luk

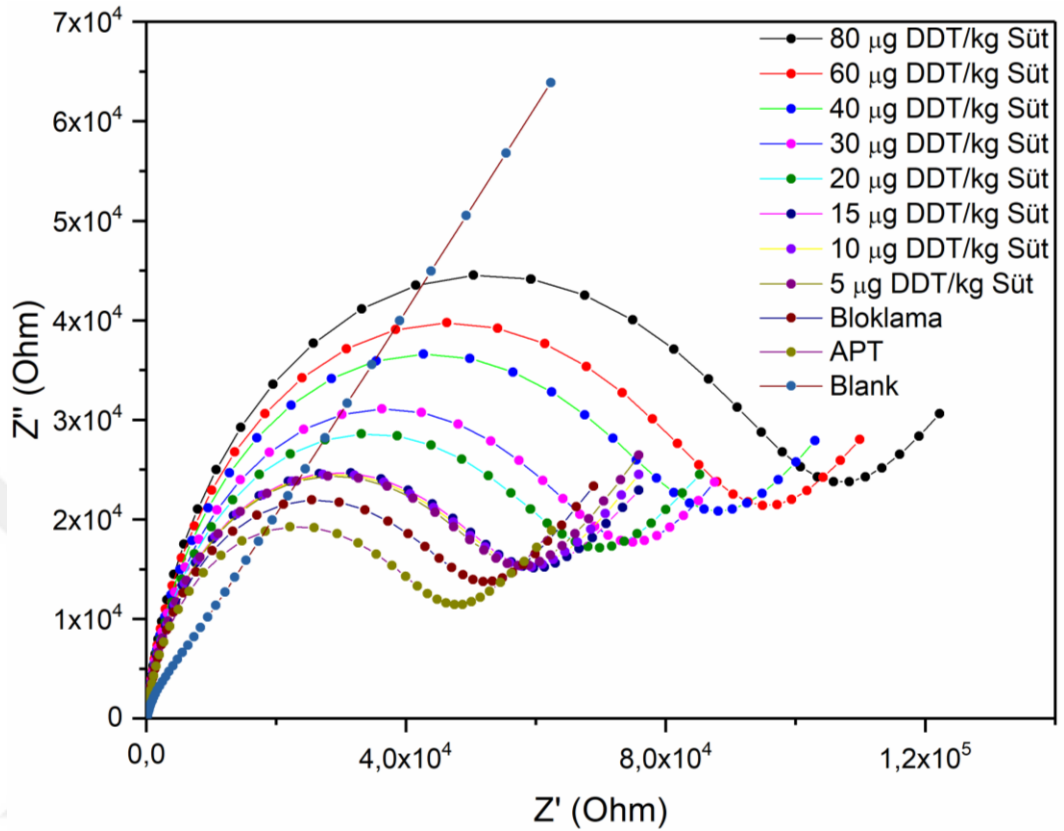
artışlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, elektrot yüzeyindeki aptamerlerin hedef molekülle etkili şekilde bağlandığını, oluşan aptamer-DDT komplekslerinin ise elektron transferini giderek daha fazla sınırlayan ek bir direnç katmanını oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil 7.36. APT-2 aptameri kullanılarak S(1-1-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.36’da verilen S(1-1-2) modifikasyon koşuluyla hazırlanmış elektrota ait Nyquist diyagramları değerlendirildiğinde, bloklama adımı sonrasında uygulanan 5 µg DDT/kg süt inkübasyonunda R_{ct} ’nin yaklaşık 3,4 kΩ arttığı görülmektedir. DDT derişimi 10 ve 15 µg/kg seviyelerine çıkarıldığında ise hesaplanan R_{ct} değerleri sırasıyla 13,1 ve 24,1 kΩ olarak belirlenmiştir. Bu aralıkta artış devam etmekle birlikte, beklenen doğrusal eğilimde bir ivme gözlenmemiştir. 20 µg DDT/kg süt seviyesinde R_{ct} ’nin yalnızca küçük bir artışla 25,0 kΩ değerine ulaşması sonrasında, 30 µg/kg ve üzerindeki derişimlerde sensör yanıtının yeniden belirgin bir artış trendine geçtiği gözlemlenmiştir. Artan DDT seviyeleri için bloklamaya göre hesaplanan R_{ct} farklarının 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için sırasıyla 33,9; 39,6; 43,5 ve 54,3 kΩ olması, bu konsantrasyon aralığında aptamer-DDT bağlanmasının daha etkin gerçekleştiğini ve yüzeydeki elektron transfer direncinin giderek daha fazla yükseldiğini ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar, S(1-1-2) koşulunun özellikle orta–yüksek derişimlerde hedef molekül bağlanmasına duyarlı bir empedans yanıtı üretebildiğini göstermektedir.

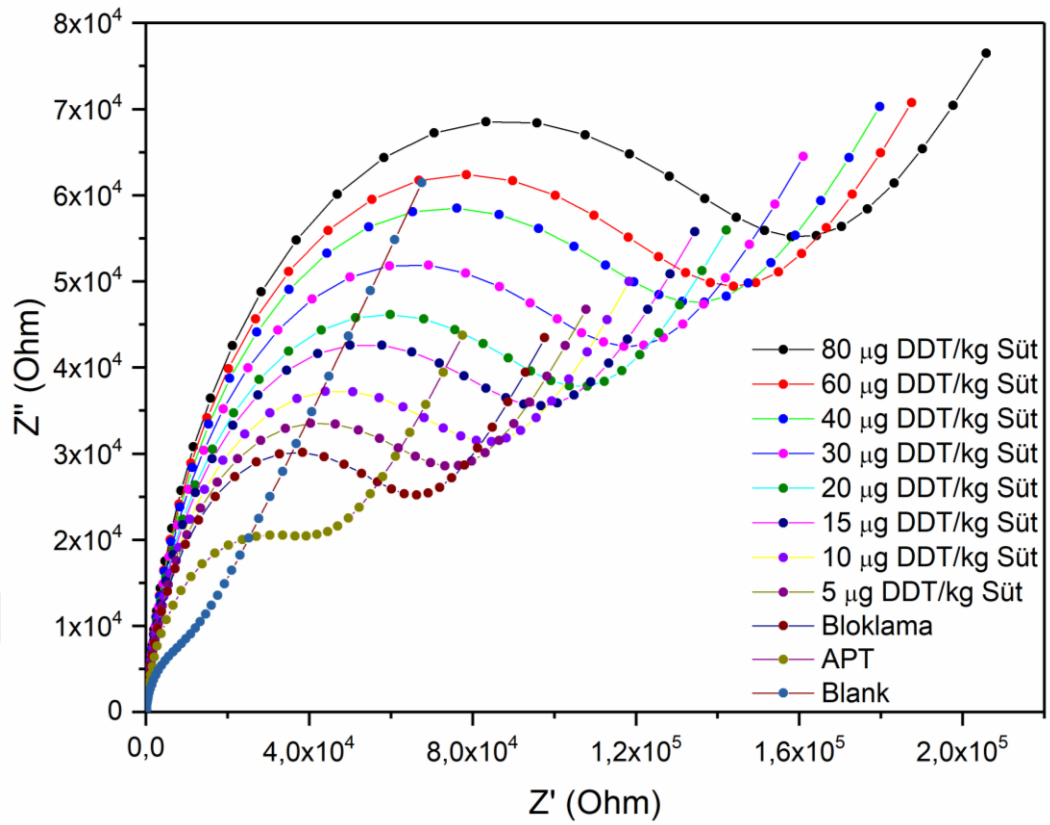


Şekil 7.37. APT-2 aptameri kullanılarak S(1-2-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.37’de verilen S(1-2-0,5) koşuluyla modifiye edilmiş elektrota ait Nyquist eğrileri incelendiğinde, bloklama adımını takiben uygulanan 5 µg DDT/kg süt inkübasyonunun R_{ct} değerini yaklaşık 12,6 kΩ yükselttiği görülmektedir. DDT derişiminin artırılmasıyla birlikte bu yükseliş eğiliminin kesintisiz bir şekilde devam ettiği dikkat çekmektedir.

Bloklama basamağına göre hesaplanan R_{ct} farkları; 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için sırasıyla 13,1; 13,8; 15,1; 27,0; 38,0; 43,9 ve 53,0 kΩ olarak belirlenmiştir. Bu artış çizgisi, hedef molekülün aptamerle başarılı şekilde etkileşime girdiğini ve yüzeyde oluşan aptamer-DDT komplekslerinin elektron transferini giderek daha fazla sınırlandırdığını açıkça ortaya koymaktadır.

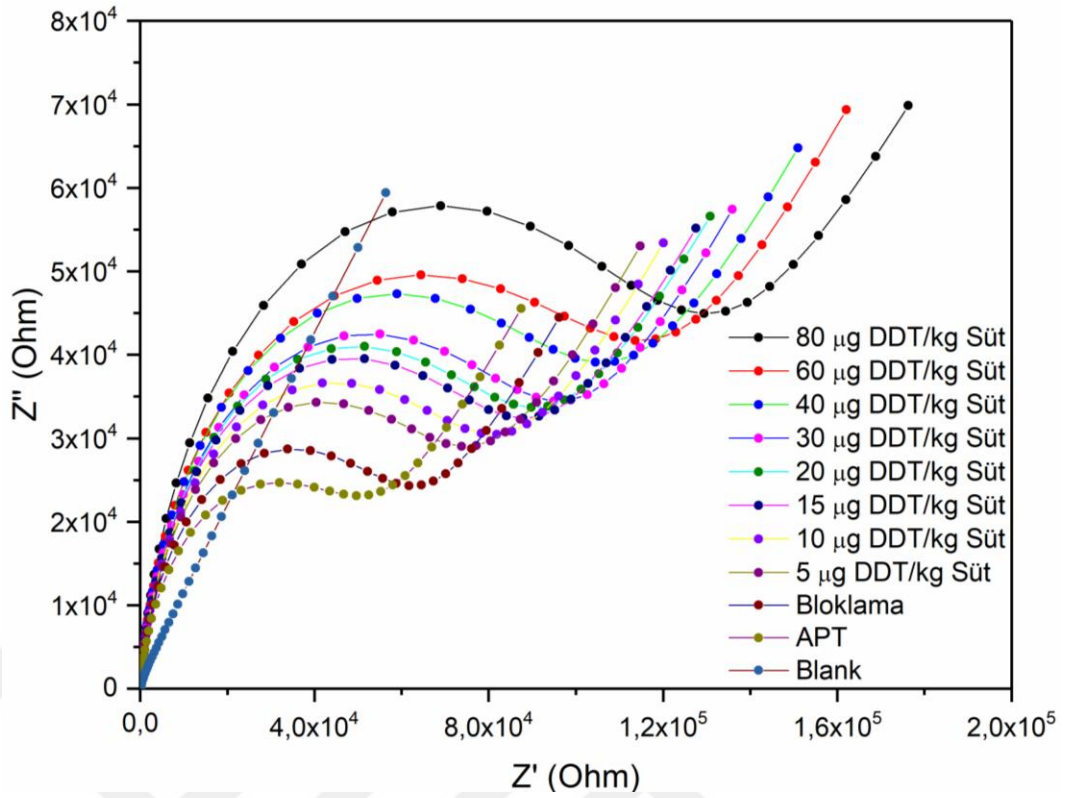
Genel olarak S(1-2-0,5) koşulu, DDT bağlanmasına karşı duyarlı bir yüzey modifikasyonu sağlamış görünmektedir. Düşük konsantrasyonlarda bile belirgin bir empedans artışı gözlenmesi, yüzeyde etkili bir aptamer yerleşimine işaret etmektedir.



Şekil 7.38. APT-2 aptameri kullanılarak S(1-2-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.38’de S(1-2-1) koşuluyla hazırlanmış elektrot kullanılarak elde edilen EIS Nyquist grafikleri değerlendirildiğinde, 5 µg DDT/kg süt inkübasyonunun ardından R_{ct} değerinde bloklaama aşamasına kıyasla 8,2 kΩ’luk bir artış ortaya çıktığı görülmektedir.

DDT konsantrasyonunun yükselmesiyle bu eğilim devam etmiş ve 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt inkübasyonlarında hesaplanan R_{ct} artışları sırasıyla 15,7; 25,2; 33,0; 41,8; 49; 57,9 ve 75,9 kΩ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, sensörün artan analit miktarına karşı güçlü ve konsantrasyona bağımlı bir empedans yanıtı verdiğini göstermektedir.

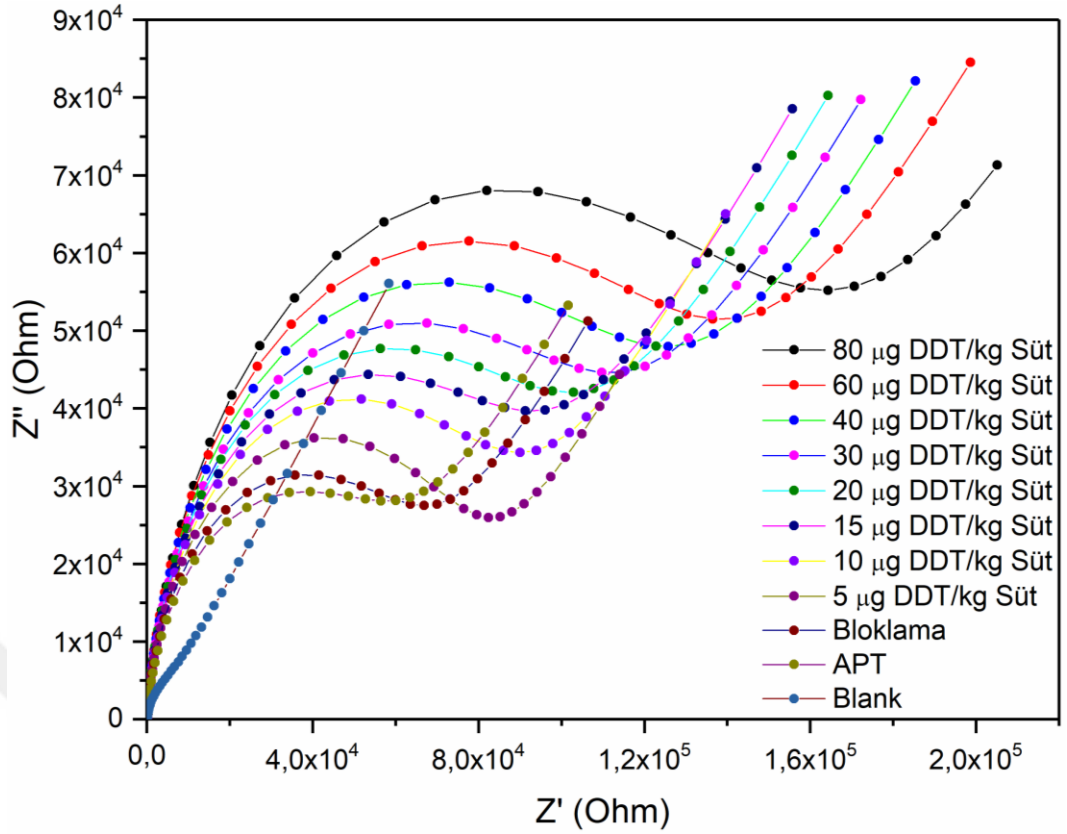


Şekil 7.39. APT-2 aptameri kullanılarak S(1-2-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.39’da sunulan S(1-2-2) modifikasyon koşuluna sahip elektrotla elde edilen Nyquist eğrileri incelendiğinde, 5 µg DDT/kg süt ile yapılan inkübasyon sonrasında R_{ct} değerinin bloklama basamağına göre yaklaşık 5,7 kΩ arttığı görülmektedir.

DDT derişiminin yükselmesiyle bu artış eğilimi belirgin biçimde sürmüştür; 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt konsantrasyonlarında hesaplanan R_{ct} farkları sırasıyla 13,8; 19,4; 23,6; 32,4; 40,0 ve 50,75 kΩ olarak elde edilmiştir.

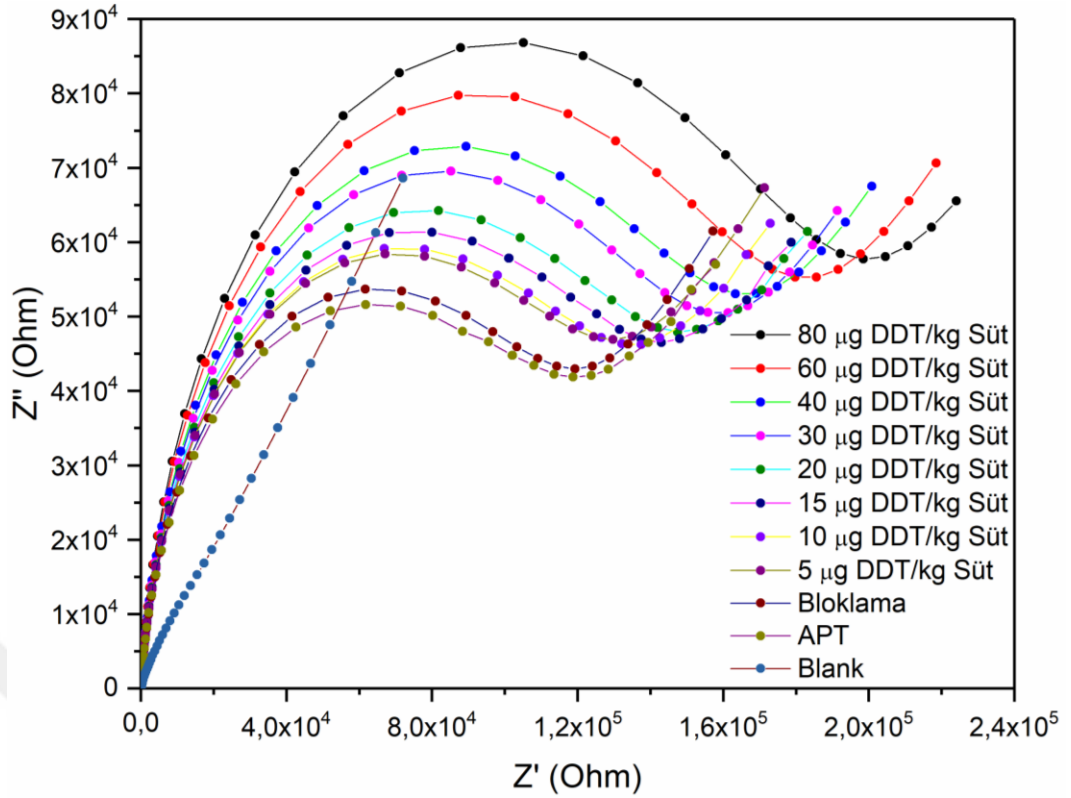
Bu bulgular, sensörün analit miktarındaki değişimlere duyarlı bir şekilde tepki verdiğini ve artan DDT konsantrasyonlarının yüzeyde daha güçlü bir elektron transfer bariyeri oluşturarak empedansın konsantrasyonla uyumlu biçimde yükselmesine neden olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 7.40. APT-2 aptameri kullanılarak S(2-1-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.40'ta S(2-1-0,5) koşuluyla hazırlanmış elektrot kullanılarak elde edilen EIS Nyquist grafikleri değerlendirildiğinde, 5 µg DDT/kg süt inkübasyonunun ardından R_{ct} değerinde bloklama aşamasına kıyasla 10,73 kΩ'luk belirgin bir artış ortaya çıktığı görülmektedir.

DDT konsantrasyonunun yükselmesiyle bu eğilim devam etmiş ve 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt inkübasyonlarında hesaplanan R_{ct} artışları sırasıyla 20,5; 26,1; 33,5; 39,5; 50,4; 60,9 ve 76,5 kΩ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, sensörün artan analit miktarına karşı güçlü ve konsantrasyon bağımlı bir empedans yanıtı verdiğini göstermektedir.

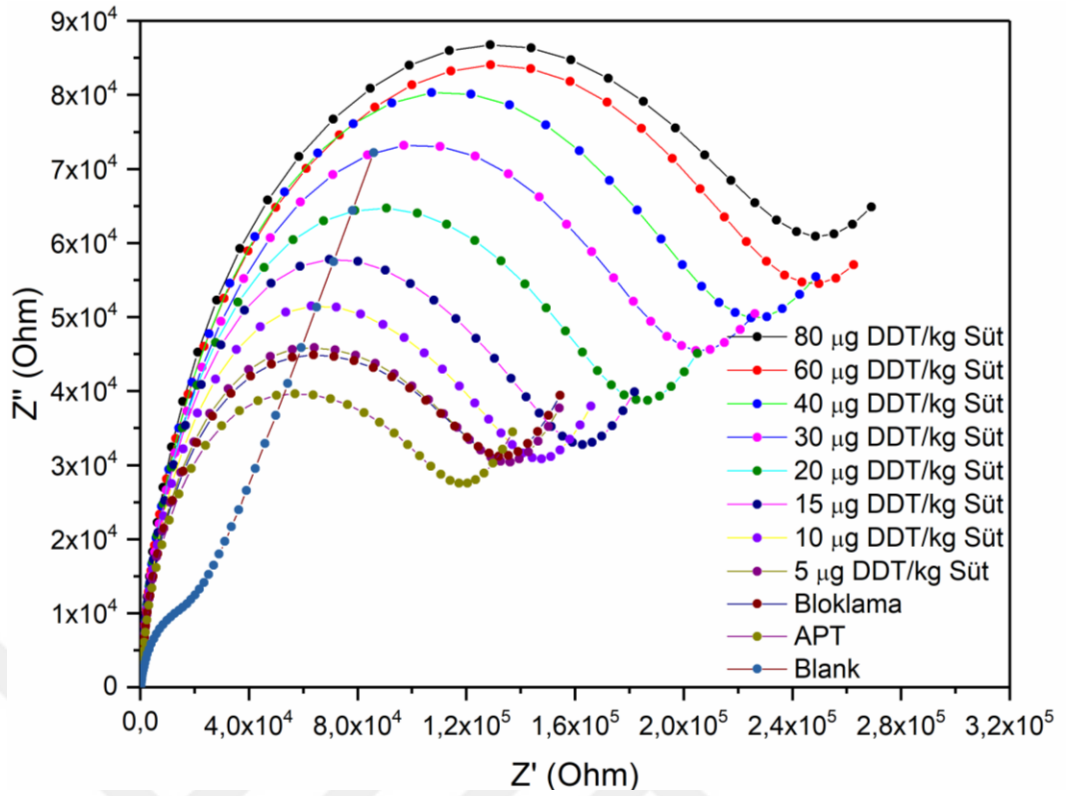


Şekil 7.41. APT-2 aptameri kullanılarak S(2-1-1) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.41’de sunulan S(2-1-1) modifikasyon koşuluna sahip elektrottan elde edilen Nyquist eğrileri incelendiğinde, 5 µg DDT/kg süt ile gerçekleştirilen inkübasyonun ardından R_{ct} değerinin bloklama basamağına göre yaklaşık 10,4 kΩ arttığı görülmektedir. Daha yüksek DDT seviyelerinde bu artış eğiliminin devam ettiği dikkat çekmektedir.

DDT derişimi yükseldikçe R_{ct} değerlerinde düzenli ve belirgin bir artış kaydedilmiş; 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt için hesaplanan R_{ct} farkları sırasıyla 13,1; 16,0; 22,8; 32,6; 40,0; 52,9 ve 66,9 kΩ olarak belirlenmiştir.

Bu eğilim, sensör yüzeyinde DDT ile etkileşime giren aptamer miktarının artmasıyla elektron transfer yolunun giderek daha fazla engellendiğini ve özellikle yüksek konsantrasyonlarda hedef bağlanmasının yoğunlaşması nedeniyle empedans tepkisinin güçlendiğini göstermektedir.

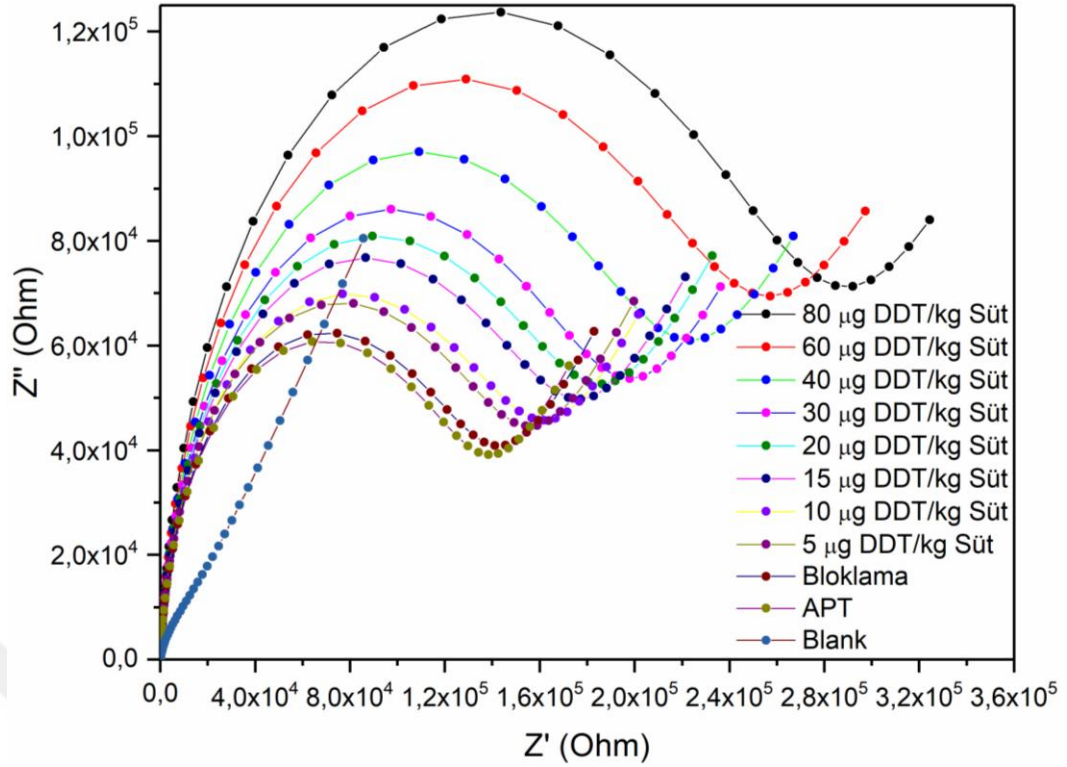


Şekil 7.42. APT-2 aptameri kullanılarak S(2-1-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.42’de sunulan S(2-1-2) modifikasyon koşuluyla hazırlanmış elektrota ait Nyquist eğrileri incelendiğinde, 5 µg DDT/kg süt inkübasyonu sonrasında R_{ct} değerinin bloklama basamağına göre yaklaşık 2,2 kΩ arttığı görülmektedir.

DDT derişimi yükseltildikçe bu artışın daha belirgin hâle geldiği dikkat çekmektedir. Nitekim 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt seviyelerinde hesaplanan R_{ct} farkları sırasıyla 13,1; 22,5; 34,2; 50,7; 62,6; 84,3 ve 95,7 kΩ olarak elde edilmiştir.

Bu bulgular, sensörün artan DDT miktarına karşı önceki ölçümlere kıyasla daha belirgin, daha konsantrasyon-bağımlı ve güçlü bir empedans tepkisi ortaya koyduğunu göstermekte; yüzeyde meydana gelen aptamer-DDT etkileşimlerinin bu koşulda daha etkin bir şekilde elektron transferini sınırladığını düşündürmektedir.

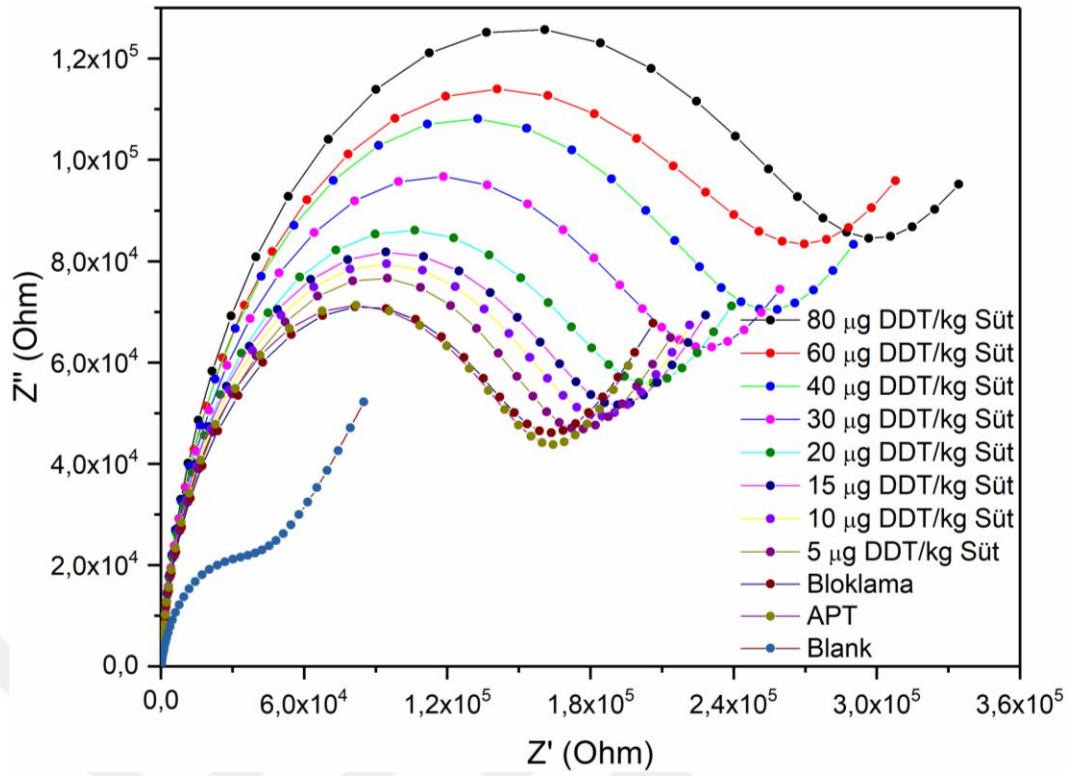


Şekil 7.43. APT-2 aptameri kullanılarak S(2-2-0,5) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.43'te verilen S(2-2-0,5) koşulu ile modifiye edilmiş elektrota ait Nyquist diyagramları incelendiğinde, 5 µg DDT/kg süt inkübasyonunun ardından R_{ct} değerinde bloklama basamağına kıyasla yaklaşık 18,6 kΩ'luk bir artış meydana geldiği görülmektedir.

DDT derişiminin kademeli olarak artırılmasıyla bu yükselişin daha belirgin bir ivme kazandığı anlaşılmaktadır. Gerçekten de 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt konsantrasyonlarında hesaplanan R_{ct} artışları sırasıyla 23,5; 34,5; 41,1; 70,1; 100,3 ve 144,2 kΩ olarak kaydedilmiştir. Bu değerler, özellikle orta ve yüksek derişim aralıklarında elektron transferinde belirgin bir engellenme yaşandığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, sensörün DDT seviyesindeki artışa oldukça duyarlı bir tepki verdiğini ve empedans değişiminin konsantrasyonla birlikte keskin şekilde büyüdüğünü ortaya koymaktadır. Söz konusu artışın, aptamer-DDT komplekslerinin yüzeyde daha yoğun şekilde birikerek elektron transfer yolunu etkili biçimde sınırlandırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 7.44. APT-2 aptameri kullanılarak S(2-2-2) koşulunda hazırlanmış elektrottan elde edilen EIS Nyquist grafikleri

Şekil 7.44'te sunulan S(2-2-2) modifikasyon koşuluna ait Nyquist eğrileri değerlendirildiğinde, 5 µg DDT/kg süt ile inkübasyon sonrası R_{ct} değerinin, bloklama adımına göre yaklaşık 7,2 kΩ yükseldiği görülmektedir. DDT derişiminin basamaklı olarak artırılmasıyla birlikte bu yükselişin giderek daha belirgin hâle geldiği dikkat çekmektedir. Nitekim 10, 15, 20, 30, 40, 60 ve 80 µg DDT/kg süt seviyelerinde elde edilen R_{ct} farkları sırasıyla 14,5; 21,3; 28,0; 50,7; 73,2; 86,3 ve 97,2 kΩ olarak hesaplanmıştır. Bu veriler, özellikle orta ve yüksek konsantrasyonlarda elektron transferinin belirgin ölçüde zorlaştığını göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, sensörün DDT miktarındaki artışı oldukça hassas bir şekilde izleyebildiği, empedans yanıtının konsantrasyon yükseldikçe keskin bir artış sergilediği anlaşılmaktadır. Bu davranışın, aptamer ile DDT arasında oluşan komplekslerin yüzeyde daha yoğun şekilde birikmesi ve buna bağlı olarak elektron aktarım yolunu etkin biçimde daraltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

EK-5. APT-1, APT-2 ve APT-3 aptamerlerinin kenetleme ve seçicilik özelliklerini değerlendirmek amacıyla oluşturulan PCA matrisi

Aptamer-ligand	Dosya içindeki bağlanma pozu sıralaması	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Ki değeri	Moleküller arası son etkileşim enerjisi	Van der Waals, hidrojen bağı ve desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	Nihai iç enerji	Torsiyonel serbest enerji	Bağlanmamış durum enerjisi
APT1-ALD	1	-3,44	3030	-3,44	-3,36	-0,07	0	0	0
APT1-ALD	2	-3,44	3020	-3,44	-3,37	-0,07	0	0	0
APT1-ALD	3	-3,44	3010	-3,44	-3,37	-0,07	0	0	0
APT1-ALD	4	-3,44	3000	-3,44	-3,37	-0,07	0	0	0
APT1-ALD	5	-3,44	3030	-3,44	-3,36	-0,08	0	0	0
APT2-ALD	1	-4,66	384,23	-4,66	-4,63	-0,03	0	0	0
APT2-ALD	2	-4,66	382,42	-4,66	-4,63	-0,03	0	0	0
APT2-ALD	3	-4,66	383,93	-4,66	-4,63	-0,03	0	0	0
APT2-ALD	4	-4,66	382,92	-4,66	-4,63	-0,03	0	0	0
APT2-ALD	5	-4,66	384,27	-4,66	-4,63	-0,03	0	0	0
APT1-ATR	1	-5,96	42,93	-7,15	-3,13	-4,02	-0,09	1,19	-0,09

Aptamer -ligand	Dosya içindeki bağlanma pozu sıralaması	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Ki değeri	Moleküller arası son etkileşim enerjisi	Van der Waals, hidrojen bağı ve desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	Nihai iç enerji	Torsiyonel serbest enerji	Bağlanmamış durum enerjisi
APT1- ATR	2	-5,96	42,93	-7,15	-3,13	-4,02	-0,09	1,19	-0,09
APT1- ATR	3	-5,67	69,79	-6,86	-2,8	-4,06	-0,07	1,19	-0,07
APT1- ATR	4	-5,67	69,79	-6,86	-2,8	-4,06	-0,07	1,19	-0,07
APT1- ATR	5	-5,58	81,59	-6,77	-2,74	-4,03	-0,07	1,19	-0,07
APT2- ATR	1	-5,73	63,39	-6,92	-4,09	-2,83	0,03	1,19	0,03
APT2- ATR	2	-5,73	63,39	-6,92	-4,09	-2,83	0,03	1,19	0,03
APT2- ATR	3	-5,65	72,03	-6,84	-3,87	-2,97	0,01	1,19	0,01
APT2- ATR	4	-5,65	72,03	-6,84	-3,87	-2,97	0,01	1,19	0,01
APT2- ATR	5	-5,64	73,27	-6,83	-3,9	-2,93	0,02	1,19	0,02
APT1- DDT	1	-3,7	1930	-4,6	-4,54	-0,06	-1,01	0,89	-1,01
APT1- DDT	2	-3,7	1930	-4,6	-4,54	-0,06	-1,01	0,89	-1,01
APT1- DDT	3	-3,69	1980	-4,58	-4,53	-0,06	-1,01	0,89	-1,01

Aptamer -ligand	Dosya içindeki bağlanma pozu sıralaması	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Ki değeri	Moleküller arası son etkileşim enerjisi	Van der Waals, hidrojen bağı ve desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	Nihai iç enerji	Torsiyonel serbest enerji	Bağlanmamış durum enerjisi
APT1- DDT	4	-3,68	2000	-4,58	-4,52	-0,06	-1,02	0,89	-1,02
APT1- DDT	5	-3,68	2010	-4,57	-4,52	-0,06	-1,02	0,89	-1,02
APT2- DDT	1	-4,37	629,8	-5,26	-5,3	0,04	-0,71	0,89	-0,71
APT2- DDT	2	-4,37	630,24	-5,26	-5,3	0,04	-0,71	0,89	-0,71
APT2- DDT	3	-4,37	629,8	-5,26	-5,3	0,04	-0,71	0,89	-0,71
APT2- DDT	4	-4,33	666,59	-5,23	-5,27	0,04	-0,73	0,89	-0,73
APT2- DDT	5	-4,17	880,78	-5,06	-5,1	0,04	-0,99	0,89	-0,99
APT1- DLD	1	-2,67	11110	-3,26	-3,17	-0,09	-0,28	0,6	-0,28
APT1- DLD	2	-2,67	11120	-3,26	-3,17	-0,09	-0,28	0,6	-0,28
APT1- DLD	3	-2,67	11110	-3,26	-3,17	-0,09	-0,28	0,6	-0,28
APT1- DLD	4	-2,66	11160	-3,26	-3,19	-0,07	-0,27	0,6	-0,27
APT1- DLD	5	-2,66	11300	-3,25	-3,16	-0,09	-0,28	0,6	-0,28

Aptamer -ligand	Dosya içindeki bağlanma pozu sıralaması	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Ki değeri	Moleküller arası son etkileşim enerjisi	Van der Waals, hidrojen bağı ve desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	Nihai iç enerji	Torsiyonel serbest enerji	Bağlanmamış durum enerjisi
APT2- DLD	1	-4,28	725,53	-4,88	-4,8	-0,08	-0,28	0,6	-0,28
APT2- DLD	2	-4,28	731,35	-4,87	-4,8	-0,08	-0,28	0,6	-0,28
APT2- DLD	3	-4,28	730,98	-4,87	-4,79	-0,08	-0,28	0,6	-0,28
APT2- DLD	4	-4,28	727,48	-4,88	-4,8	-0,08	-0,28	0,6	-0,28
APT2- DLD	5	-4,28	724,03	-4,88	-4,8	-0,08	-0,28	0,6	-0,28
APT1- EDS	1	-3	6350	-3	-2,63	-0,36	0	0	0
APT1- EDS	2	-3	6350	-3	-2,63	-0,36	0	0	0
APT1- EDS	3	-2,92	7220	-2,92	-2,69	-0,23	0	0	0
APT1- EDS	4	-2,92	7200	-2,92	-2,7	-0,22	0	0	0
APT1- EDS	5	-2,92	7220	-2,92	-2,7	-0,22	0	0	0
APT2- EDS	1	-4,63	404,4	-4,63	-4,7	0,07	0	0	0
APT2- EDS	2	-4,63	402,59	-4,63	-4,7	0,07	0	0	0

Aptamer -ligand	Dosya içindeki bağlanma pozu sıralaması	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Ki değeri	Moleküller arası son etkileşim enerjisi	Van der Waals, hidrojen bağı ve desolvasyon enerjisi	Elektrostatik enerji	Nihai iç enerji	Torsiyonel serbest enerji	Bağlanmamış durum enerjisi
APT2- EDS	3	-4,63	401,79	-4,63	-4,7	0,07	0	0	0
APT2- EDS	4	-4,63	402,34	-4,63	-4,7	0,07	0	0	0
APT2- EDS	5	-4,63	403,53	-4,63	-4,7	0,07	0	0	0