

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PESTİSİT TAYİNİ İÇİN APTAMER TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL
BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

Mustafa Barış KOÇER

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mustafa Barış Koçer tarafından hazırlanan “**Pestisit Tayini İçin Aptamer Temelli Elektrokimyasal Biyosensörlerin Hazırlanması**” adlı tez çalışması 21/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI



Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Fatma ARSLAN

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya A.B.D.



Üye : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya A.B.D.



Üye : Yrd. Doç. Dr. Serap DURKUT

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya A.B.D.



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

21.06.2017



Mustafa Barış KOÇER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PESTİSİT TAYİNİ İÇİN APTAMER TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Mustafa Barış KOÇER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Bu çalışmada, gıdalarda ve atık sularda sık rastlanan ve insanlarda kalıcı hasara sebep olan pestisitlerden biri olan asetamipritin hızlı, duyarlı ve güvenilir bir şekilde tespiti için aptamer temelli bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, önemli bir pestisit türü olan asetamipritin tayini için aptasensör geliştirildi. Bu pestisit tayini için öncelikle asetamiprite özgü SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) yöntemiyle seçilmiş tiyol grubuna sahip aptamerin (Apt1) altın nanopartikül ve poli 5-amino-2-merkapto-1,3,4-tiyadizol (PAMT) ile modifiye edilerek perde baskılı karbon elektrotların (SPE) yüzeyine bağlanması sağlandı. Ardından yüzeye bağlı aptamer, asetamiprit ile etkileştirildi. Apt1'den farklı bir dizilimde olan ve biyotin ile işaretli aptamer 2 (Apt2) de analit ile etkileştirildikten sonra enzim işaretli basamağa geçildi. Bu basamakta yüzeye bağlı ikinci aptamer biotin ile modifiye olduğundan streptavidin-alkalen fosfataz (strep-ALP) konjugatı ile etkileşim sonucu alkalen fosfataz yüzeye bağlandı. Alkale fosfatazın α -naftil fosfat ile etkileşimi sonucu oluşan ürün elektroaktif olduğundan alfa naftol üzerinden asetamiprit tayini yapıldı. Geliştirilen aptasensörün çalışma aralığı 5×10^{-12} - 5×10^{-10} M, gözlenebilirlik sınırı $1,5 \times 10^{-12}$ M, tekrar üretilebilirlik çalışmalarında elde edilen bağıl standart sapma %7,00 olarak belirlendi. Ayrıca, geliştirilen yöntemin asetamiprit için iyi bir seçicilik ve iyi bir tekrarlanabilirlik gösterdiği ve tatmin edici sonuçlarla gerçek örneklerdeki asetamiprit tayininde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Haziran 2017, 79 sayfa

Anahtar Kelimeler: Asetamiprit, Aptamer, Biyosensör, Elektrokimya, Perde Baskılı Elektrot.

ABSTRACT

Master Thesis

PREPARATIONS OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS BASED ON APTAMER FOR PESTICIDE DETECTION

Mustafa Barış KOÇER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Sule PEKYARDIMCI

In this study, it was aimed to develop an aptamer-based biosensor for rapid, sensitive and reliable detection of acetamiprid, one of the pesticides which is common in food and wastewater and causes permanent damage in humans. For this purpose, an aptasensor was developed for the determination of acetamiprid, an important pesticide species. Firstly, for the determination of this pesticide, thiol modified primary aptamer (Apt1), special to acetamiprid and selected by using SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) method, was provided to bind onto the surface of gold nanoparticles and poly-5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadizole (PAMT) modified screen printed electrodes (SPE). Then, surface-bound aptamer was interacted with acetamiprid. After the biotin-labeled aptamer 2 (Apt2), which has a different sequence than Apt1, was then interacted with the analyte, then enzyme labeled step was performed. In this step, alkaline phosphatase was bound to the surface by means of the interaction between Apt2 labeled with biotin and streptavidin-alkaline phosphatase (strep-ALP) conjugate. The determination of acetamiprid was performed by using the electroactive property of α -naphthol which is acquired product from the interaction between alkaline phosphatase and α -naphthyl phosphate. The working range of the developed aptasensor was determined as 5×10^{-12} - 5×10^{-10} , limit of detection was $1,5 \times 10^{-12}$ M and the relative standard deviation obtained in the reproducibility study was 7,00%. It was also found that the developed method showed good selectivity and good reproducibility for acetamiprid and could be used in the determination of acetamiprite in real samples with satisfactory results.

June 2017, 79 pages

Key Words: Acetamiprid, Aptamer, Biosensor, Electrochemistry, Screen Printed Electrode.

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinden tezin tamamlanmasına kadar geçen her aşamada maddi manevi desteğini esirgemeyen, çalışmalarım süresince bana her konuda yardım eden, akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan danışmanım Sayın Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI'ya (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi),

Yüksek lisans çalışmalarımın her aşamasında bana vakit ayıran, çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan, fikirlerime değer vererek çalışma ve araştırma şevkimi her zaman taze tutan, her konuda yardımını ve desteğini gördüğüm değerli hocam Dr. Gözde AYDOĞDU TIĞ'a ve çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ecem Özlem BOLAT, Selin DAĞLAR ve Mehmet Sait YILMAZ'a,

214Z203 numaralı proje kapsamında bana ve çalışmalarımın gerçekleşmesi için gerekli maddelerin ve ekipmanların temininde maddi destek sağlayarak tarımsal ilaçlamada sıklıkla kullanılan bir pestisit türü olan asetamipritin analizi için kolay uygulanabilir biyosensör sisteminin geliştirilmesine katkı sağlamış olan TÜBİTAK'a,

Her zaman bana destek olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa Barış KOÇER

Ankara, Haziran 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Biyosensörler	3
2.1.1 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler	5
2.1.2 Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gereken konular	7
2.1.3 Biyosensörlerde kullanılan immobilizasyon teknikleri	8
2.1.4 Biyosensörlerin uygulama alanları	9
2.2 Elektrokimyasal Yöntemler	10
2.2.1 Voltametrik yöntemler	11
2.3 Perde Baskılı Karbon Elektrotlar (SPE).....	15
2.4 İletken Polimerler.....	15
2.5 Pestisitler.....	16
2.5.1 Pestisitlerin sınıflandırılması	18
2.5.2 Pestisitlerin kullanım alanları	21
2.5.3 Pestisitlerin insanlar ve çevre üzerine etkileri.....	22
2.5.4 Pestisit analizlerinde kullanılan yöntemler	24
2.6 Asetamiprit	25
2.7 Aptamerler	26
2.7.1 SELEX yöntemi.....	28
2.8 Kaynak Özetleri	30
2.8.1 Aptamer temelli biyosensörler ile ilgili kaynak özetleri	30
2.8.2 Asetamiprit tayinine yönelik yapılan çalışmalar.....	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	40
3.1 Kullanılan Cihazlar, Hücre ve Elektrotlar	40
3.2 Kullanılan Kimyasallar	41
3.2.1 Azot gazı.....	41
3.2.2 Kullanılan diğer kimyasallar	42
3.3 Kullanılan Çözeltiler	43
3.3.1 TRIS-HCl tamponu.....	43
3.3.2 Fosfat tamponu.....	43
3.3.3 Dietanolamin tamponu	43
3.3.4 6-merkaptto hekzanol çözeltisi.....	43
3.3.5 Poli (5-amino-2-mercaptop-1,3,4-thiadiazole [P(AMT)] çözeltisi.....	43
3.3.6 Tetra kloroaurik asit (HAuCl ₄) çözeltisi.....	44
3.3.7 Stok aptamer çözeltileri.....	44
3.3.8 Stok asetamiprit çözeltisi.....	44
3.3.9 Streptavidin-alkalen fosfataz enzim konjugatı (Strep-ALP) çözeltisi.....	44

3.3.10 α --naftil fosfat çözeltisi.....	44
3.3.11 Girişim yapan türlerin çözeltileri	45
3.3.12 Gerçek numune çözeltileri.....	45
3.4 Deneyin Yapılışı.....	45
3.4.1 Modifiye perde baskılı karbon elektrotların hazırlanması	45
3.4.2 Modifiye perde baskılı karbon elektrotların karakterizasyonu	46
3.4.3 Aptamer 1 dizisinin ve miktarının belirlenmesi	46
3.4.4 Aptamer 2 miktarının belirlenmesi	47
3.4.5 SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodunun asetamiprit ile etkileşim süresinin optimizasyonu	47
3.4.6 ACE için çalışma aralığının belirlenmesi.....	47
3.4.7 Girişim etkisi	48
3.4.8 Tekrar üretilebilirlik.....	49
3.4.9 Geliştirilen aptasensör ile gerçek numune analizi.....	49
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	51
4.1 Modifiye Perde Baskılı Karbon Elektrotların Hazırlanması.....	51
4.2 Modifiye Perde Baskılı Karbon Elektrotların Karakterizasyonu	53
4.3 Aptamer 1 Dizisinin ve Miktarının Belirlenmesi	58
4.4 Aptamer 2 Miktarının Belirlenmesi	58
4.5 SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 Elektrodunun Asetamiprit İle Etkileşim Süresinin Optimizasyonu	59
4.6 ACE İçin Çalışma Aralığının Belirlenmesi.....	60
4.7 Girişim Etkisi.....	62
4.8 Tekrar Üretilebilirlik.....	62
4.9 Geliştirilen Aptasensör ile Gerçek Numune Analizi	63
5. SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ.....	79

SİMGELER DİZİNİ

M	Molar
i_{pa}	Anodik pik akımı
i_{pk}	Katodik pik akımı

Kısaltmalar

μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
ACE	Asetamiprit
AMT	5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole
AuNPs	Altın nanopartiküller
BSS	Bağıl standart sapma
CV	Dönüşümlü voltametri
DEA	Dietanolamin
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
R_{et}	Elektron transfer direnci
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPE	Perde baskılı karbon elektrot
Strep-ALP	Streptavidin-alkalen fosfataz enzim konjugatı
XPS	X-ışınları fotoelektron spektroskopisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması).....	3
Şekil 2.2 Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri	13
Şekil 2.3 Asetamipritin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.4 SELEX yönteminin genel şeması	29
Şekil 3.1 AUTOLAB PGSTAT302N elektrokimyasal analiz cihazı.....	40
Şekil 3.2 Perde baskılı karbon elektrot (SPE).....	41
Şekil 3.3 Geliştirilen aptasensörün yapım aşamalarının şematik olarak gösterimi.....	48
Şekil 3.4 Alfa naftil fosfatın alfa naftole dönüşüm reaksiyonu	48
Şekil 4.1.a AMT'nin dönüşümlü voltametri ile SPE yüzeyine elektropolimerizasyonu, b. AuNPs'in dönüşümlü voltametri ile SPE/P(AMT) yüzeyine biriktirilmesi.....	51
Şekil 4.2 AMT'nin elektropolimerizasyon mekanizması	52
Şekil 4.3.a Yalın SPE, b. SPE/AuNPs, c. SPE/P(AMT), d. SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının dönüşümlü voltamogram eğrileri.....	53
Şekil 4.4.a SPE, b. SPE/AuNPs, c. SPE/P(AMT), d. SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının Nyquist eğrileri.	55
Şekil 4.5.a Yalın SPE, b. SPE/P(AMT), c,d. SPE/P(AMT)/AuNPs, e,f. SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrotlarının SEM görüntüleri.....	55
Şekil 4.6.a (1) yalın SPE, (2) SPE/P(AMT) and (3) SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarına ait XPS spektrumları, (b) SPE/P(AMT) elektrotta N1s ve (c) S2p için genişletilmiş XPS spektrumları	57
Şekil 4.7 S10 ve S18 dizilerinin 0,5-5,0 μ M derişimleri için elde edilen R_{et} değerleri.....	58
Şekil 4.8 Apt2 (S10-BIO) dizisinin 2,0–5,0 μ M derişimleri için elde edilen akım.....	59
Şekil 4.9 SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodu ile ACE arasındaki etkileşim süresinin belirlenmesi.....	60
Şekil 4.10 0,005–10 nM derişimlerde asetamipritin SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1- ACE-Apt2 elektrodu kullanılarak elde edilen α -naftol yükseltgenme sinyallerinin ortalamaları.....	61
Şekil 4.11 Asetamiprit için 0,005–0,5 nM derişim aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi	61
Şekil 4.12 Pestisit numunelerindeki ACE tayininde yöntemlerin uyumluluğu	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edilen firmalar.....	42
Çizelge 4.1 Yalın SPE, SPE/P(AMT), SPE/AuNPs ve SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması.....	54
Çizelge 4.2 ACE tayini için geliştirilen biyosensöre diğer türlerin girişim etkisi	62
Çizelge 4.3 Farklı derişimlerdeki asetamiprit ile gerçek örnek analizi sonuçları	64
Çizelge 5.1 Asetamiprit için geliştirilen aptasensör ile diğer yöntemlerin kıyaslanması	67



1. GİRİŞ

Biyosensörler biyolojik, kimyasal ya da biyokimyasal sinyali ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştürebilen, fiziksel veya kimyasal çevirici ile birleştirilmiş biyolojik algılama materyali içeren analitik cihazlardır. Biyosensörlerde kullanılan biyoalgılama materyallerine örnek olarak enzimler, antikorlar, nükleik asitler, tam hücreler, reseptörler, dokular, organeller verilebilir. Son yıllarda biyosensör teknolojisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu biyosensörler tıp, tarım, eczacılık, savunma, nanobiyoteknoloji, ilaç sanayi ve gıda güvenliğinin sağlanması gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Freire vd. 2003).

Aptamerler kendilerine özgü özellikler taşıyan, belirgin üç boyutlu yapılarıyla hedef moleküle güçlü ve seçimli bir şekilde bağlanabilme yeteneğine sahip tek sarmal yapıda sentetik oligonükleotitlerdir. Tanıma yüzeyi olarak aptamerlerin kullanıldığı biyosensörlere aptasensörler adı verilmektedir. Aptasensörler, tıpta, tarımda, eczacılıkta, ilaç sanayisinde ve birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda aptasensörler dopamin, trombin ve L-triptofan gibi pek çok biyolojik bileşenin tayininde, toprak, hava ve suda bulunan pestisitlerin düşük miktarlarda belirlenmesinde, ilaç sanayinde ve gıda güvenliğinin sağlanmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Wang vd. 2015).

Gıda maddelerinin üretimi, tüketimi, depolanmaları esnasında gıdalara zarar veren mikroorganizma ve zararlıları uzaklaştırmak veya yok etmek amacıyla kullanılan kimyasal ya da biyolojik ürünlerin tümüne pestisit adı verilmektedir. Pestisitlerin aşırı ve bilinçsiz bir şekilde kullanımının insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkileri bulunmaktadır. Pestisitlerin denetimsiz ve bilinçsiz bir şekilde kullanılması sonucunda pestisitlerin kendisi ya da dönüşüm ürünleri gıdalarda, toprak, su ve havada kalabilmektedir. Bu nedenle, atık sularda, meyve ve sebzelerde pestisitlerin tayini, sağlık ve gıda güvenliği ile ilgili sorunların bilinmesi ve önüne geçilebilmesi bakımından oldukça önemlidir (Çetinkaya-Acar 2015). Gıda analizlerinde pestisit tayinleri genellikle HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ve GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry) gibi yöntemler ile yapılmaktadır ancak bu

yöntemlerin geç cevap süreleri, uzmanlık gerektirmeleri ve kullanım alanlarının kısıtlı olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda sebze, meyve ve atık sularda sıkça rastlanan pestisit kalıntılarının tayini için elektrokimyasal biyosensörler geliştirilmiştir.

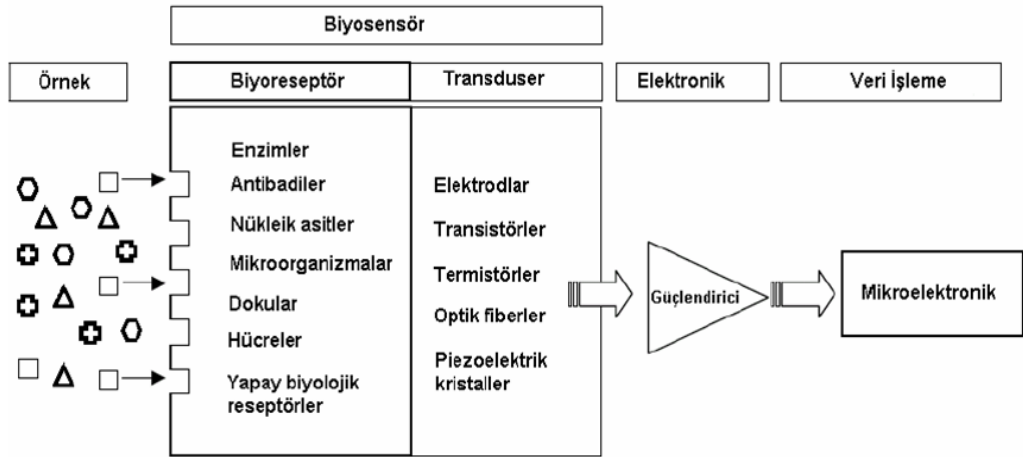
Asetamiprit (ACE) yeni neonikotinoid sınıfında yer alan sistemik geniş spektrumlu bir insektisittir. Nispeten düşük ve kronik memeli toksisitesi ve uzun süreli olmayan kümülatif toksisitesinden dolayı, tarımsal ürünlerde bulunan Hemiptera, Thysanoptera ve Lepidoptera gibi böcek türlerinin kontrolü için geleneksel insektisitlerin ve organofosforların yerini almıştır (Seccia vd. 2005). Ancak, yaygın olarak kullanıldığı düşünüldüğünde, yeraltı sularında serbest olarak bulunan asetamiprit tarafından kirletilen su ve gıdaları tüketen insanlar için potansiyel sağlık riski bulunmaktadır. Bu nedenle, gıdalarda ve çevrede yaygın olarak bulunan asetamiprit kalıntılarının ölçümü için basit, hızlı, yüksek duyarlılığa sahip ve seçici metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda elektrokimyasal yöntemler, hızlı cevap süreleri, taşınabilir olmaları, düşük maliyetli olmaları, gerçek zamanlı tayin yapılabilimleri ve çevre dostu olmaları gibi avantajlarından dolayı asetamiprit ve diğer pestisit türlerinin tayini için en umut verici teknolojilerden biri olarak kabul edilmektedirler (Fan vd. 2013, Zhang vd. 2014).

Bu tez çalışmasında, gıdalarda ve atık sularda yaygın olarak bulunan ve insanlarda kalıcı hasara yol açabilen bir pestisit türü olan asetamipritin hızlı, duyarlı ve güvenilir tayini için sandviç hibridizasyona dayalı aptamer temelli elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyosensörler

Biyosensörler, analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu madde ile etkileşimi sonucunda ortaya çıkardığı sinyalin iletici bir sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombine edilmesi ile oluşturulan analitik cihazlardır (Arya vd. 2006). Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyobileşen (biyolojik tanıma bölgesi) ile etkileşime girmesi sonucu transdüser (sinyal çevirici) yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin miktarı ile orantılı olarak sürekli elektrik sinyali üretmektir.



Şekil 2.1 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması (Velasco-Garcia ve Mottram 2003)

Genel olarak bir biyosensör; biyoelement (biyomolekül), sinyal çevirici ve sinyal okuyucu olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bir biyosensörü oluşturan temel bileşenler; seçici tanıma mekanizmasına sahip bir biyoelement, bu biyoelementin incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen bir çevirici ve sinyalleri ölçen detektördür. Bu bileşenlerden en önemlisi, analit ile seçici ve tersinir bir şekilde etkileşime giren biyoelementtir

(Chaubey ve Malhotra 2002). Biyosensörlerde biyoelement olarak genellikle nükleik asitler, hücre ve dokular, antikorlar, enzimler ve mikroorganizmalar kullanılmaktadır.

Genel olarak biyosensörler çalışma prensiplerine göre; biyoafinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Biyoafinite biyosensörlerinde biyoelement olarak genellikle antikorlar, DNA, lektin gibi moleküller ve hormon reseptörleri kullanılır. Biyoafinite esaslı biyosensörler antijenlerin, hormonların, glikoproteinlerin ve DNA parçacıklarının tanımlanmasında kullanılırlar. Bu biyosensörlerde optik ve piezoelektrik çevirici sistemleri kullanılır (Mello ve Kubota 2001). Biyokatalitik esaslı biyosensörlerde ise, biyoelementler analit üzerinde biyokimyasal değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucunda ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla hücreler, mikroorganizmalar, enzim sistemleri ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları kullanılır. Bu tür biyosensörlerde genellikle amperometrik, potansiyometrik, termal, optik ve piezoelektrik çevirici sistemleri kullanılır (Mello ve Kubota 2001).

Biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektronik sinyallere dönüştüren sistemlere sinyal çevirici (transducer) adı verilmektedir (Gursoy vd. 2002). Biyosensörlerde kullanılan sinyal çeviriciler, eletrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, piezoelektrik ve kalorimetrik esaslı sinyal çeviriciler olmak üzere sınıflandırılabilirler (Sharma vd. 2003).

Optik esaslı biyosensörler, iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir.

Kalorimetrik esaslı biyosensörler, genel olarak bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunun belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır.

Piezoelektrik esaslı biyosensörler, karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

Elektrokimyasal biyosensörler, diğer biyosensör türleri ile kıyaslandığında en gelişmiş ve en sık kullanılan biyosensör türüdür. Bu biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon sırasında elektrokimyasal türlerin oluşturduğu sinyalin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeyine biyoaktif bir bileşenin immobilize edildiği aygıtlardır. Elektrokimyasal biyosensörler genellikle iki veya üç elektrotlu sistem ile kullanılırlar. Elektrokimyasal biyosensörler amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik biyosensörler olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadırlar. Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ifade edilir. Kondüktometrik biyosensörler ise, bir biyokimyasal kimyasal reaksiyon sonucunda metal elektrot çifti arasında meydana gelen iletkenlik değişimini ölçer. Kondüktometrik biyosensörler, zayıf sinyallere sahip oldukları ve analite karşı spesifiklik göstermedikleri için pek tercih edilmezler. Potansiyometri en genel anlamda referans elektroda göre çalışma elektrodundaki potansiyel ölçümüne dayanır. Elektrot potansiyeli belirlenerek analit derişimi bulunur. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler cam elektrotlar, iyon seçimli elektrotlar gibi elektrotlardır (Telefoncu 1999, Chaubey ve Malhotra 2002).

2.1.1 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler aşağıda kısaca verilmiştir (Hall 1990; Buerk 1993):

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden bir tanesidir. Hedef analit dışında ortamda bulunan diğerk elektroaktif türler biyosensör cevabını etkilememelidir. Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik tanı materyalinin çalışılan potansiyelde sadece istenilen türe spesifik olması ideal biyosensörlerin özelliklerindendir. Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen spesifik, kararlı, sadece analit derişimine duyarlı olmalı ve diğerk kimyasal türlerden etkilenmemelidir. Bu nedenle ortamda girişim yapabilecek türler belirlenmeli ve girişimi engelleyecek önlemler alınmalıdır.

Duyarlılık: Hedef analitin derişimine bağılı olarak biyosensör cevabındaki doğrusal değışimin gözlenmesi ile belirlenir. Hazırlanan elektrodun duyarlılığı hesaplanırken analit derişimine karşı çizilen akım farkları grafiğinin eğiminden faydalanılır. İdeal bir biyosensörün analiz edilecek maddeye karşı yüksek duyarlılık göstermesi istenir.

Kararlılık: Hazırlanan biyosensörün performansını uzun süre koruması anlamındadır. Hazırlanan biyosensör ile yapılan bir dizi ölçüm sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değışim sonucunda çıkış sinyalindeki değışimin toplam ölçüm sayısı ile ya da gün sayısı ile ifade edilmesiyle biyosensörün kararlılık ömrü belirlenmektedir. Bir biyosensörün gün içinde ardı sıra yapılan ölçümlerde başlangıç aktivitesini ne kadar koruduğunun ölçüsü kullanım kararlılığını, belirli gün aralıklarında ölçümü ile de depolama kararlılığı bulunur. Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir.

Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı: Bir biyosensörün doğrusal çalışma aralığı, analit derişimine karşı cevap değışiminin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir ve belirli bir analit derişimine kadar doğrusaldır. Bu çalışma aralığı tayin edilebilen en düşük derişimden (tayin sınırı), kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan aralığı kapsar. Doğrusal grafiğinin en alt sınırına gözlenebilme sınırı adı verilir. Sıcaklık, ortam pH'sı, tamponun cinsi ve derişimi gibi parametreler doğrusal çalışma aralığını ve gözlenebilme sınırını etkilemektedir.

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik: Hazırlanan bir biyosensör ile art arda yapılan ölçümlerden elde edilen duyarlılıklar o biyosensörün tekrarlanabilirliğini; aynı

koşullarda hazırlanan farklı biyosensörlerin birbirleri arasındaki uyumu ise o biyosensörün tekrar üretilebilirliğini ifade etmektedir. Her iki durumda da elde edilen duyarlılıkların birbirine yakın değerlerde olması hazırlanan biyosensör ile yapılan analizlerin güvenilirliğinin ve doğruluğunun anlaşılması için önemlidir.

Cevap süresi: Cevap süresi, hedef analitin hücreye eklendiği andan itibaren kararlı hal akımları elde edinceye kadar geçen süre olarak tanımlanabilir. İdeal bir biyosensörün analiz edilecek maddeye karşı cevap süresinin oldukça kısa olması istenir.

Raf Ömrü: Raf ömrü, optimum çalışma şartları altında biyosensörün duyarlılığını koruduğu süre olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün ömrü, hedef analite olan duyarlılığın zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile bulunur. Elde edilen grafik incelendiğinde biyosensörün duyarlılığını koruduğu süre biyosensörün ömrü olarak belirlenir. İdeal bir biyosensörün uzun ömürlü olması istenir.

2.1.2 Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gereken konular

Biyosensör tasarımlarında öncelikle biyosensörün hangi analit için kullanılacağını belirlenmesi gerekir. Daha sonra ise aşağıdaki maddeler dikkate alınarak biyosensörler hazırlanmalıdır. Elektrokimyasal biyosensörler hazırlanırken dikkat edilmesi gereken konular;

- (i) Analite uygun bir biyobileşenin (tanıyıcı molekülün) belirlenmesi,
- (ii) Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon yönteminin seçimi,
- (iii) Biyoreseptörün analiti tanınmasıyla oluşan fiziksel veya kimyasal sinyali elektronik sinyale çeviren dönüştürücünün seçimi ve dizaynı,
- (iv) Ölçüm aralığına, duyarlılığa ve ölçümlerdeki girişimlere dikkate edilmesi,
- (v) Cihazın kompakt bir hale dönüştürülmesi.

2.1.3 Biyosensörlerde kullanılan immobilizasyon teknikleri

Biyosensörlerde, analizi yapılması hedeflenen örneğe uygun biyobileşen ve transduser seçildikten sonra biyobileşenin transduser yüzeyine immobilize edilmesi gerekir. Immobilizasyon, biyolojik komponentin uygun bir immobilizasyon yöntemiyle transdusere bağlanmasıdır.

Biyosensörlerde immobilizasyon için kullanılan temel yöntemler şöyledir (Telefoncu 1997, Dinçkaya 1999)

I. Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama)

II. Kovalent Bağlama

III. Tutuklama

IV. Çapraz Bağlama

Adsorpsiyon: Immobilizasyon için kullanılan en basit ve en eski yöntemlerden biridir. Biyobileşenin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Doğrudan adsorpsiyonun başlıca avantajı basit olması ve ılımlı koşullar altında kullanılabilmesidir. Adsorpsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir.

Kovalent Bağlama: Biyobileşenin transduser yüzeyine doğrudan ya da önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış fiziksel bileşene kimyasal bir reaksiyon sonucunda kovalent olarak bağlanmasına dayanan immobilizasyon yöntemidir. Kovalent bağlamanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Biyomolekül aktive edilmiş transduser yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyobileşeni içeren tabaka ile transduser yüzeyinde film oluşturulabilir. Biyobileşenlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı

direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir.

Tutuklama: Yüksek molekül kütleli biyomoleküllerin sentetik veya doğal jel matrislerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde immobilize edilmesidir. Yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Jel matriste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jelâtin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür.

Çapraz Bağlama:

Çapraz bağlama; küçük molekülü bifonksiyonel ya da multifonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanılarak biyobileşen ile adsorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturma prensibine dayanan immobilizasyon yöntemidir. Çapraz bağlayıcı ajan olarak en fazla glutaraldehit kullanılmaktadır.

2.1.4 Biyosensörlerin uygulama alanları

Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, tarım, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar (Uyar vd.)

Tıp: Biyomedikal teşhis, biyosensörlerin gelişmesine olanak sağlayan en önemli alanlardan biridir. Kanın, iyonların, gazların, enzimlerin ölçümü, hastanın metabolik durumunu analiz etmek için gereklidir. Biyosensörlerin tıp alanındaki en çok kullanılan uygulaması ise şeker hastalığında kandaki glukoz seviyesinin izlenmesi için kullanılan glukoz oksidaz temelli biyosensörlerdir.

Gıda: Gıda alanında biyosensörler, gıda bileşenlerinin kalite kontrolleri ve gıda güvenliği için mikrobiyal ve kimyasal içeriklerin tespiti gibi birçok uygulama alanına

sahiptirler. Bunun yanı sıra gıdalardaki katkı maddelerinin tespiti için de kullanılırlar. Gıdalardaki yabancı maddelerin tayininin (pestisitler, toksitler ve yabancı hormonlar vb.) yanı sıra aroma ve tazelik gibi parametrelerin analizi için de biyosensörler geliştirilmektedir.

Tarım: Biyosensörler, tarım alanlarında, genellikle pestisit, suni gübre, kötü koku ve hayvan hastalıkları ölçümlerinde kullanılmaktadır. Pestisitler, günümüz tarımında kullanılan binlerce organik bileşikten bir gruptur. Yaygın ve bilinçsiz kullanımından dolayı, pestisitler tarımda önemli kimyasal tehlikelerden biridir.

Savunma: Biyosensörler, biyolojik savaş ajanlarının (BSA) tespitinde çok yoğun olarak kullanılır. BSA, 11 Eylül saldırıları sonrası korkulan bir saldırı türü olmaya başlamıştır. BSA'ların tespitinde kullanılan biyoreseptör moleküllerin pek çoğu, ya analitin yüzeyine bağlanan antikor veya BSA'nın genetik materyaline bağlanan nükleik asit türü moleküllerdir. DNA sensörleri çeşitli kimyasal ve biyolojik silahların tayinine yönelik yeni yöntem geliştirme çalışmalarında yer alır.

2.2 Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini ve bu etkileşim sonucunda meydana gelen kimyasal ve fiziksel değişiklikleri inceleyen bilim dalıdır. Bir elektrokimyasal tepkimenin gerçekleşebilmesi için, analiz edilecek maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal olarak dönüşüme uğradığı elektrot sistemi ve bu elektrot sistemindeki elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi gereklidir.

Elektrokimyasal ölçümler, elektrot tepkimelerinin temel ilkeleri ve elektrot-çözelti ara yüzeyinin elektriksel özellikleri ile ilgili uygulamalardır. Kimyasal fazlardan birincisi elektrolit kısım, ikincisi ise elektrot kısmıdır. Elektrot-elektrolit ara yüzeyinin özelliklerinin çalışıldığı sisteme elektrokimyasal hücre adı verilir. Bir elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolitini içeren bir çözeltiye daldırılmış iki veya üç elektrot içerir. Elektrokimyasal yöntemlerde ikili veya üçlü elektrot sistemleri kullanılır. İkili elektrot sistemi bir çalışma ve bir karşıt elektrottan oluşurken, üçlü elektrot

sistemlerinde ilave olarak bir referans elektrot mevcuttur. Elektrokimyasal ölçümler sırasında çalışılan çözeltinin bileşiminden etkilenmeyen ve potansiyeli sabit kalan elektrot, referans elektrottur. Referans elektrot olarak genellikle gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrodu kullanılmaktadır. Karşıt (yardımcı elektrot), kararlı ve sabit bir potansiyel sağlayan elektrottur. Karşıt elektrot olarak genellikle platin ve altın kullanılmaktadır. Yüzeyinde analitin indirgendiği ya da yükseltgendiği, potansiyeli değişen elektrot ise çalışma elektrodudur.

Elektroanalitik yöntemler, hücrenin elektrokimyasal özelliklerinin izlenmesi esasına dayanan elektrokimyasal yöntemlerdir. Elektroanalitik yöntemler bilimsel çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel materyaller, farmasötik maddeler ve biyolojik örnekler gibi numunelere uygulanabilmektedir. Elektroanalitik yöntemler kullanılan çalışma elektroduna göre, uygulanan akımın ve potansiyelin şiddetine göre ya da uygulanan akımın ve potansiyelin sabit veya değişken olmasına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılırlar.

Elektroanalitik yöntemler, ara yüzeyde ya da çözelti ortamının tamamında gerçekleşen değişimlerin incelendiği yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Ara yüzey yöntemlerinde; kimyasal ve fiziksel dönüşümler, elektrot yüzeyi ile çok ince çözelti tabakaları arasında gerçekleşir. Ara yüzeyde gerçekleşen yöntemlerden olan potansiyometri ve voltametri; duyarlılık, seçicilik ve uygulanabilirlik gibi özellikleriyle yaygın bir kullanım alanı bulmuşlardır (Skoog vd. 1998, Wang 2000). Elektroanalitik yöntemlerin en yaygın kullanılanı voltametridir.

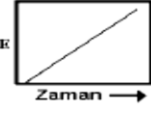
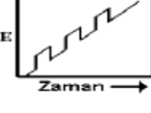
2.2.1 Voltametrik yöntemler

Voltametri, bir çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen elektroanalitik yöntemlere verilen isimdir. Voltametri, Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920' lerin başında geliştirilen ve voltametrimin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametri anorganik, fiziko ve biyokimyacılar tarafından çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve

indirgenme olaylarının incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde oluşan elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi temel çalışmalar için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Heyrovsky 1922).

Voltametri temel olarak; bir elektrokimyasal hücrede, polarize olabilen bir çalışma elektrodu ile referans elektrodu arasına değeri zamanla değiştirilen bir potansiyel uygulanması sonucu ortaya çıkan akımın ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Skoog 2004). Voltametrik yöntemlerin bir kısmında potansiyel sabit tutulur veya çeşitli şekillerde değiştirilerek madde miktarına bağlı olarak oluşan akım miktarı incelenir. Voltametrde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. Voltametri, kimyasal bir reaksiyon sonucunda indirgenebilen veya yükseltgenebilen bir türe dönüşebilen inorganik, organik, iyonik veya moleküler maddelere uygulanabilir. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Voltametrik yöntemlerde, zamanla potansiyelin taranması ve akımın kaydedilmesiyle, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak eşdeğer akımı kaydeden voltamogram adı verilen bir eğri elde edilir.

Voltametrde, çalışma elektrodunun potansiyeli sistematik olarak değiştirilirken akım ölçülür. Elektroda, zamanın bir fonksiyonu olarak çok farklı potansiyellerin uygulanmasıyla oluşan farklı şekillerdeki potansiyel-zaman fonksiyonlarına uyarma sinyali denir. Voltametrde en çok kullanılan uyarma sinyalleri; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır (Karadeniz 2014).

İsim	Dalga Şekli	Voltametrinin tipi
(a) Doğrusal taramalı		POLAROGRAFI HİDRODİNAMİK VOLTAMETRİ
(b) Diferansiyel puls		DİFERANSİYEL PULS POLAROGRAFİSİ
(c) Kare dalga		KARE DALGA VOLTAMETRİSİ
(d) Üçgen		DÖNÜŞÜMLÜ VOLTAMETRİ

Şekil 2.2 Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV): Elektrokimyasal hücreye uygulanan doğru akım potansiyeli zamanın fonksiyonu olarak doğrusal bir şekilde arttırılır. Bu sırada hücrede oluşan akım, zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir ve voltamogram elde edilir.

Dönüşümlü Voltametri (CV): Dönüşümlü voltametri tekniği elektrokimyasal teknikler içinde en yaygın kullanılan tekniktir. Yöntemin, uyarma sinyalinin şeklinden kaynaklanan bir diğer adı da üçgen dalga voltametrisidir. Dönüşümlü voltametri yöntemi özellikle indirgenme- yükseltgenme reaksiyonlarının termodinamiği, elektron aktarımının kinetiği, adsorpsiyon veya difüzyon gibi tutunma ve taşınma olaylarının etkisinin açıklanmasında bilgi verdiği için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Wang 2006). Bu teknikte potansiyel, zamanla doğrusal olarak değiştirilir. Potansiyelin zamanla değişmesi tarama hızı olarak adlandırılır. Potansiyel taraması bir E_1 başlangıç potansiyeli ve E_2 potansiyeli arasında yapılırsa metot doğrusal taramalı voltametri adını alır (LSV). Eğer E_2 potansiyeline ulaşıldıktan sonra aynı tarama hızıyla ilk tarama yönüne göre ters yönde tarama yapılırsa metodun adı dönüşümlü voltametri olur. Bu sırada

elektrot tepkimeleri sonucu ortaya çıkan akım, taranan potansiyele karşı grafiğe geçirilir ve dönüşümlü voltamogram elde edilir. Bir dönüşümlü voltamogramın en önemli parametreleri, katodik pik potansiyeli, anodik pik potansiyeli, katodik pik akımı ve anodik pik akımıdır. Tersinir bir elektrot için anodik ve katodik pik akımları mutlak değerce yaklaşık birbirine eşit, fakat zıt yönlüdür. Pik potansiyellerinin farkı $0,0592/n$ 'dir. Burada n , yarı reaksiyonda yer alan elektron sayısıdır.

Kare Dalga Voltametrisi (KDV/SWV): Kare dalga voltametrisi, hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü taşıyan, puls voltametrisi tekniklerinin en gelişmiş ve en verimli olanıdır. Kare dalga voltametrisinde, potansiyel-zaman dalga şekli simetrik kare dalgalardan oluşur. Kare dalga voltametrisinde akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalganın net akımı $\Delta_i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir ve ileri fark akımı olarak adlandırılır. Δ_i farkı konsantrasyonla doğru orantılı olarak değiştiğinden dolayı kare dalga voltametrisi kantitatif tayinlerde kullanılan bir metottur. Kare dalga voltametrisinde ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini arttırmak mümkündür. Bu metodun tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M arasında olduğundan dolayı bu teknik en hassas ve hızlı elektroanalitik teknikler arasındadır (O'Dea vd. 1981).

Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV): Diferansiyel puls voltametrisi, organik ve anorganik türlerin eser miktarlarının ölçülmesinde son derece kullanışlı bir tekniktir. Diferansiyel puls voltametrisinde, doğrusal bir potansiyel artısına göre ayarlanmış sabit büyüklükte pulslar, çalışma elektroduna belli bir süre uygulanır. İki kez akım ölçülür. İlk ölçüm puls uygulanmadan alınır. İkinci ölçüm ise, pulsun bitmesine yakın bir bölgede alınır. Bu iki akım arasındaki fark, Δ_{ipuls} olarak verilir. Uygulanan potansiyele karşı bu akım farklarının grafiğe geçirilmesiyle diferansiyel puls voltamogramı elde edilir (Wang 2000, Monk 2001). DPV, en çok kullanılan elektroanalitik yöntemlerden biridir. Normal puls voltametrisiyle karşılaştırıldığında; tek bir voltamogramda pek çok analitin belirlenebilmesini sağlaması ve diferansiyel akımla çalışarak voltametrik bir pikin elde edilmesiyle analitik duyarlılığın 5×10^{-8} M 'dan 1×10^{-8} M'a gelişmesi gibi avantajlara sahiptir.

2.3 Perde Baskılı Karbon Elektrotlar (SPE)

Son zamanlarda, elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan perde baskılı elektrotların (SPE), kullanıma hazır ve taşınabilir olması yönünden diğer elektrokimyasal biyosensörlere göre önemi her geçen gün artmaktadır (Viswanathan vd. 2012). Perde baskılı elektrotlar, tek kullanımlık elektrokimyasal sensörlerin üretimi için hızlı bir metottur. SPE, klasik elektrotların yeniden kullanılma sürecinde temizlenmelerinin zor olması ve bellek etkisi gibi problemlerin önüne geçer. Ayrıca, modifiye edilebilme imkanlarının da kolay olmasından dolayı önemli bir uygulama alanı vardır. Ayrıca bu elektrotların kullanımlarının kolay olması, taşınabilir olmaları ve ucuz üretim teknikleri gibi avantajları da bulunduğu için çok tercih edilmektedirler. Perde baskılı elektrotların en önemli avantajı, sadece bir kez kullanımdan dolayı devam eden yüzey problemleri ve yüzey kirlenmesini azaltmasıdır (Lucarelli vd. 2002). SPE'ler son zamanlarda gıda zehirlenmesi, hastalıklar ve çevre kirleticileri için teşhis araçları olarak kullanılmaya başlanmıştır (Afonso vd. 2016). Elektrot yüzeyi, üzerine tutturulmuş olan tanıma elemanına sadece bir destek değil aynı zamanda algılama yüzeyi olarak da görev yapar. Bu nedenle farklı nano malzemeler kullanılarak SPE'nin elektrokimyasal performansını iyileştirebilmek amacıyla çeşitli girişimlerde bulunulmuştur. Bu bakımdan karbon nanotüpler (KNT) (Serafin vd. 2011), altın nano partiküller (Escamilla-Gómez vd. 2009, Tang vd. 2010), grafen (Liu vd. 2011) ve iletken polimerler (Taleat vd. 2014) gibi çeşitli nano malzemeler elektrokimyasal performansı arttırmak için kullanılmaktadır (Ricci vd. 2012).

2.4 İletken Polimerler

İletken polimerler, ana iskelet zincirlerinde zayıf bağlı elektronlar içeren polimerler olarak tanımlanırlar. Metaller ve yarı iletkenlerde doğal olarak var olmayan bazı malzeme özellikleri iletken polimerlerle kazanıldığı için iletken polimerler genellikle sentetik metal veya organik metal olarak da isimlendirilmektedir. İletken polimerleri diğer polimerlerden ayıran temel özellikler, sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan konjuge zincir yapısına sahip olmaları ve yapılarındaki uzun konjuge çift bağlı zincirler nedeniyle iletkenlik özelliğine sahip olmalarıdır.

Son yıllarda, iletken polimerler, elektriksel, termal, çevresel, optik, kimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı bilimsel ve teknolojik alanlarda büyük ilgi görmüştür (Malhotra ve Singhal 2003). Yeni nanomalzemelerin artmasıyla, iletken polimerlere ve/veya bunların bileşiklerine dayanan sayısız elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Polianilin, polipirol, poli (5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole) ve poli (3,4-etilendioksitofen) gibi bazı iletken polimerler, özellikle enzimler, proteinler veya nükleik asitler için immobilize edici bir substrat olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Malhotra vd. 2006). İletken polimer temelli elektrokimyasal sensörler ve biyosensörler, basit hazırlık, hızlı tespit, yüksek hassasiyet ve küçük boyutları nedeniyle halk sağlığı ve çevre ile ilgili çalışmalarda önemli bir rol oynamaktadırlar (Wang 2005, Willner vd. 2011).

Nanopartikül modifiye elektrotların yanısıra, polimer-nanokompozit materyalleri ile elektrotların modifikasyonu son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir (Xiao ve Li 2008, Riskin vd. 2009). Örneğin, AuNPs eklenerek iletken bir polimer olan polipirolün elektrik iletkenliğinin arttığı bildirilmiştir (Maity ve Biswas 2006, Srivastava ve Kotov 2008). Nanopartiküller çoğunlukla polimer kabuğunda birikmeye eğilimli olduklarından, polimer malzemesinin seçimi çok önemlidir. Farklı nanokompozit malzemeler arasında, AuNPs içeren iletken polimerlerin üretimi, üstün optik ve elektrokatalitik özelliklerinden dolayı araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmüştür. (Xiao ve Li 2008, Hatchett ve Josowicz 2008, Riskin vd. 2009).

2.5 Pestisitler

Pestisitler, zirai mücadele araştırma ve uygulamalarında kullanılan kimyasal madde ve preparatlardır. Pestisitler, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da bu organizmaların zararlarını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Pestisit; kimyasal bir madde, virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan, antimikrobik, dezenfektan ya da herhangi bir araç olabilir. Zararlı organizmalar ise, insanların besin kaynaklarına, mal varlıklarına zarar veren, hastalık yayan böcekler, bitki patojenleri, yabani otlar, yumuşakçalar, kuşlar, memeliler, balıklar, solucanlar ve mikroorganizmalardır. Pestisit benzeri maddeler, pestisit gibi kullanılan veya bir kısmı bu kapsama giren

biyopreparatlar, böcek ve bitki gelişim düzenleyicileri, feromonlar (hormon taşıyan) ve diğer cezbediciler, beslenmeyi engelleyiciler, repellentler (böcek uzaklaştırıcı ilaçlar), tuzaklar, bitki aktivatörleri, fizyolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan preparatlardır.

Pestisitler, özellikle tarımsal savaşta hastalıkların, böceklerin, yabancı otların ve diğer zararlıların olumsuz etkilerinden koruyarak verim ve kaliteyi artırır. Pestisitlerin ekonomik bir şekilde üretilmeleri ve kullanım kolaylığı nedeniyle fazla miktarda ve bilinçsiz olarak kullanıldığı bilinmektedir. Mevcut tarım alanlarından yüksek verim sağlamak amacıyla kullanılan pestisitlerin bilinçsiz ve denetimsiz kullanımının insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkileri bulunmaktadır. Son yıllarda atık sularda, toprakta, meyve ve sebzelerde bulunan pestisitlerin kontrolsüz kullanımı insan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmektedir.

Dünya nüfusuna oranla kullanılan tarım ilacı 0,5 kg/birey/yıl ya da 1,4 g/birey/gün olarak belirlenmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde yılda 37000 kanser olgusunun tarım ilaçlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Pestisitlerin uzun dönemde kullanımı kanser, mutasyon, doğumsal şekil bozuklukları gibi ciddi sağlık problemlerine neden olurken, pestisit kalıntılarından doğan gıda alerjilerinin de migren, astım ve egzamaya yol açtığı bildirilmiştir.

Genel olarak zirai ilaç yapımında kullanılan aktif maddeler, bazı yardımcı maddeler ile karıştırılarak kullanılır. Bu karışıma formülasyon adı verilir. Formülasyon uygulamanın amacı daha emniyetli, insan ve çevre sağlığı açısından daha az zararlı ve ekonomik kullanım sağlanmasıdır. Pestisitler saf halde ilaç olarak kullanılmazlar. Özel karışımlar halinde belirli preparat formuna getirilir ve doğrudan veya seyreltilerek ilaç olarak uygulanırlar. Pestisitler; etkili madde, dolgu maddeleri ve diğer yabancı maddeler olmak üzere üç ana maddeden oluşmaktadırlar.

Etkili madde: Pestisit içinde bulunan öldürücü maddedir. Etkili maddelerin bazı önemli özelliklere sahip olması ve bu özelliklerinin de belirtilmiş olması gerekir.

Dolgu maddesi: Herhangi bir kimyasal bileşikle tepkimeye girmeyen, bitkilerde herhangi bir zararlı etkiye sahip olmayan ve etkili maddeyi taşıyan maddelerdir.

Yardımcı diğer maddeler: Pestisitlerin etkinliğini, dayanıklılığını arttıran, pestisitlerin zararlı etkilerini azaltan ve uygulamada kolaylık sağlayan maddelerdir.

Bir formülasyonun Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarında imal edilmesi gerekmektedir. Bunun için WHO metotlarına göre kimyasal analizleri ve fiziksel analizleri yapılır. Pestisit formülasyonları çeşitli fiziksel formlarda hazırlanabilir: emülsiyon konsantre, ıslanabilir toz, su-y yağ emülsiyonu vb.

Toksik özellik gösteren bir maddenin pestisit olarak kullanılabilmesi için aşağıdaki özellikleri taşıması gerekir:

- Biyolojik olarak aktif,
- Etkili,
- Ucuz,
- Güvenilir,
- Kolay uygulanabilen,
- Yeteri kadar kararlı (stabil),
- Kullanıcılar, tüketiciler ve besi hayvanları açısından güvenilir,
- Hedef canlıya spesifik olarak toksik,
- Çevre için kabul edilebilir olmalıdır.

2.5.1 Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitler, görünüş, fiziksel yapı ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı grubu ile bunların biyolojik dönemine göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılırlar (TİSİT).

➤ **Formülasyon şekillerine göre:**

Toz ilaçlar, ıslanabilir toz ilaçlar, suda çözünen toz ilaçlar, kuru tohum ilaçları (DS), solüsyonlar ve kuru çözelti, emülsiyon konsantre ilaçlar, akıcı konsantre ilaçlar, yağlar, tabletler, granüller, pelletler, aerosoller, zehirli yemler, kapsül şeklinde verilmiş formülasyonlar, gübre karışımları, yağ konsantreleri, yağ solüsyonları, gaz halinde olanlar ve diğerleri.

➤ **Kullanma tekniğine göre:**

Doğrudan kullanılanlar ve su veya bir başka çözücü ile seyreltilerek kullanılanlar.

➤ **Etkilediği canlının biyolojik dönemine göre:**

Larva öldüren (larvasit), yumurta öldüren (ovisit), hem yumurta hem larva öldürenler (ovalarvisit) ve erginleri öldürenler.

➤ **Zararlılara etki yollarına göre:**

Mide zehirlileri, değme (kontakt) zehirliler ve solunum zehirlileri.

➤ **Toksik özelliklerine göre:**

Fiziksel zehirliler, protoplazma zehirlileri, sinir sistemi zehirlileri, solunum zehirlileri ve antikoagulanlar.

➤ **Kontrol ettiği zararlıların bulunduğu yere göre:**

Kültür bitkilerindeki zararlılara karşı kullanılanlar, orman zararlılarına karşı kullanılanlar, depodaki ürünlere zarar verenlere karşı kullanılanlar, ev böceklerine karşı kullanılanlar, hastalık vektörlerine karşı kullanılanlar, hayvan ve insanlardaki dış parazitlere karşı kullanılanlar.

➤ **İlacın fiziki haline göre:**

Katı formülasyonlar (toz, granül vb.) ve likit formülasyonlar (yağlar, solüsyonlar vb.).

➤ **Etkiledikleri zararlı gruplarına göre:**

- ✓ Böcekleri öldürenler (İnsektisit)
- ✓ Fungusları (mantarları) öldürenler (Fungusit)
- ✓ Fungusların faaliyetini durduranlar (Fungustatik)
- ✓ Yabancı otları öldürenler (Herbisit)
- ✓ Örümcekleri öldürenler (Akarisit)
- ✓ Bakterileri öldürenler (Bakterisit)
- ✓ Yaprak bitlerini öldürenler (Afisit)
- ✓ Kemirgenleri öldürenler (Rodentisit)
- ✓ Nematodları öldürenler (Nematosit)
- ✓ Salyangozları öldürenler (Mollussisit)
- ✓ Algleri öldürenler (Algisit)
- ✓ Kuşları öldüren veya kaçırınlar (Auensit)
- ✓ Kaçırıcılar (Repellent)

➤ **Bileşimindeki etkili madde grubuna göre:**

Başlıca pestisit grupları organoklorlular, organofosfatlar, karbamatlar ve piretiroidlerdir (<http://www.megep.web.gov.tr>).

Organoklorlu Pestisitler: Organik klorlular; yapılarında, karbon, hidrojen ve klor atomları bulunduran basit bir kimyasal sınıfı oluşturur. Aldrin, dieldrin, heptachlor, endosulfan, lindane, endrin bu gruba örnek verilebilir. 1940'lı yıllarda böcek öldürücü olarak kullanıma giren bu ilaçlar günümüzde önemini kaybetmiştir. Organoklorlu pestisitler besin zinciri ile insana kadar ulaşırlar. Temas ve solunum yolu ile etkilidirler. Bu sınıfın üyelerinin çok güçlü temas ve mide zehri etkileri yanında, solunum organlarına etkileri de söz konusu olabilir, sistemik özellikleri ise bulunmaz. Genel olarak gaz kromatografisi ile analiz edilirler. Çevreye verdikleri zararlar nedeniyle bu grubun üyelerinin kullanımı yasaklanmaktadır.

Organofosfat Pestisitleri: Organofosfatlar, fosfor içeren asitlerin ester, tiol ester veya anhidrit türevleri olup tarımda, evlerde, bahçelerde ve veterinerlikte kullanılmaktadır.

Organofosfatlara örnek olarak malation, paration, diazinon, forat, terbufos, fentiyon ve klorprifos gibi insektisitler; soman, sarin ve tabun gibi sinir gazları; göz tedavisinde kullanılan ekotiofat ve izoflurofat ile parazitlere karşı kullanılan triklorfon sayılabilir. Organofosfatlar sinir sistemi üzerinde etki gösteren kimyasallardır. Asetilkolinesteraz inhibitörüdürler. Organofosfatların etki mekanizması asetilkolinesteraz enziminin baskılanmasına dayanır. Yapılarına bağlı olarak gaz kromatografisi ya da sıvı kromatografisi ile analiz edilebilirler. Temas, sindirim ve solunum yolu ile etkilerini gösterirler. Bu grup insektisitler, ergin, larva dönemlerini kontrol ederler.

Karbamatlı Pesticitler: Karbamik asit esterleri olan bu grup insektisitler organofosforlu insektisitlere göre daha küçük bir sınıf oluşturur. Calabar fasulyesinden sentezi yapılarak Neostigmine ya da kimyasal olarak N,N-dimethyl carbamate olarak isimlendirilir. Aldicarb, carbaryl, carbofuran, methiocarb, methomyl, oxamyl, pirimicarb bu gruba örnek verilebilir. Kimyasal olarak asetilkolinesteraz enzimine bağlanır. Aynı enzimi engellemelerine rağmen, bunu organofosforlu insektisitlere göre farklı bir şekilde yaparlar. Yapısal özelliklerinden dolayı gaz kromatografisi ile analizleri zordur, genel olarak sıvı kromatografisi ile analiz edilirler.

Piretroit Grubu Pesticitler: Bu grup kimyasallar uzun süredir bilinmesine rağmen son yıllarda çok önem kazanmıştır. Piretroitler, chrysanthemum çiçeklerinden elde edilen doğal bileşikler olan piretrinlerin sentetik analoglarıdır. Piretrinlere oranla ışığa karşı duyarlılıkları oldukça azaltılmış, dayanıklılıkları artırılmış bileşiklerdir. Piretrinler ve piretroitler, genellikle sinerjistik etki yaratmak üzere birlikte kullanılırlar. Sinir hücrelerini bloke ederek zehirlilik etkisini gösterirler. Sıcakkanlılara karşı toksik etkisi çok düşüktür. Memeli vücudunda birikmeden dışarı atılır. Doğada kolayca parçalanabilirler.

2.5.2 Pesticitlerin kullanım alanları

Pesticitlerin başlıca kullanım alanları şunlardır:

- Tarımsal üretim
- Bahçecilik
- Balık yetiştiriciliği

- Ormancılık
- Süs amaçlı bölgelerde (parklar, bahçeler, oyun alanları)
- Tütsüleme ve kereste korumacılığı
- Endüstriyel böcek kontrolü
- İnşaat (duvar kağıdı yapıştırıcıları, boyalar, sıvacılık vb.)
- Ev ve bahçeler
- Deniz böcek kontrolü
- Gıda saklanması
- Hayvancılık
- Toplum hijyeni, böcek kontrolü
- Beşeri ilaç olarak

2.5.3 Pestisitlerin insanlar ve çevre üzerine etkileri

Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Pestisitler hedef olmayan organizmaya çeşitli yollarla girmekte ve organizmada sinir sistemi, endokrin sistemi, bağışıklık sistemi, karaciğer, kas, kalp, kan, boşaltım ve diğer sistemleri etkileyebilmektedir. Pestisitler de dahil olmak üzere tüm kimyasalların insan vücuduna girişi ağız, solunum ve deri yoluyla olmaktadır.

Kimyasal maddeler, organizmaya girdikten sonra enzimler aracılığı ile reaksiyona girer ve maddelerin yapıları değişir. Canlılarda çeşitli reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan bileşiklere metabolit adı verilir. Oluşan metabolitler dışarı atılabilir veya depolanabilir. Vücuda alınan kimyasallar değişik organlarda toksik etki oluşturabilir. Toksisiteyi belirleyen önemli faktörler doz, kimyasalın özelliği ve birey duyarlılığıdır. Genel olarak düşük dozlarda toksisite görülmemesine rağmen doz arttıkça toksisite de artar. Her kimyasalın toksik özelliği farklıdır. Bazıları oldukça yüksek dozlarda güvenilir iken bazıları çok küçük dozlarda bile çok tehlikeli olabilir. Bazı kimyasallar metabolizma sırasında değişime uğramaz. Klorlandırılmış hidrokarbonlar bu kimyasallara örnektir. Bazı kimyasallar ise kolaylıkla metabolize olur ve vücutta hasar oluşturmadan dışarı atılır. Organofosfatlıların düşük dozları buna örnektir.

Pestisitlerin Çevre Üzerine Etkileri

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler havaya, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisitın çevredeki hareketlerini onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon tipi, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir.

Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilirler. Eğim, bitki örtüsü, formülasyon, toprak tipi ve yağış miktarına bağlı olarak taşınan pestisitler, bu sularda balık ve diğer omurgasız su organizmalarının ölmesine; bu organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların gıda zincirine girmesi ve kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına neden olurlar.

Toprağa geçen pestisitler güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal degradasyona; bitki, toprak mikroorganizmaları ve diğer organizmaların etkisiyle biyolojik degradasyona uğramakta; toprak katı maddeleri (kil ve organik madde) tarafından adsorlanıp desorplanmakta veya kimyasal degradasyona uğramaktadırlar. Toprak içine geçmiş pestisitler kapiller su vasıtasıyla toprak yüzeyine taşınmakta ve buradan havaya karışabilmektedir. Toprağın yapısı, kil tipi ve miktarı, organik madde içeriği, demir ve alüminyum oksit içeriği, pH'sı ve toprakta var olan baskın mikroorganizma türleri tüm bu olayları etkileyen faktörlerdir. Pestisitın çeşitli şekillerde degradasyonu ile pestisit, ya toksik özelliğini kaybetmekte ya da daha toksik metabolitlerine dönüşebilmektedir. Pestisitın kendisinin ya da toksik dönüşüm ürünlerinin hedef olmayan organizmalara bulaşması istenmediğinden tüm bu olayların bilinmesi ve incelenmesi büyük önem taşımaktadır (<http://www.megep.web.gov.tr>).

2.5.4 Pestisit analizlerinde kullanılan yöntemler

Pestisitler, gıda maddelerinin üretimi, tüketimi, depolanmaları esnasında gıdalara zarar veren mikroorganizma ve zararlıları uzaklaştırmak veya yok etmek amacıyla kullanılan kimyasal ya da biyolojik ürünlerdir. Pestisitlerin yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Bu nedenle, atık sularda, meyve ve sebzelerde pestisitlerin tayini, sağlık ve gıda güvenliği ile ilgili sorunların bilinmesi ve önüne geçilebilmesi bakımından oldukça önemlidir (Çetinkaya-Acar 2015).

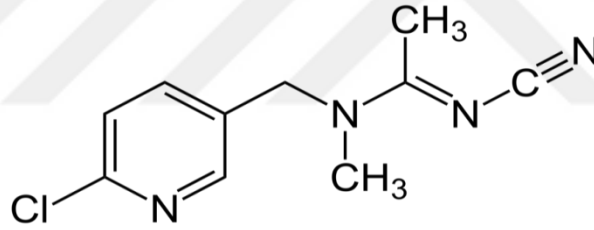
Pestisitlerin analizi için florimetri (Moye ve Wade 1976, Matveeva vd. 1997, Coly ve Aaron 1998a, 1998b), kapiler elektroforez (Tomita vd. 1992, Picó vd. 2003), spektrofotometri (Shivhare ve Gupta 1991; Jain vd. 1993), kütle spektroskopisi (Leandro vd. 2006) ve gaz ya da sıvı kromatografisi (McGarvey 1993, Castro vd. 2000, Corasaniti ve Nisticò 1993) gibi çeşitli analitik yöntemler kullanılmıştır. Ancak bu tekniklerin sadece laboratuvar ortamında kullanılmaları, zaman alıcı ve pahalı olmaları, yüksek eğitimli teknisyenler gerektirmeleri, çeşitli ön işlem ve yıkama aşamalarının zaman alması ve aynı anda çoklu analiz yapamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. gibi bazı dezavantajları vardır (Mulchandani vd. 2001). Son yıllarda, pestisitlerin analizi için elektrokimyasal cihazların uygulanmasına dayalı olan bilimsel çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir. Bu çalışmaların amacı, pestisitlerin hızlı ve çabuk tayininde kullanılacak hassas, düşük maliyetli ve seçici yöntemlerin geliştirilmesidir (Tapsoba vd. 2009, Tcheumi vd. 2010). Bu nedenle, çevredeki ve gıda atıklarındaki pestisitlerin tayininde biyosensörlerin kullanılması, kısa analiz süresi, yüksek hassasiyet ve yerinde tayin gibi avantajlarından dolayı oldukça ilgi gören bir alandır. (Parham ve Rahbar 2010, Tcheumi vd. 2010). Enzimlerin saflaştırılması, enzim stabilizasyonu ve immobilizasyon yöntemleri konusundaki ilerlemeler biyosensörlerde cevaplama hızının artması, analiz süresinin azalması gibi katkılar sağlamaktadır. Son yıllarda sebze, meyve ve atık sularda pestisit kalıntılarının belirlenmesi çeşitli biyosensörler tarafından gerçekleştirilmiştir (Cesarino vd. 2012, Dou vd. 2012, Kesik vd. 2014).

2.6 Asetamiprit

Pestisitler, modern tarım uygulamalarında zararlı organizmaların sebep olduğu kayıpları en aza indirmek ve gıdaların besin değerini arttırmak için kullanılmakta ve modern bitki yönetim uygulamalarının vazgeçilmez bir bileşeni olarak kabul edilmektedirler. Son yıllarda, organofosfatlar, piretroitler ve neonikotinoidlerin çeşitli sınıfları da dahil olmak üzere birçok pestisit türü bitkileri böcek istilasından korumak amacıyla kullanılmıştır (Weerathunge vd. 2014; Kumar vd. 2015). Neonikotinoidler, özellikle bitki özleriyle ve tahıl kökleriyle beslenen zararlıları kontrol altına almak için son 20 yıldır yaygın olarak kullanılan ve kimyasal olarak nikotine benzeyen nöroaktif insektisitlerin bir alt sınıfıdır. Neonikotinoidler, böceklerin merkezi sinir sistemine etki eden bir insektisit sınıfıdır. Bunlar, sinirlerin uyarılmasında rol oynayan nikotinik asetilkoline bağlanarak nihai felç ve ölüme neden olurlar. Organofosfat ve karbamat insektisitleri ile karşılaştırıldıklarında neonikotinoidler, kuşlarda ve memelilerde böceklerden daha az toksisiteye neden olmaktadır. Neonikotinoid sınıfı, asetamiprit, klotiyanidin, imidacloprid, nitenpiram, nithiazine, tiyakloprid ve thiamethoxam pestisitlerini içermektedir (Yamamoto ve Casida 1999)

Asetamiprit (N-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N'-cyano-N-methyl-acetamidine), nikotinin sentetik türevi olan ve neonikotinoid sınıfına ait nöroaktif bir pestisit türüdür. Asetamiprit, düşük toksisitesi ve yüksek insektisit aktivitesinden dolayı tarım ve bahçe uygulamalarında çeşitli böcekleri ve zararlı organizmaları kontrol altına almak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Jeschke vd. 2011). Tarımsal ürünlerde ve toprakta biriken ve atık sulara salınan asetamiprit kalıntıları kirlenmiş çevreye maruz kalan insanlarda potansiyel sağlık riskine neden olmaktadır (Imamura vd. 2010, Ragas vd. 2011). Asetamiprit, kirlenmiş ortama maruz kalan insanlarda potansiyel risk oluşturan yüksek toksisiteye sahiptir. Kanserojen olmayan bir madde olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen memeliler için toksik hatta kronik etki gösterdiği bilinmektedir (Ragas vd. 2011). Pestisitler, böceklerin sinir iletimi seviyesinde kuvvetli agonist olarak görev alır ve postsinaptik membranlardaki reseptörleri bloke ederek felce ya da ölüme neden olur. Kontamine organizmalarda felç ve ölüme neden olan nikotinik asetilkolin reseptörü agonisti olarak görev yapar (Matsuda vd. 2001). Yaygın kullanımı nedeniyle,

insan sağlığı için potansiyel riski önlemek amacıyla gıda örneklerindeki asetamipritin tayini için güvenilir ve etkili bir analitik yöntem geliştirmek önemli bir hedef haline gelmiştir. Neonikotinoid pestisitlerinin tayini, HPLC, GC, GC-MS gibi kromatografik yöntemlere dayanan geleneksel enstrümental teknikler ile yapılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerin zaman alıcı immobilizasyon işlemleri, çaba gerektiren sentetik işlemler, gelişmiş donanıma ihtiyaç duyma, örnek hazırlama aşamalarının çok adımlı olması ve iyi eğitimi teknisyenler gerektirmeleri gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (Amelin ve Andoralov 2016). Bu nedenle, evre ve tarımsal ürünlerde asetamiprit tayini için basit, hızlı, pratik ve duyarlı bir yöntem geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda, pestisit analizleri için ucuz ve kolay bir yaklaşım sunan elektrokimyasal biyosensör sistemleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin spesifikliğini ve kimyasal kararlılığını arttırmak için, molekül baskılanmış polimerler (Altıntaş vd. 2015; Martn-Esteban 2016) ve aptamerler (Sharma vd. 2015) gibi sentetik reseptörler başarılı bir şekilde kullanılmıştır.



şekil 2.3 Asetamipritin kimyasal yapısı

2.7 Aptamerler

Aptamerler, kendilerine özgü özellikler taşıyan, nükleik asit dizi kütüphanelerinden SELEX (Systematic Evolution of Ligands By Exponential Enrichment) yöntemi ile rastgele bir şekilde seçilip *in vitro* olarak sentezlenen (Ellington ve Szostak 1990, Tuerk ve Gold 1990) ve belirgin üç boyutlu yapılarıyla hedef moleküllere yüksek afinite ve seçicilikle bağlanma yeteneğine sahip tek sarmal yapıda DNA ya da RNA oligonkleotitleridir (Mairal vd. 2014). Belirli bir aptamer, nükleik asitlerin lineer bir sekansı (A,T veya U, C, G) olarak tanımlanabilir. Aptamerler kararlı moleküller olup, her türlü olumsuz evre koşullarına karşı kendilerine has özelliklerini koruyabilirler.

Tedavide, analizlerde ve diagnostik uygulamalarda kullanılabilecek moleküllerdir (Tombelli vd. 2005, McKeague vd. 2011). Aptamerler, 1990 yılında SELEX yöntemi olarak bilinen, in vitro olarak dizi havuzundan rastgele bir şekilde seçilip çoğaltılması tekniği ile keşfedilmişlerdir (Ellington ve Szostak 1990).

Aptamer temelli biyosensörlerin antikor ve enzim temelli olanlara göre birçok avantajı vardır. Bunlar;

- Hedef moleküle karşı yüksek özgüllükte ve afinitededirler,
- Yüksek miktarda ve saflıkta ucuz bir şekilde sentezlenebilir ve modifiye edilebilirler,
- DNA aptamerleri çoğunlukla yüksek düzeyde kararlıdır,
- Antikorlar gibi çevre koşullarından (sıcaklık ve pH) kolay etkilenmezler ve oldukça dayanıklıdır.
- Bir immun yanıt oluşturmazlar ve kontaminasyon riskleri düşüktür,
- Antikora göre daha küçük moleküller olduklarından, antikorların ulaşamadığı hedeflere bağlanabilirler.

Bu avantajları nedeniyle aptamerler, proteinler (Lin vd. 2006), küçük moleküller (Kim vd. 2007), metal iyonları (Wang vd. 2006) ve tam hücreler (Wang vd. 2010) gibi hedef moleküllerin duyarlı ve seçici tayini için tanıma elementleri olarak kullanılmaktadır. Yapısal olarak kolay modifiye edilebilme, sentezlerinin kolay olması, suda yüksek çözünürlük, biyoyumluluk ve kabul edilebilir düzeyde kararlılık gibi özelliklerinden dolayı aptamerler önemli moleküler tanımlama araçlarından bir tanesi haline gelmiştir (Centi vd. 2008) ve floresans (Ozaki vd. 2006) kemilüminesans (Li vd. 2007), elektrokemilüminesans (Fang vd. 2008), kalorimetri (Yang vd. 2015) ve elektrokimya (Fan vd. 2013; Schoukroun-Barnes vd. 2014) gibi çeşitli platformlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Biyolojik tanıma elemanı olarak aptamerlerin kullanıldığı biyosensörlere aptasensörler adı verilmektedir. Elektrot yüzeyinde immobilize aptamerin hedef moleküle seçici bir şekilde bağlanmasına dayanan aptasensörler, hedef molekülün tayini için gelecek vaat eden bir yöntem olarak görülmektedir (Bonanni vd. 2012). Günümüzde giderek yaygın

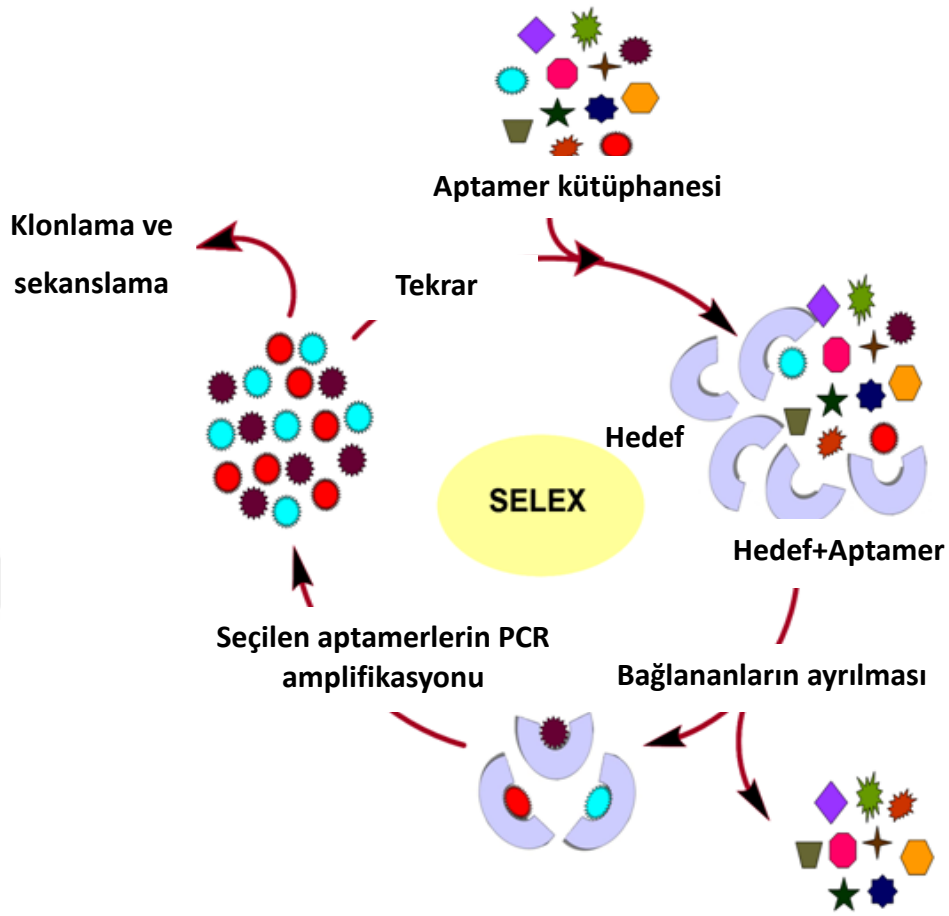
hale gelmeye başlayan aptasensörler basit dizaynları, hızlı cevap süreleri, düşük maliyetleri ve yüksek hassasiyetleri ile gıda üretiminde kalite ve güvenliğin izlenmesinde ve klinik uygulamalarda hastalıkların teşhisinde önemli bir rol oynamaktadır (McKeague vd. 2011).

2.7.1 SELEX yöntemi

In vitro seçim olarak da adlandırılan SELEX yöntemi, hedef moleküle spesifik olarak bağlanan tek sarmal DNA ya da RNA oligonükleotitlerinin üretimi için moleküler biyolojide kullanılan birleştirici kimyasal bir yöntemdir (Ellington ve Szostak 1990).

SELEX yöntemi farklı diziler içeren çok sayıda sentetik DNA parçasından oluşan DNA kütüphanesinin seçimiyle başlar. SELEX tekniği, ilgili DNA dizisinin seçimi (bağlanma, bölme ve uzaklaştırma), amplifikasyonu ve ayrılmasını içeren ardışık basamakların tekrarlanmasıyla karakterize edilir. Genel olarak, yüksek afiniteli aptamerlerin seçilmesi için 6-20 SELEX turu gereklidir. Daha sonra zenginleşmiş aptamer havuzu klonlanır ve ilgili aptamerler karakterize edilir (He vd. 2011).

İşlem, primerler olarak görev yapan sabit 3' ve 5' uçları tarafından sınırlandırılmış sabit uzunluktaki rastgele üretilmiş dizileri içeren geniş bir oligonükleotit kütüphanesinin sentezi ile başlar. "n" uzunluğunda rastgele oluşturulmuş bir bölge için, kitaplıktaki muhtemel dizilerin sayısı 4^n 'dir (n, her pozisyonda dört olasılıklı (A, T, C, G) pozisyon sayısıdır). Kütüphanedeki diziler, protein ya da küçük bir organik bileşik olabilen hedef molekül ile etkileştirilir. Hedef moleküle bağlanmayanlar ortamdan uzaklaştırılır ve bu işlem için genellikle afinite kromatografisi kullanılır. Bağlanan diziler çözücülerle birbirlerinden ayrılır ve en etkin bağlanan dizileri belirlemek için uygun elüsyon koşulları geliştirilerek daha sonraki sıkılığının artırıldığı sonraki seçme turlarına hazırlanmak için PCR ile çoğaltılır. Orijinal yöntem üzerindeki ilerleme, bir RNA kütüphanesinin, yalnızca rastgele bölge tarafından oluşturulduğunda kararsız olan ikincil yapıları stabilize ettiği seçim işlemi sonrasında uzaklaştırılması zor olabilen sabit primer bölgelerini ihmal etmesine olanak sağlar (Jarosch vd. 2006).



Şekil 2.4 SELEX yönteminin genel şeması

SELEX yöntemi, ATP ve adenozin gibi küçük moleküller ve proteinler dahil olmak üzere hedef moleküllere karşı oldukça yüksek bağlanma afinitesine sahip olan aptamerleri geliştirmek için kullanılmıştır (Huizenga ve Szostak 1995, Mercey vd. 2006). Ayrıca, oldukça spesifik katalitik DNA elde etmek ve tümör hücreleri gibi kompleks moleküller için yüksek afiniteli aptamerleri seçmek için de SELEX yöntemi kullanılmıştır.

2.8 Kaynak Özetleri

2.8.1 Aptamer temelli biyosensörler ile ilgili kaynak özetleri

Degefa vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, elektrokimyasal trombin tayini enzimatik olarak gümüşün biriktirilmesine dayanarak yapılmıştır. Altın elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tekli tabakalar şeklinde biriktirilen tiyol fonksiyonlu aptamer, trombin ile etkileştirildikten sonra biyotinlenmiş trombin bağlayan başka bir aptamer ile sandviç yöntemine göre etkileştirilmiştir. Ardından biyotin-avidin spesifik etkileşiminden yararlanılarak, avidin-alkalen fosfataz (Av-ALP) konjugatı elektroaktif olmayan p-aminofenil fosfatı (p-APP) elektroaktif bir madde olan p-aminofenole (p-AP) enzimatik olarak dönüştürmüş ve bu sırada ortamdaki gümüş iyonları elektrot yüzeyinde metalik gümüşe indirgenmiştir. Sonuç olarak trombin tayini 0,1 nM ile 1 µM aralığında gerçekleştirilmiştir.

Zhou vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, çok duvarlı karbon nanotüp kullanılarak bir elektrokimyasal tetrasiklin (TET) aptasensörü geliştirilmiştir. Anti-TET aptameri immobilize edilerek aptasensör oluşturulmuştur. Camsı karbon elektrot üzerine MWCNT damlatılmış ve aptasensörün yapım aşamalarından her biri dönüşümlü voltametri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, modifiye elektrot yüzeyinde anti-TET/TET komplekslerinin oluşması nedeniyle $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çiftinin pik akımlarının azaldığını göstermiştir. MWCNT'lerin yükleme miktarının optimizasyonu, aptamerin inkübasyon koşulları ve TET'in tayin süresi araştırılmıştır. Optimize şartlar altında, DPV ile elde edilen pik akım değişikliklerinin, 0,995'lik bir doğrusal katsayı ile 1×10^{-8} M ila 5×10^{-5} M aralığında artan TET konsantrasyonları ile doğrusal olarak arttığı bildirilmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal aptasensörün, 5×10^{-9} M'lik bir tayin sınırına sahip olduğu ve süt örneklerindeki TET'in belirlenmesinde başarıyla uygulandığı belirtilmiştir.

Bai vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, subnanomolar trombinin gerçek zamanlı tayini için hassas ve seçici bir aptamer/trombin/aptamer-AuNPs sandviç yöntemine dayanan gelişmiş yüzey plasmon rezonans (SPR) sensörü geliştirilmiştir. Bu protokolde, bir thiol-modifiyeli trombin aptameri (TBA29), Au-S bağlanması yoluyla altın nanopartiküllere immobilize edilmiştir. Diğer biyotinlenmiş trombin aptameri (TBA15), biyotin-streptavidin tanıma yoluyla streptavidin ile muamele edilmiş olan SPR altın film üzerine aşılmiştir. Trombin varlığı, SPR altın filmi üzerinde bir çift aptamer sandviç yapısının oluşumuna ve SPR sinyalinin, trombin konsantrasyonu ile orantılı olarak belirgin bir şekilde artmasına neden olmuştur. SPR sinyalinin 0,1-75 nM aralığında trombin konsantrasyonu ile iyi bir doğrusal ilişki gösterdiği ve trombin için tayin sınırının 0,1 nM olduğu bildirilmiştir. Aptamer ile işlevselleştirilen AuNP'lerin SPR yanıt sinyalini arttırdığı ve tayin sınırının 4 kat ve 5 kat arttığı bulunmuştur. Geliştirilen sensörün BSA ve lizozim gibi diğer proteinlerden etkilenmeden trombin için iyi seçicilik gösterdiği ve seyreltilmiş insan serum örneklerinde trombin analizine başarılı bir şekilde uygulandığı bildirilmiştir.

Bala vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada yaygın olarak kullanılan ve aşırı derecede toksik olan organofosforlu pestisit türü olan phoratin tayini için son derece basit ve hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde, tanıma elementi olarak pestisite spesifik bir aptamer ve optik sensör olarak altın nanopartiküller kullanılmıştır. Aptamer, rastgele sarmal yapısından dolayı altın nanopartikülleri bağlarken kararlılık sağlamış ve böylece nanopartiküllerin iyi dağılmış halde kalmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, hedef pestisit ilavesi üzerine, aptamer altın nanopartiküllerinin bir araya getirilmesine neden olan katı bir konformasyona sahip olmuştur. Sonuç olarak, enzimatik reaksiyon sonucu çözeltinin rengi kırmızıdan maviye dönmüş ve spektrofotometrik olarak miktar tayini yapılmıştır. Önerilen yöntemin 0,01 nM ila 1,3 µM konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu ve tayin sınırının da 0,01 nM olduğu belirtilmiştir.

Bala vd. (2016) tarafından malathion tayini için katyonik polimer ve altın nanopartiküllere dayanan ultrasonik aptamer biyosensörü hazırlanmıştır. Bu çalışmada, organofosfor pestisiti olan malathion için, modifiye edilmemiş altın nanopartikülleri, aptameri ve pozitif yüklü, suda çözünür bir polielektrolit olan

Polydialildimetilamonyum klorürü (PDDA) kullanan yeni bir algılama stratejisi geliştirilmiştir. PDDA, aptamer ile bağlantılı olduğu zaman altın nanopartiküllerin toplanmasını önler, aptamere spesifik olan pestisit çözeltiye ilave edildiğinde böyle bir inhibisyon gözlenmez ve böylece çözeltinin rengini kırmızıdan maviye dönüştürür. Önerilen yöntemin 0,5-1000 pM konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu ve tayin sınırının 0,06 pM olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, önerilen yöntemin, diğer girişim yapan maddelerin varlığında malathionu seçici olarak tanımladığı ve böylece, malathionun hızlı taranması için gerçek örneklerle uygulanabileceği bildirilmiştir.

Liu vd. (2016) tarafından yapılan çalışma sonucunda yeni bir sandviç tipi elektrokimyasal aptasensör üretilmiş ve bir antibiyotik olan oksitetrasiklinin (OTC) hassas ve seçici tayini için kullanılmıştır. Bu sensör sinyal amplifikasyonu olarak grafen-üç boyutlu nanoyapı altın nanokompozit (GR-3D-Au) ve aptamer-AuNPs-horseradish peroksidaz (aptamer-AuNPs-HRP) nanoprobalarına dayandırılmıştır. İlk olarak, GR-3D Au filmi, biyolojik moleküllerin elektron transferini ve yükleme kapasitesini arttıran katodik potansiyellerde grafit oksit (GO) ve HAuCl_4 ile tek adımlı elektrokimyasal indirgeme ile camı karbon elektrot üzerine modifiye edilmiştir. Böylece aptamer ve HRP modifiye Au nanopartiküllerinin, OTC için yüksek afiniteli spesifiklik ve hassas elektrokimyasal prob olmaları sağlanmıştır. Optimize şartlar altında, pik akımının $4,98 \times 10^{-10} \text{ gL}^{-1}$ 'lik bir tayin sınırı ile $5 \times 10^{-10} - 2 \times 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$ aralığında OTC konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, bu aptasensörün sentetik numunelerde iyi geri kazanım gösterme, spesifiklik ve hassasiyetinin iyi olduğu görülmüştür. Geliştirilmiş sandviç tipi elektrokimyasal aptasensörün OTC tayini ve ilgili gıda güvenliği analizi ve klinik teşhis için yararlı ve pratik bir araç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Beiranvand vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, altın-platin nanopartiküller, karbon nanotüpler ve akriflavin platformu kullanılarak aptamer temelli elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada, yeni bir sinyal amplifikasyon stratejisine dayanılarak Bisfenol A'nın (BPA) kantitatif tayini için ultra-duyarlı elektrokimyasal bir aptasensör üretilmiştir. Bu aptasensör, yükseltgenmiş karbon nanotüpler (CNT-COOH) ile modifiye edilmiş camı karbon (GC) elektrot üzerine altın-platin nanopartiküllerin

(Au-PtNPs) elektrodepolanması ile geliştirilmiştir. Bu yöntemde, akriflavin (ACF), Au-PtNPs/CNTs COOH nanokompoziti ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Modifiye edilmiş elektrodun yüzeyine BPA-aptamerin bağlanması, ACF'nin amino grubu ile 5' ucundaki aptamerin fosfat grubu arasındaki fosforamidat bağlarının oluşturulması yoluyla gerçekleştirilmiştir. BPA'nın aptamer ile etkileşimi sonucunda meydana gelen aptamerdeki konformasyon değişimi, bir prob olarak ACF'nin ara yüzey elektron transferini geciktirmesine yol açmıştır. BPA'nın duyarlı kantitatif tayini, BPA konsantrasyonunun artmasıyla ACF pik akımının diferansiyel puls voltametri yanıtlarındaki azalmanın izlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen aptasensör, iyi spesifiklik, iyi kararlılık ve tekrarlanabilirlik göstermiştir ve bu durum, mevcut stratejinin geniş potansiyel uygulaması için umut vaat ettiğini göstermektedir.

Jo vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, akut miyokard infarktüsü (AMI) için gelecek vaat eden biyolojik belirteçlerden biri olan kardiyak troponin I'in (cTnI) tayini için kronoamperometri kullanılarak sandviç aptamer temelli perde baskılı karbon elektrot (SPCE) geliştirilmiştir. Tek kullanımlık üç elektrotlu SPCE'ler bir ekran yazıcısı kullanılarak üretilmiş ve altın nanopartiküllerin elektrodepolanması ve iletken polimerlerin elektropolimerizasyonu gibi çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Yalın elektrottan aptamer immobilize SPCE'ye olan kadar tüm işlemler izlenmiş ve dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi gibi çeşitli teknikler kullanılarak analiz edilmiştir. cTnI'nın miktar ölçümü, hidrazin ve H₂O₂ arasındaki katalitik reaksiyondan gelen amperometrik sinyallere dayanarak gerçekleştirilmiştir. Bir tamponda ve ayrıca serum eklenmiş bir çözeltide üretilen aptasensör, 1-100 pM'lık (0,024-2,4 ng/mL) bir dinamik aralık ve 1 pM'lık (24 pg/mL) bir tayin sınırıyla mükemmel analitik performans göstermiştir. Ayrıca, geliştirilen sensörün cTnI'ye karşı diğer proteinlere göre daha yüksek duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir.

2.8.2 Asetamiprit tayinine yönelik yapılan çalışmalar

Antikorlara alternatif olarak, aptamerler pestisit tayini için analitik araçlar olarak büyük bir potansiyele sahiptir. He vd. (He vd. 2011) yaptıkları çalışmada, asetamipriti hedefleyen aptamerleri SELEX yöntemi ile seçmişlerdir. Tekrarlanan seçimin 18 turundan sonra, ssDNA havuzu zenginleştirilmiş ve daha sonra 14 sekans seçilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ayrışma sabitinin (K_d) 4,98 μ M olduğu tahmin edilen, asetamiprite spesifik bir aptamer başarıyla elde edilmiştir.

Fan vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, asetamiprit tayini için aptamer aracılı bir EIS temelli elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada, AuNPs, hazırlanan aptasensörün duyarlılığını arttırmak için altın elektrot yüzeyinde dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak biriktirilmiştir. Elektrot yüzeyindeki AuNPs üzerinde bulunan aptamer dizisinin yapısı asetamiprit ilavesi ile değişmiş ve elektron transfer direnci (R_{et}) artmıştır. Doğrusal çalışma aralığı 5-600 nM arasında bulunmuş ve alt tayin sınırı da 1 nM olarak rapor edilmiştir. Asetamiprit ile aptamer arasında oluşan kompleks için ayrışma sabiti diferansiyel kapasitansın Langmuir izoterm olduğu varsayılarak 23,41 nM olarak hesaplanmış ve böylece asetamiprit ile aptamer arasındaki güçlü etkileşim olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, geliştirilen aptasensörler ile asetamiprit tayini atık su ve domates gibi gerçek numunelerde yapılmıştır. Ancak çalışmada yöntem olarak impedimetri kullanıldığından geniş bir çalışma aralığı ve yüksek hassasiyet elde edilememiştir.

Shi vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, toprak örneklerinde asetamipritin aptamer temelli kalorimetrik tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışmada asetamiprit tayini Au nanopartikülleriyle agregasyon sonucunda renk değişiminin izlenmesi prensibine dayandırılmıştır. Asetamiprit için doğrusal çalışma aralığı 75 nM ile 7,5 μ M olarak elde edilmiş ve gözlenebilme sınırı ise 5 nM olarak belirlenmiştir. Yapılan Circular Dichromism (CD) çalışmalarında asetamiprit ile aptamer arasındaki spesifik etkileşimin mekanizması, asetamipriti bağlayan aptamerin konformasyonel değişimi ile rastgele halka yapısından saç tokası yapısına geçmesi olarak belirlenmiştir.

Yang vd. (2015) tarafından hemin fonksiyonlu indirgenmiş grafen oksit (hemin-rGO) kompozitler kullanarak asetamipritin kalorimetrik tayini için kolay bir aptasensör geliştirilmiştir. Hazırlanan hemin-rGO kompozitleri, rGO'nun aptamerleri fiziksel olarak adsorbe etme kabiliyetine ve H₂O₂ varlığında heminin 3,3',5,5'-tetrametilbenzidini (TMB) kataliz edebilen peroksidaz benzeri aktivitesine sahiptir. İyi dağılmış hemin-rGO kompozitleri tamamen uygun tuz konsantrasyonunda pıhtılaşmıştır. Ancak, bol miktarda aptamer yüzeye adsorbe edildiğinde bağlanmış negatif yüklü DNA omurgası, bireysel hemin-rGO elektrostatik itme oranını arttırdığı için hemin-rGO'nun pıhtılaşması kaybolmuştur. Tayin aşamasında, farklı konsantrasyonlara sahip asetamiprit ilk önce aynı miktarda aptamer ile inkübe edilmiştir. Test edilen çözeltideki asetamiprit ne kadar çok olursa, hemin-rGO yüzeyi üzerinde daha az serbest aptamer absorbe edilerek optimum NaCl konsantrasyonunda kompozitlerin pıhtılaşması sağlanır. Sonuç olarak, süpernatant içerisindeki hemin-rGO içeriği, düşük absorpsiyon ile açık mavi renk elde etmek üzere H₂O₂ varlığında TMB'nin oksidasyonunun katalize edildiği santrifüj işleminden sonra düşürülmüştür. Asetamiprit konsantrasyonuna bağlı renk değişimi UV-vis spektrometresi ile kolayca izlenebilmektedir. Tasarlanan bu aptasensör 40 nM (S/N = 3) tayin sınırıyla 100 nM ila 10 µM aralığında asetamiprit için doğrusal bir yanıt vermiştir.

Wijaya vd. (2014) tarafından yüzey yükseltilmiş Raman spektroskopisi (SERS) yöntemi kullanılarak elma suyundaki ve elma yüzeylerindeki asetamiprit tayini yapılmıştır. Elma yüzeyinden asetamipriti almak için basit bir yüzey temizleme yöntemi kullanılmıştır. Numuneler birkaç dakika boyunca gümüş dendritler ile inkübe edilmiş ve SERS spektrumları doğrudan gümüş yüzeyinden alınmıştır. Swab-SERS yöntemi, 5 örnekten oluşan bir set için 15 dakika sürmüştür. Ortaya çıkan spektral veriler ana bileşen analizi kullanılarak analiz edilmiştir. 634 cm⁻¹'deki asetamiprit piki, 1:1 su-metanol çözeltisi, elma suyu ve elma yüzeyine eklenmiş asetamiprit miktarını saptamak ve ölçmek için kullanılmıştır. SERS yöntemi ile asetamiprit çözücüde 0,5 µg/mL'de (0,5 ppm), elma suyunda 3 µg/mL (3 ppm), ve elma yüzeylerinde 0,125 µg/cm²'de olmak üzere tayin edilmiştir. SERS tekniklerinin içeceklerin, kalın kabuklu meyve ve sebzelerin yüzeylerindeki asetamipriti tayin etmede kullanılabilecek basit, hızlı ve hassas yöntemler olduğu rapor edilmiştir.

Fei vd. (2015), çok katlı karbon nanotüple indirgenmiş grafen oksit nanoribbon kompozitlerle dekore edilmiş altın nanopartiküller kullanarak femtomol seviyesindeki asetamiprit tayini için etiketsiz bir impedimetrik aptasensör geliştirmiştir. Çok katlı karbon nanotüple indirgenmiş grafen oksit nanoribbon kompozitlerle dekore edilmiş altın nanopartiküller (Au/MWCNT-rGONR) one-pot reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Elde edilen Au/MWCNT-rGONR kompozitleri aptamer immobilizasyonu için destek olarak kullanılarak, asetamiprit tayini için, modifiye elektrot yüzeyindeki elektron transfer direncinin değişiminin asetamiprid-aptamer kompleksinin oluşumu ile ilişkili olduğuna dayanan etiketsiz bir elektrokimyasal impedimetrik aptasensör geliştirilmiştir. Saf AuNPs ve MWCNT-rGONR ile kıyaslandığında, Au/MWCNT-rGONR kompozit modifiye elektrodunun asetamiprit tayini için en hassas aptasensör platformu olduğu görülmüştür. Önerilen aptasensörün, asetamiprit için 5×10^{-14} M ile 1×10^{-5} M aralığında doğrusal bir çalışma aralığına ve $1,7 \times 10^{-14}$ M gibi çok düşük bir tayin sınırına sahip olduğu bulunmuştur.

Jiang vd. (2015) yaptıkları çalışmada, aptamer temelli pestisit tayini için azot katkılı grafene bağlanmış gümüş nanopartiküller kullanarak yeni bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirmişlerdir. Gümüş nanopartiküller (NP) ile donatılmış azot katkılı grafen (NG) nanokompozitler, azot kaynağı olarak arginin kullanılarak tek aşamalı ısıtılma işlemi yolu ile hazırlanmıştır. Ag NPs ve NG'nin mükemmel elektriksel özelliklerini ve geniş yüzey alanı birleştirilerek, elde edilen Ag/G nanokompozitler Ag-grafen ve saf NG'ye göre daha etkili elektron transferi ve yüksek yükleme kapasitesini göstermiştir. Bir hedef varlığında, aptamer ve hedef arasındaki güçlü etkileşim, elektron transferini bloke eden elektrot yüzeyinde bir hedef-aptamer kompleksinin oluşumunu teşvik etmektedir. Bu algılama mekanizmasına dayanarak, güçlendirici materyaller olarak Ag/NG kullanımı ile yeni ve oldukça hassas biyosensör platformu, asetamipritin tayini için kullanılmıştır. Geliştirilen aptasensörün asetamiprit için $3,3 \times 10^{-14}$ M'lık ($S/N = 3$) düşük tayin sınırı ile 1×10^{-13} M ile 5×10^{-9} M aralığında geniş doğrusal bir çalışma aralığına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, önerilen yöntemin, gıda, tıbbi ve çevresel alanlardaki geniş bir analit spektrumunun hassas ve spesifik olarak tayini için yeni bir elektrokimyasal aptasensör geliştirmek için umut vadeden bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Rapini ve Marazza (2015), asetamipritin hassas çoklu tayini için yarışmalı format ve tek kullanımlık perde baskılı dizilere dayanan elektrokimyasal bir DNA aptasensörü geliştirmişlerdir. Aptasensörün hassasiyetini arttırmak için, polianilin film ve altın nanopartiküller, grafit perde baskılı elektrot yüzeyine dönüşümlü voltametri ile aşamalı olarak biriktirilmiştir. Daha sonra altın nanoparçacıklar, tiyol bağlanmış DNA aptamer immobilizasyonu için bir platform olarak kullanılmıştır. DNA aptasensör dizileri ile sabit miktarda biyotinlenmiş tamamlayıcı oligonükleotit dizisi içeren farklı asetamiprit çözeltileri analiz edilmiştir. Daha sonra afinite reaksiyonunu izlemek için streptavidin-alkalin fosfataz konjugatı eklenmiştir. Enzim, 1-naftil fosfatın 1-naftole hidrolizini katalizlemiştir ve enzimatik ürün diferansiyel puls voltametrisi ile tespit edilmiştir. Pestisit konsantrasyonu arttığında sinyalin azaldığı gözlenmiştir. Deneysel parametrelerin test edilmesiyle optimize edilmiş koşullar altında, 0,25 ve 2 μM asetamiprit konsantrasyon aralığında bir doz-yanıt eğrisi elde edilmiş ve tayin sınırı 0,086 μM olarak hesaplanmıştır. Aptasensörün seçiciliği atrazine pestisitinin analizi ile de doğrulanmıştır. Son olarak, asetamiprit ile meyve suyu numunelerindeki ön deneyler de gerçekleştirilmiştir.

Jin vd. (2016) yaptıkları çalışmada, sebzelerdeki asetamipritin fotokatalitik bozunma bileşiğine dayalı tespiti için yeni bir sensör geliştirmişlerdir. Bir karbon pasta elektroduyla birleştirilmiş titanyum dioksit fotokatalizörleri kullanılarak asetamipritin dolaylı olarak tayini için bir elektrokimyasal yöntem çalışılmıştır. Dönüşümlü voltametri sonuçları, asetamipritin fotokatalitik bozunma bileşiğinin nötr çözeltilerde elektroaktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Asetamiprit miktarı, hassas bir tayin yöntemi olarak diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisinin kullanılması ile dolaylı olarak belirlenmiştir. Deneysel parametreler fotokatalitik bozunma süresi, tampon çözeltisinin pH değeri, birikim potansiyeli ve birikim zamanına göre optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında, önerilen elektrokimyasal yöntem 0,2 nM'lık bir tayin sınırı (3 S/N) ile 0,01 ila 2 μM arasında değişen asetamiprit konsantrasyonlarını tayin etmiştir. Ayrıca, önerilen yöntem, mükemmel seçicilik, iyi tekrarlanabilirlik ve kabul edilebilir operasyonel stabilite göstermiş ve tatmin edici sonuçlar veren sebze örneklerinde bulunan asetamipritin tayini için başarıyla uygulanabilmektedir.

Lin vd. (2016), asetamiprit kalıntılarının tayini ve görüntülenmesi için aptamer ile işlevselleştirilmiş kuantum noktalarına dayanan yeni bir aç/kapat sensör geliştirmişlerdir. Asetamiprit aptamer ile modifiye edilmiş ZnS:Mn probu (ZnS:Mn-Aptamer), ZnS:MnQDs'ın asetamiprit bağlama aptameri ile konjuge edilmesi ile elde edilmiştir. Probun flüoresansı, ZnS:Mn-Aptamer ve MWCNTs arasındaki floresans rezonans enerji transferine (FRET) dayanan MWCNTs tarafından kapatılmıştır. Asetamiprit ilavesinden sonra, ZnS:Mn-Aptamer'in asetamiprite spesifik olarak bağlanmasından dolayı floresans açılmıştır. Yukarıdaki prensibe dayanarak, asetamipritin gerçek numunelerde kantitatif tayini ve görüntülenmesi yapılmıştır. Doğrusal denklem, 0-150 nM arasındaki doğrusal bir aralıkta 0,7 nM'lik bir tayin sınırı ile $F/F_0 = 1,101 + 0,0312CA$ olarak tanımlanmıştır (CA, nM cinsinden asetamiprit konsantrasyonunu ifade etmektedir). Elde edilen sonuçlara bakılarak, bu yöntemin karmaşık bir operasyon olmaksızın çok basit olduğu, yüksek hassasiyete ve seçiciliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Liu vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, asetamiprit ile temsil edilen pestisit taraması için üçlü sarmal molekül anahtarı (THMS) kullanılarak aptamer temelli bir floresan algılama platformu geliştirilmiştir. THMS, iki özel DNA probundan oluşmaktadır. Bir tanıma probu olarak işlev gören iki kol segmentinin çevrelediği etiketsiz bir merkezi hedefe özgü aptamer dizisi; sırasıyla 3' ve 5' ucunda bir florofor ve söndürücü ile işaretlenmiş bir sinyal iletim probu (STP) olarak görev yapan bir saç tokası şekilli yapı oligonükleotidir. Asetamiprit yokluğunda, aptamerlerin iki kol bölümünün STP döngü sekansı olan tamamlayıcı bağları, STP'nin "açık" konfigürasyonu ile THMS oluşumunu zorlar ve THMS'nin floresanı açıktır. Hedef asetamiprit varlığında, aptamer-hedef bağlanması, THMS'yi ayıran ve STP'yi serbest bırakan yapılandırılmış bir aptamer/hedef kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır. Serbest STP bir kök ilmek yapısına katlanır ve flüoresan söndürülür. Söndürülmüş floresan yoğunluğunun, tayin sınırı 9,12 nM kadar düşük olan, 100 ila 1200 nM aralığında asetamiprit konsantrasyonu ile orantılı olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, bu THMS temelli yöntem tatmin edici geri kazanımlar ile Çin lahanasındaki asetamipritin test edilmesi ve miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır ve sonuçların LC-MS sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Aptamer temelli THMS'nin yüksek stabilite, göze çarpan

hassaslık ve orijinal aptamerin afinite ve özgünlüğünün korunması gibi farklı avantajlar sunduğu ve en önemlisi, bu stratejinin uygun ve üç helezonlu yapıyı değiştirmeden aptamer diziliminin değiştirilmesiyle genelleştirilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Pestisit kalıntılarının aşırı düşük konsantrasyonu ve seçici olarak tayin edilebilmesi, çevre kirliliğine ve insan sağlığına yönelik tehdidin değerlendirmesi için oldukça önemlidir. Qi vd.(2016) tarafından yapılan bu çalışmada asetamipritin ultra hassas ve seçici tayini için güçlendirilmiş bir kemilüminesans (CL) algılama platformu geliştirilmiştir. Bu çalışma, aptamerin yüksek bağlanma afinitesine ve AuNP'lerin morfolojisi ile H₂O₂ ve luminol varlığında CL oluşumunu uyaran katalitik etkisi arasındaki ilgiye dayanmaktadır. Pestisit kalıntıları için önerilen bu algılama platformu, asetamiprit tayini için diğer aptamer temelli sensörlerden yaklaşık 100 kat daha düşük olan, 62 pM'lık bir tayin sınırı ile asetamiprite karşı yüksek bir duyarlılık sergilemiştir. Aptamerin kendine özgü tanınma özelliği nedeniyle, bu algılama platformu yüksek seçiciliğe sahiptir. Böylece, bu algılama platformu tek bileşenli pestisit kalıntılarının hassas ve seçici tespiti için etiketsiz ve uygun maliyetli bir yaklaşım sağlamaktadır. Daha da önemlisi, bu CL yöntemi, gerçek kontamine numunelerde asetamipritin saptanmasında başarıyla kullanılmıştır.

Tian vd. (2016) yaptıkları çalışmada, aptamer ile sarılı altın nanopartikülleri kullanarak asetamipritin kolorimetrik tayininde aptamer dizilerinin kısaltılmasının etkisini araştırmışlardır. Kısaltılmış 37-mer ve 25-mer aptamerler, 49-mer asetamiprit hedef aptamerinden aşırı kenarlı nükleotidlerin silinmesiyle üretilmiştir. Üç sekansın tepkileri karşılaştırıldığında, kesilmiş aptamerlerin test edilen diğer pestisitlere karşı ayırt etme becerisini geliştirmediği görülmüştür. Bununla birlikte, 49-mer ve diğer kısa aptamerler arasındaki kıyaslama, aşırı bitişik nükleotidlerin bağlanma bölgesinin dışına çıkarılarak aptamer sekanslarının kısaltılmasının asetamiprit için kolimetrik duyarlılığı 3,3 kat artırdığını göstermiştir. Aşırı bazlar nedeniyle, hedefe bağlı aptamerin AuNPs'e bağlı kalabileceği görülmüş, bu da aptamerin AuNPs'den tamamıyla ayrışmasına ve dolayısıyla agregasyon tepkilerinin bastırılmasına neden olmuştur. Bu çalışma, hedef molekülün tayininde aptamer yapısının etkilerinin yanı sıra, ortamlardaki veya gıda içerisindeki pestisit kalıntılarının hızlı tespiti için aptamer uzunluğunu ince ayarlayarak elde edilen bir metodun anlaşılmasını sağlamıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar, Hücre ve Elektrotlar

Çalışmalarımızda şekil 3.1’de gösterilen bilgisayar bağlantılı AUTOLAB PGSTAT302N elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.



Şekil 3.1 AUTOLAB PGSTAT302N elektrokimyasal analiz cihazı

Deneyler sırasında kullanılan çözeltileri hazırlamak için ELGA Purelab Optimum-Q cihazı ile distile edilmiş ultra saf su kullanıldı.

Hazırlanan çözeltileri karıştırmak ve çözmek amacıyla Bandelin Sonorex marka ultrasonikasyon cihazı kullanıldı.

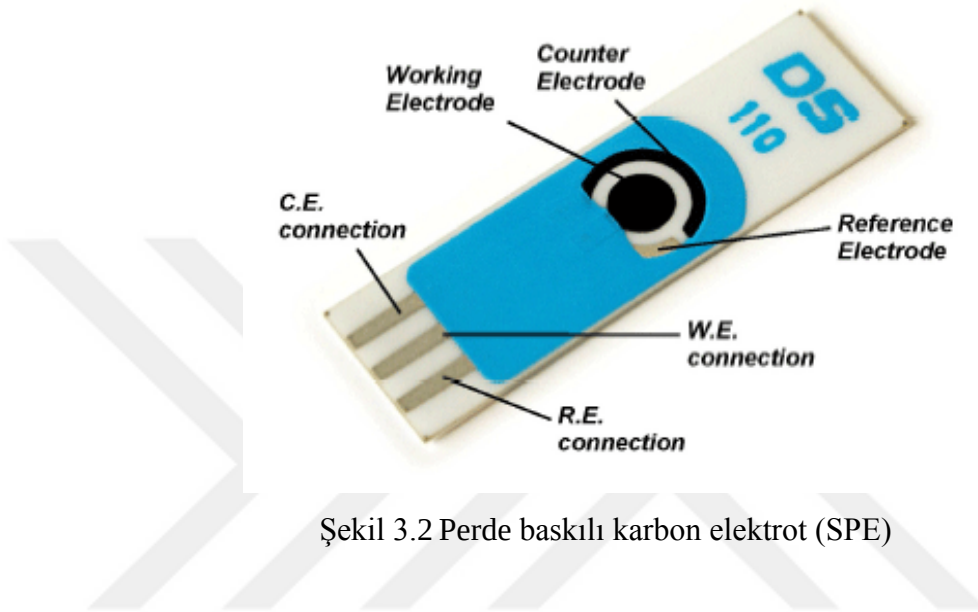
Çalışmalarda kullanılan deney çözeltilerinin pH’ları ORION marka 912600 numaralı kombine cam elektrodu kullanılarak ORION 720A cihazı ile ayarlandı. Cihazı kalibre etmek amacıyla pH’sı 4,13 olan potasyum hidrojen ftalat ve pH’sı 8,20 olan sodyum bikarbonat çözeltileri kullanıldı.

Çözelti ilaveleri için Biohit Proline-Pipette ve Ependorf marka mikro pipetler kullanıldı.

Çözeltilerin karıştırılmasında Chiltern marka MS21S model manyetik karıştırıcı ve ISOLAB marka vorteks kullanıldı.

Çalışmalar sırasında şekil 3.2’te gösterilen, 3,4 cm uzunluğunda, 1 cm genişliğinde ve 0,05 cm yüksekliğindeki DS 110 marka SPEs kullanıldı.

- ✓ Çalışma elektrodu: 4 mm çapında ve karbon,
- ✓ Yardımcı elektrot: Karbon,
- ✓ Referans elektrot: Gümüş.



Şekil 3.2 Perde baskılı karbon elektrot (SPE)

Terazi (KERN, ABT 220-5DM)

Potansiyostat (AUTOLAB 302N-PGSTAT; Eco Chemie, Hollanda)

3.2 Kullanılan Kimyasallar

3.2.1 Azot gazı

5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadizol (AMT) monomerinin 0,1 M H_2SO_4 içerisinde çözünmesini sağlamak amacıyla yüksek saflıktaki azot gazı kullanıldı.

3.2.2 Kullanılan diğer kimyasallar

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edilen firmalar

Kimyasal Madde	Saflık Dereceleri	Temin Edildiği Firma
5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadizol (AMT)	%98	Acros Organics
Asetamiprit	HPLC	Fluka
S10THIOL Aptameri (5'-(SH)-ATTGGACTAGCTGCA GCGATTCTTAATCGCTATGCTCCGCCCAATACTG-3')	HPLC	Eurofins Genomics
S18THIOL Aptameri (5'-(SH)-TGTAATTTGTCTGCA GCGGTTCTTGATCGCTGACACCATATTATGAAGA-3')	HPLC	Eurofins Genomics
S10BIO Aptameri (5'-(BIO)- ATTGGACTAGCTGCA GCGATTCTTAATCGCTATGCTCCGCCCAAT-3')	HPLC	Eurofins Genomics
6-merkapt-1-hekzanol	%97	Aldrich
Streptavidin-alkalen fosfataz		Sigma
1-naftil fosfat	%99	Aldrich
Dietanolamin	≥%98	Sigma-Aldrich
Magnezyum klorür	≥%98	Sigma
Potasyum klorür	%99	Sigma
Sülfürik Asit	%95-97	Riedel de Haën
Sığır serum albümini (BSA)	%96	Sigma
Sodyum dihidrojenfosfat-2-hidrat	%98	Sigma-Aldrich
Disodyum monohidrojenfosfat-2-hidrat	%98	Sigma-Aldrich
Atrazin	HPLC	Fluka
Ometoat	HPLC	Fluka
Imidacloprid	HPLC	Fluka
Klorpirifos	HPLC	Fluka

3.3 Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 TRIS-HCl tamponu

Derişimi 20 mM olacak şekilde TRIS-HCl yıkama tamponu hazırlamak için TRIS-HCl, NaCl, KCl ve $MgCl_2$ 'den uygun miktarlarda tartıldı ve ultra saf suda çözüldü. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak pH 7,4'e ayarlandı.

3.3.2 Fosfat tamponu

Toplam derişimi 0,5 M olacak şekilde sodyum dihidrojenfosfat-2-hidrat ve disodyum monohidrojenfosfat-2-hidrattan uygun miktarlarda tartıldı ve ultra saf suda çözüldü. Hazırlana çözeltinin pH'sı, 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl çözeltileri kullanılarak pH 7,5'e ayarlandı. Tampon çözelti, kullanılmadığı zamanlarda + 4 °C'de saklandı.

3.3.3 Dietanolamin tamponu

Derişimi 0,1 M olacak şekilde dietanolamin (DEA) tamponu hazırlamak için, dietanolamin çözeltisinden, $MgCl_2$ ve KCl'den uygun miktarlarda alındı, ultra saf su ile toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı ve pH 9,6'ya ayarlandı.

3.3.4 6-merkpto hekzanol çözeltisi

Yoğunluğu 0,981 g/mL olan %97'lik 6-merkpto hekzanolden uygun miktarda alınarak derişimi 1×10^{-3} M olacak şekilde 20 mL stok çözelti hazırlandı.

3.3.5 Poli (5-amino-2-merkpto-1,3,4-thiadiazole [P(AMT)] çözeltisi

5-amino-2-merkpto-1,3,4-thiadiazole (AMT) monomerinden 1,37 mg tartıldı ve 30 dakika boyunca azot gazı geçirilerek 0,1 M H_2SO_4 içerisinde çözüldü.

3.3.6 Tetra kloroaurik asit (HAuCl₄) çözeltisi

50 mM'lık stok HAuCl₄ çözeltisinden 12 µL alındı, H₂SO₄ çözeltisi ile toplam hacim 1 mL'ye tamamlanarak 0,6 mM HAuCl₄ çözeltisi hazırlandı.

3.3.7 Stok aptamer çözeltileri

S10 5' Thiol, S18 5' Thiol, S10 5' Biotin aptamerleri 0,5 M pH 7,5 fosfat tamponunda çözülerek stok aptamer çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiiler kullanılarak farklı derişimlerdeki aptamer çözeltileri hazırlandı.

3.3.8 Stok asetamiprit çözeltisi

Katı asetamipritten belirli miktarda alınarak asetamiprit derişimi 1×10^{-3} M olacak şekilde ultra saf su ile hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan stok asetamiprit çözeltisi kullanılarak farklı derişimlerdeki asetamiprit çözeltileri hazırlandı.

3.3.9 Streptavidin-alkalen fosfataz enzim konjugatı (Strep-ALP) çözeltisi

Strep-ALP enzimi 2 mL DEA tamponunda çözüldü (1639 U/1 mL). Bovine serum albümin (BSA) - enzim karışımı, sırasıyla 8 mg/mL BSA ve 1U/mL strep- ALP enzimi içerecek şekilde DEA tamponu ile toplam hacim 250 mL tamamlanarak hazırlandı.

3.3.10 α-naftil fosfat çözeltisi

1 mg α-naftil fosfat tartılarak 1 mL DEA tamponunda çözüldü.

3.3.11 Girişim yapan türlerin çözeltileri

Asetamiprit tayini sırasında girişim etkisi yapabilecek olan ve yapısı asetamiprite benzeyen atrazin, omethoate, imidacloprid ve chlorpyrifos pestisitlerinin stok çözeltileri her birinin derişimi 1×10^{-3} M olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler kullanılarak her bir pestisit derişimi 0,05 nM olacak şekilde yeni çözeltiler hazırlandı.

3.3.12 Gerçek numune çözeltileri

Gerçek numune analizlerinde atık su, domates, salatalık örnekleri ile Hacettepe Üniversitesi Teknokentte bulunan “Pestisit Tayinleri” ünitesinden temin edilen ve asetamiprit içeren pestisit örnekleri kullanıldı. 100 g salatalık ve 100 g domates, ayrı ayrı 100 mL fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,5) içerisine konuldu ve bir blender yardımıyla homojenize edildi. Atık su örnekleri ve Hacettepe Üniversitesi Teknokentte bulunan “Pestisit Tayinleri” ünitesinden temin edilen pestisit örnekleri ise doğrudan temin edildiği şekilde kullanıldı.

3.4 Deneyin Yapılışı

3.4.1 Modifiye perde baskılı karbon elektrotların hazırlanması

Perde baskılı karbon elektrotların modifikasyonu, Autolab PGSTAT302N potantiostat/galvanostat cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Perde baskılı karbon elektrotların yüzeyi ilk olarak elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak poli(5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadizol) ile kaplandı. Öncelikle 1,37 mg 5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadizol monomeri tartıldı ve 10 mL 0,1 M H_2SO_4 içerisinde azot gazı geçirilerek çözüldü. Bu monomer çözeltisinden 60 μ L alınarak elektrot yüzeyine damlatıldı. AMT'nin elektropolimerizasyonu, 50 mV/s tarama hızıyla (-0,2)-(1,7) V arasında, 15 döngü sayısı ile dönüşümlü voltametri tekniğiyle gerçekleştirildi. Polimerizasyon işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkandı ve elektrot oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Altın nanopartiküller (AuNPs), P(AMT) modifiye SPE'ların yüzeylerinde elektrodun yüzey alanını genişletmek ve birincil aptamer diziyi (Apt1) bağlamak amacıyla elektrokimyasal olarak biriktirildi. AuNPs, hem tiyol fonksiyonlu uç gruba sahip birincil aptamerlerin immobilizasyonunu sağlamak hem de ALP ile α -naftil fosfat arasında oluşacak olan elektrokimyasal indirgenme sinyalinin yükseltmek için kullanıldı. Bu amaç doğrultusunda, 0,6 mM HAuCl₄ çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 60 μ L alınarak elektrot yüzeyine damlatıldı. P(AMT) modifiye elektrotların yüzeyine AuNPs, 100 mV/s tarama hızında (-0,2)-(+1,2) V arasında, 25 döngü sayısı ile CV tekniği kullanılarak biriktirildi.

3.4.2 Modifiye perde baskılı karbon elektrotların karakterizasyonu

Yalın SPE, SPE/P(AMT), SPE/AuNPs ve SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının karakterizasyonları 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} (1:1) içeren 0,1 M KCl çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. CV ve EIS ölçümleri alınarak her elektrot için pik-pik akımı değerleri (ΔE_p) ve R_{et} değerleri hesaplandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Hazırlanan elektrotların yüzey karakterizasyonları Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniği kullanılarak incelendi. Ayrıca, elektrot yüzeylerinin incelenmesinde kullanılan X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) tekniği ile de ölçümler alındı.

3.4.3 Aptamer 1 dizisinin ve miktarının belirlenmesi

SPE/P(AMT)/AuNPs elektrodunun karakterizasyon işleminden sonra Apt1 miktarının immobilizasyonuna geçildi. Çalışmada kullanılan aptamer dizileri SELEX yöntemi ile belirlenen literatüre göre seçildi (He vd. 2011). Öncelikle stok S10 ve S18 aptamer çözeltileri 0,5 M pH 7,5 fosfat tamponunda (PBS) derişimleri sırasıyla 29,8 μ M ve 21 μ M olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerden belirli miktarlarda (0,5 μ M; 1 μ M; 1,5 μ M; 2 μ M ve 5 μ M) alınarak SPE/P(AMT)/AuNPs elektrodunun yüzeyine damlatıldı ve elektrot +4°C'de 1 gece (yaklaşık 16 saat) bekletildi. Aptamer modifiyeli elektrotların yüzeyleri, spesifik olmayan etkileşimleri ortadan kaldırmak amacıyla 6-merkaptotetrazanol ile bir saat etkileştirildi ve daha sonra Fe(CN)₆^{3-/4-} çözeltisinde EIS ölçümleri alındı. R_{et} değerlerine karşı aptamer dizileri ve derişimleri grafiğe geçirildi.

3.4.4 Aptamer 2 miktarının belirlenmesi

Tiyol grubuna sahip birinci aptamer dizisi ve miktarının belirlenmesinden sonra biotin ile işaretli ikinci aptamerin (S10-BIO) immobilizasyonuna geçildi. Çalışmanın bu kısmında, SPE/P(AMT)/AuNPs elektrodu üzerine Apt1 çözeltisi damlatılarak elektrot +4 °C’de 1 gece (yaklaşık 16 saat) bekletildi. Elektrot, spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla 6-merkaptohexanol ile bir saat boyunca etkileştirildi ve 20 mM pH 7,4 Tris-HCl (0,1 M NaCl; 0,2 M KCl; 5 mM MgCl₂) yıkama tamponu ile yıkandı. Elektrot daha sonra 0,5 nM derişimdeki asetamiprit çözeltisi ile 45 dk süresince etkileştirildi ve ardından yıkama tamponu ile yıkandı. Elektrot yüzeyine 0,5 M pH 7,5 fosfat tamponunda hazırlanmış S10-BIO aptamerinden 2,3,4 ve 5 µM derişimlerinde damlatılarak 20 dk boyunca etkileşim sağlandı. Elektrot, yıkama tamponu ile yıkandı, streptavidin-alkalen fosfataz konjugatı (Strep-ALP) ile 20 dk etkileştirildi ve 0,1 M dietanolamin (DEA) tamponu (1 mM MgCl₂; 0,1 M KCl) ile yıkandı. Son aşamada elektrot yüzeyine α-naftil fosfat çözeltisi damlatıldı ve α-naftol oluşması için 20 dk bekletilerek diferansiyel puls voltametri ile ölçüm alındı.

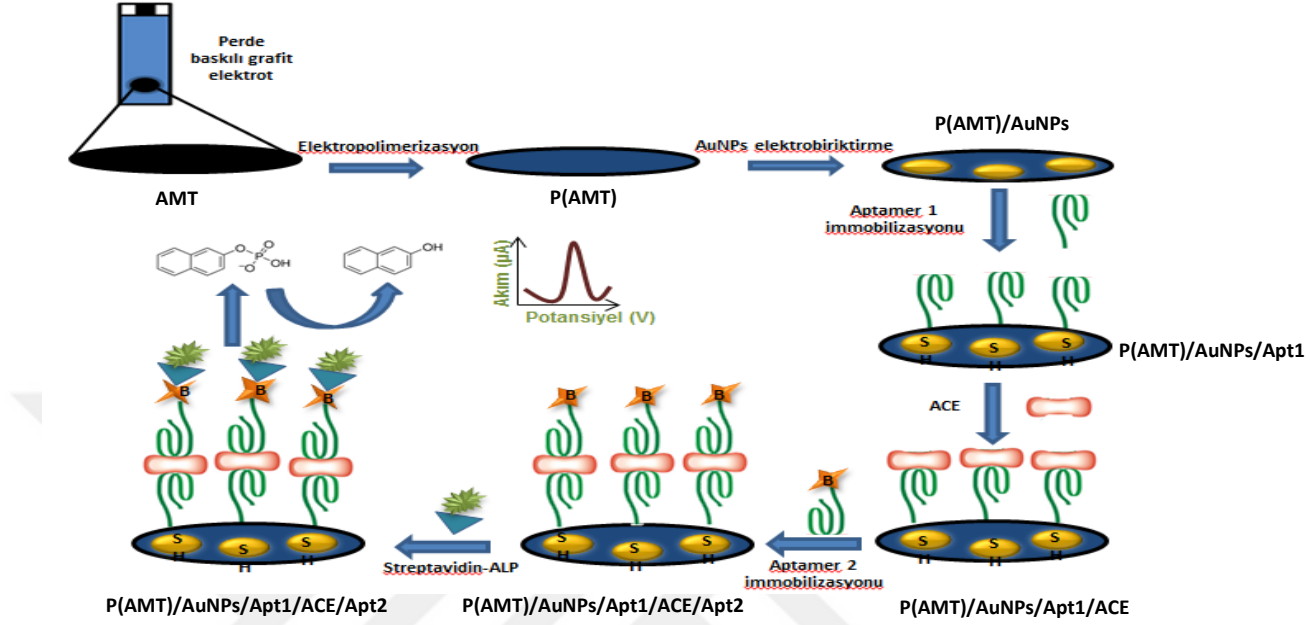
3.4.5 SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodunun asetamiprit ile etkileşim süresinin optimizasyonu

Apt1 ve Apt2 miktarlarının belirlenmesinden sonra tayini yapılacak ACE ile SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodunun etkileşim süresi çalışıldı. Bu çalışmada, ACE miktarı sabit tutularak SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodu belirli sürelerde (15; 30; 45; 52,5; 55 ve 60 dakika) ACE ile etkileştirildi ve yukarıda belirtilen sandviç yöntemi aşamaları uygulanarak optimum etkileşim süresi belirlendi.

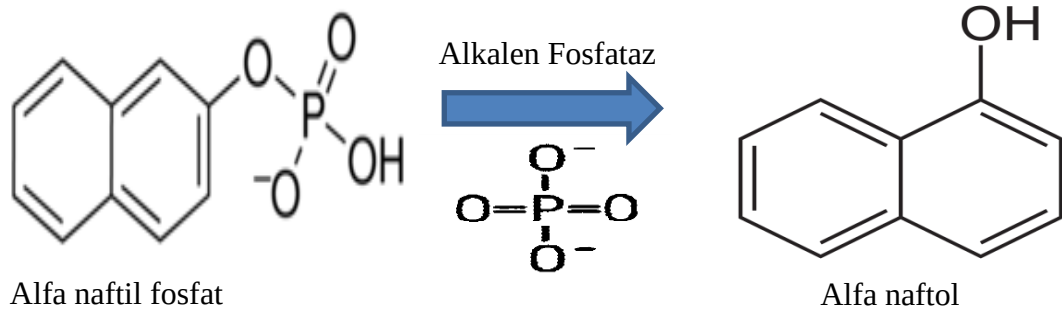
3.4.6 ACE için çalışma aralığının belirlenmesi

Bu aşamada, yukarıda anlatılan optimizasyon işlemlerinden yararlanılarak sandviç immobilizasyonuna dayalı elektrokimyasal tayini yapılan asetamipritin farklı derişimlerdeki çözeltileri kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi. Hazırlanan

SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodu üzerine 0,005–10 nM derişim aralıındaki ACE çözeltileri damlatılarak yukarıda anlatılan işlemler gerçekleştirildi.



Şekil 3.3 Geliştirilen aptasensörün yapım aşamalarının şematik olarak gösterimi



Şekil 3.4 Alfa naftil fosfatın alfa naftole dönüşüm reaksiyonu

3.4.7 Girişim etkisi

Geliştirilen aptasensörün sadece asetamiprite özgü olduğunu kanıtlamak için, yapısı asetamiprite benzeyen atrazin, omethoate, imidacloprid ve chlorpyrifos pestisitleri kullanılarak girişim etkisi incelendi. Bu amaçla, atrazin, omethoate, imidacloprid ve

chlorpyrifos çözeltileri her birinin derişimi 0,05 nM olacak şekilde hazırlandı. Girişim etkisi incelenecek pestisit türü ve 0,05 nM ACE içeren çözeltiler hazırlanan aptasensör ile etkileştirildi. Etkileşim sonrası elde edilen α -naftol yükseltgenme sinyali ölçülerek sadece ACE içeren çözeltiden elde edilen sonuçla karşılaştırıldı ve her bir tür için % girişim değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\% \text{ girişim} = [(I_x - I_0)/I_0] \times 100$$

I_x ; 0,05 nM ACE çözeltisi içerisinde bulunan girişim yapan türün DPV sinyali

I_0 ; 0,05 nM ACE çözeltisinin DPV sinyali

3.4.8 Tekrar üretilebilirlik

Biyosensörlerin rutin analizlerde kullanılabilirliği onların doğru, güvenilir ve aynı standartta tekrar üretilip üretilemedikleri ile ilişkilidir. Dolayısıyla yeni bir biyosensör geliştirildikten sonra incelenmesi gereken en önemli karakteristik özelliklerinden biri de o biyosensörün tekrar üretilebilirliğidir. Geliştirilen aptasensörün tekrar üretilebilirliğini araştırmak için birbirinden bağımsız yedi aptasensör hazırlanarak aynı koşullarda ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar % bağıl standart sapma (% BSS) değeri hesaplandı.

3.4.9 Geliştirilen aptasensör ile gerçek numune analizi

Bu aşamada geliştirilen SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1/ACE/Apt2 elektrodu kullanılarak, standart ekleme metodu ile gerçek numunelerdeki asetamipritin tayini yapıldı. Hacettepe Üniversitesi Teknokentte bulunan “Pestisit Tayinleri” ünitesinden asetamiprit içeren pestisit örnekleri temin edildi. Bu örneklerdeki ACE miktarı daha önceden HPLC yöntemiyle belirlenmiş ve içerisindeki ACE miktarı %10 olarak bulunmuştur. Bu amaçla, belirli derişimlerde ACE içeren örnekler hazırlanarak geliştirilen aptasensör ile ACE tayini yapıldı. Her iki yöntem arasındaki sonuçlar karşılaştırılarak geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği test edildi. Yöntemin uygulanabilirliği ayrıca atık su, domates ve salatalık örnekleriyle de araştırıldı. 100 g salatalık ve 100 g domates, ayrı ayrı 100 mL fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,5) içerisine konuldu ve bir blender

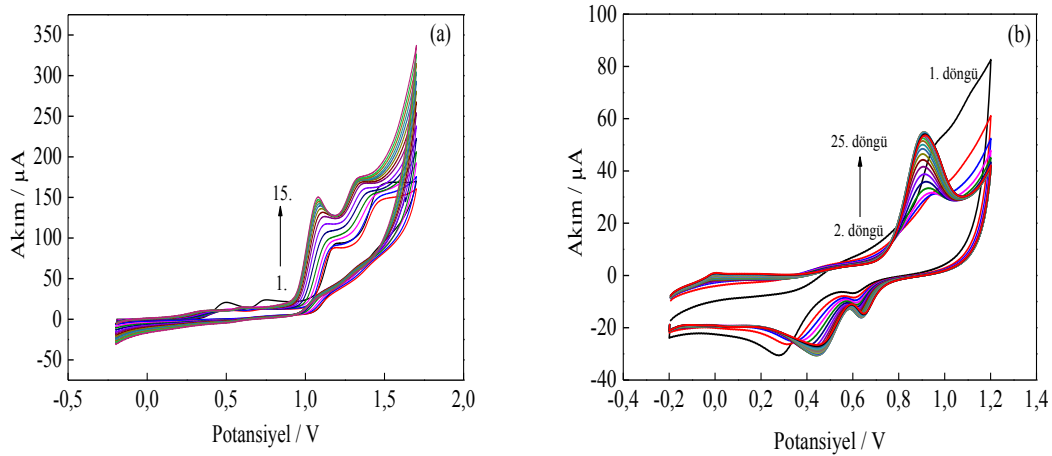
yardımıyla homojenize edildi. Atık su örnekleri ise doğrudan temin edildiği şekilde kullanıldı. Atık su, domates ve salatalık örneklerine belirli miktarlarda ACE çözeltileri standart ekleme yöntemi ile eklendi ve geliştirilen aptasensör ile ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlardan yararlanılarak her bir numune için ayrı ayrı % geri kazanım ve % BSS değerleri hesaplandı.



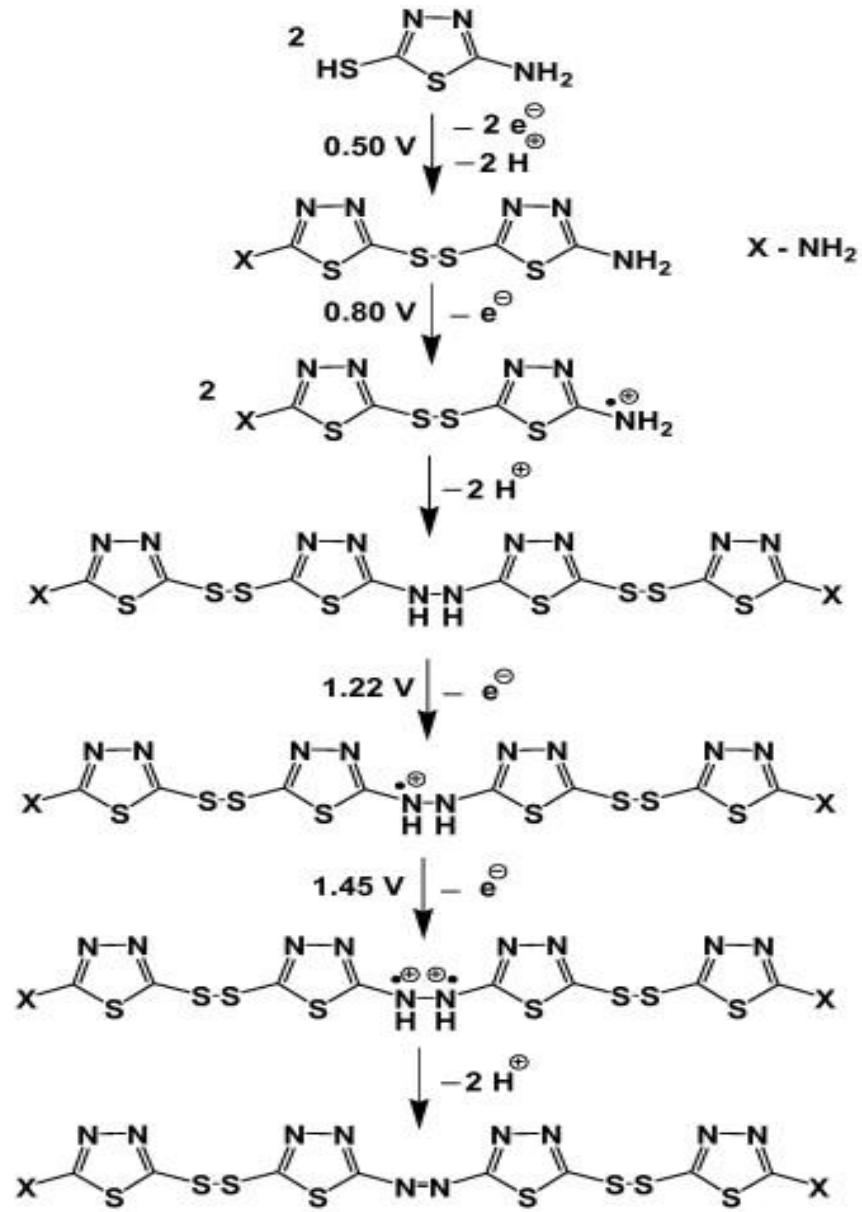
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Modifiye Perde Baskılı Karbon Elektrotların Hazırlanması

Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı gibi, yalın SPE elektrot yüzeyi önce AMT ile kaplandı, daha sonra ise elektrot yüzeyine AuNPs biriktirildi. Elektrodun modifikasyon işlemlerine ait dönüşümlü voltamogramlar şekil 4.1’de gösterildi. Şekil 4.1.a incelendiğinde AMT’nin +0,5, +0,8, +1,1 ve +1,48 V olmak üzere dört yükseltgenme piki bulunmaktadır. Üçüncü döngüden itibaren yükseltgenme pikleri önemli ölçüde artış gösterdiğinden uygulanan potansiyel ile SPE yüzeyinde polimerin birikmeye başladığı söylenebilir. Ayrıca AMT’nin elektropolimerizasyonu (şekil 4.2) ile ilgili yükseltgenme akımlarının 15. döngüden sonra azalmasının ortamda oluşabilecek inaktif türlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Aydoğdu vd. 2014). Şekil 4.1.b’de AuNPs’lerin SPE/P(AMT) elektrodu yüzeyine biriktirilmesine ait çok döngülü voltamogramlar verildi. Şekil incelendiğinde AuNPs’in +0,9 V’de bir yükseltgenme, +0,65, +0,42 V’da ise iki tane indirgenme piki bulunmaktadır. Döngü sayısı arttıkça pik akımlarının artması nedeniyle AuNPs’lerin SPE/P(AMT) yüzeyinde biriktiği sonucuna varılabilir (Saberri vd. 2013).



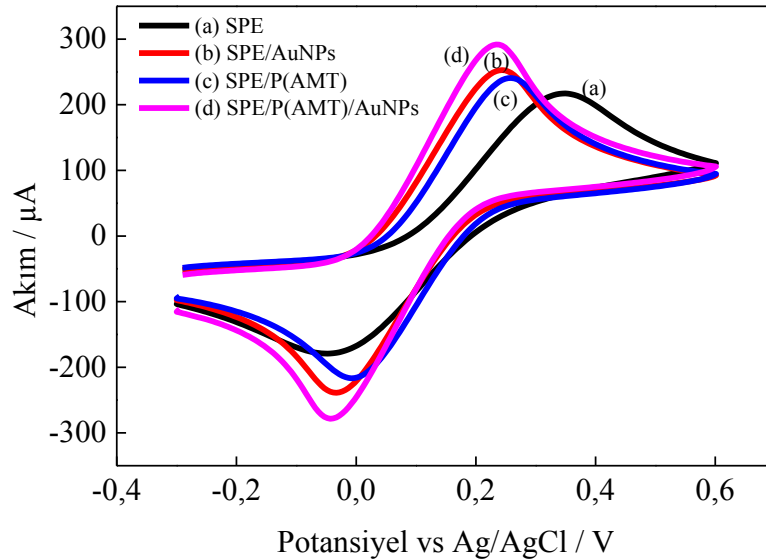
Şekil 4.1.a AMT’nin dönüşümlü voltametri ile SPE yüzeyine elektropolimerizasyonu, b. AuNPs’in dönüşümlü voltametri ile SPE/P(AMT) yüzeyine biriktirilmesi



Şekil 4.2 AMT'nin elektropolimerizasyon mekanizması

4.2 Modifiye Perde Baskılı Karbon Elektrotların Karakterizasyonu

Yalın SPE, SPE/P(AMT), SPE/AuNPs ve SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1:1) türlerini içeren 0,1 M KCl çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Şekil 4.2, yalın ve modifiye elektrotların dönüşümlü voltamogramlarını göstermektedir. Yalın SPE yüzeyine P(AMT) kaplanmasıyla $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probunun anodik ve katodik pik akımlarının arttığı ve pik-pik ayrımı değerinin (ΔE_p) azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.2.c). Buradan P(AMT) filmin redoks reaksiyonunu önemli ölçüde geliştirdiği ve polimer filmin elektroaktif yüzey alanını arttırdığı sonucuna varılabilir (He vd. 2010). Yalın SPE yüzeyi AuNPs ile kaplandığında ise anodik (i_{p_a}) ve katodik (i_{p_k}) akım değerlerinin SPE/P(AMT) elektroduna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.b). Buradan SPE yüzeyinde biriktirilen altın nanopartiküllerin çözelti ile elektrot ara yüzeyinde elektron transferini hızlandırarak elektrot performansını arttırdığı sonucuna varılabilir (Fan vd. 2013). SPE/P(AMT) elektrotta AuNPs biriktirilmesi sonucunda kompozit elektrotta en yüksek akım değerleri elde edildi. Yalın SPE, SPE/P(AMT), SPE/AuNPs ve SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının ΔE_p , i_{p_a} , i_{p_c} değerleri tablo 4.1’de gösterildi.

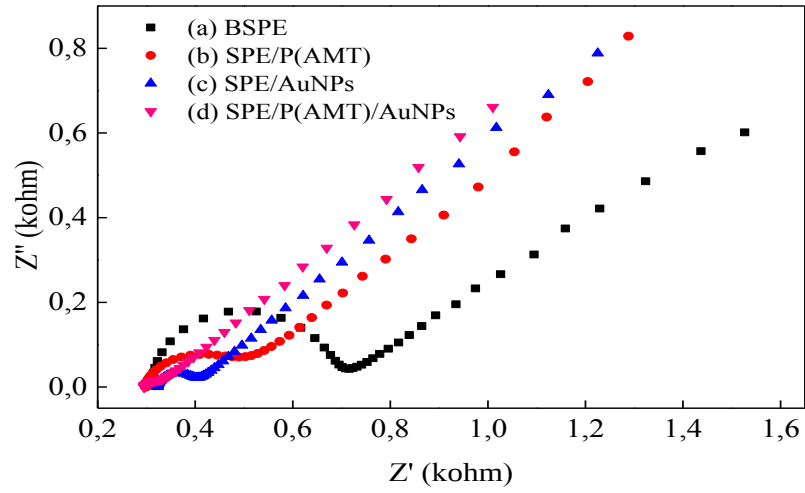


Şekil 4.3.a.Yalın SPE, b. SPE/AuNPs, c. SPE/P(AMT), d. SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının dönüşümlü voltamogram eğrileri

Çizelge 4.1 Yalın SPE, SPE/P(AMT), SPE/AuNPs ve SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

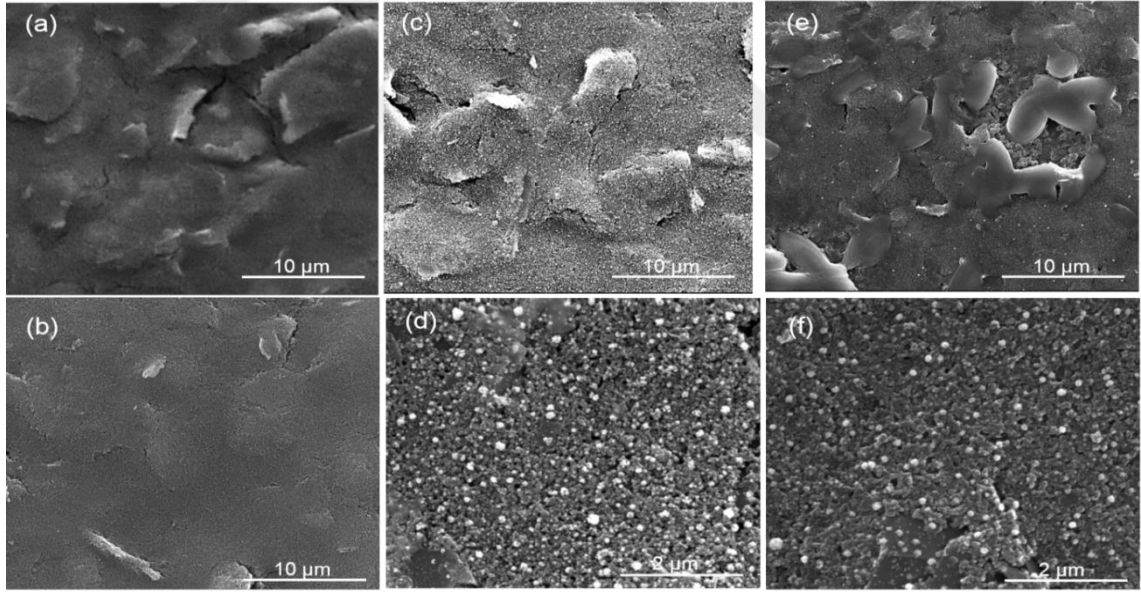
Elektrot	E_{p_a} / V	E_{p_c} / V	ΔE_p / V	I_{p_a} / μA	I_{p_c} / μA
Yalın SPE	0,329	-0,023	0,352	167	-140
SPE/P(AMT)	0,254	0,002	0,252	216	-200
SPE/AuNPs	0,234	-0,028	0,262	232	-210
SPE/P(AMT)/AuNPs	0,227	-0,031	0,258	268	-250

SPE, SPE/P(AMT) ve SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotların elektron transfer özellikleri EIS yöntemi ile de incelendi ve elde edilen Nyquist eğrileri şekil 4.3'te verildi. Nyquist eğrisi olarak gösterilen bir EIS spektrumunda yüksek frekanslar yarım daire kısmını, düşük frekanslar ise doğrusal kısmı ifade etmektedir. Bu eğride yarım daire kısmı elektron transferi sınırlı bir olayı, doğrusal kısım ise difüzyon olayını göstermektedir. Yarım dairenin çapı elektron veya yük transfer direncine (R_{et}) eşittir (Aydoğdu vd. 2014). Elde edilen Nyquist eğrilerinden yararlanarak, SPE, SPE/AuNPs, SPE/P(AMT) ve SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının R_{et} değerleri sırasıyla 609, 75,7, 173 ve 34,1 ohm olarak bulundu. SPE/P(AMT) (Şekil 4.3.b) ve SPE/AuNPs elektrotta (Şekil 4.3.c) yalın SPE elektroda (Şekil 5.3.a) göre daha düşük R_{et} değerinin elde edilmesi çözelti/elektrot ara yüzeyindeki elektron transfer hızının arttığını göstermektedir. Şekil 4.3.d'de, P(AMT) film ve AuNPs arasındaki sinerjistik etkiyle diğer modifiye elektrotlara kıyasla $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ile elektrot ara yüzeyindeki elektron transfer direncinin en az olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4.a SPE, b. SPE/AuNPs, c. SPE/P(AMT), d. SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarının Nyquist eğrileri

Geliştirilen elektrokimyasal aptasensörün her bir aşaması SEM ile görüntülenerek yüzey morfolojisindeki değişim incelendi. Elde edilen sonuçlar şekil 4.4'te gösterildi.



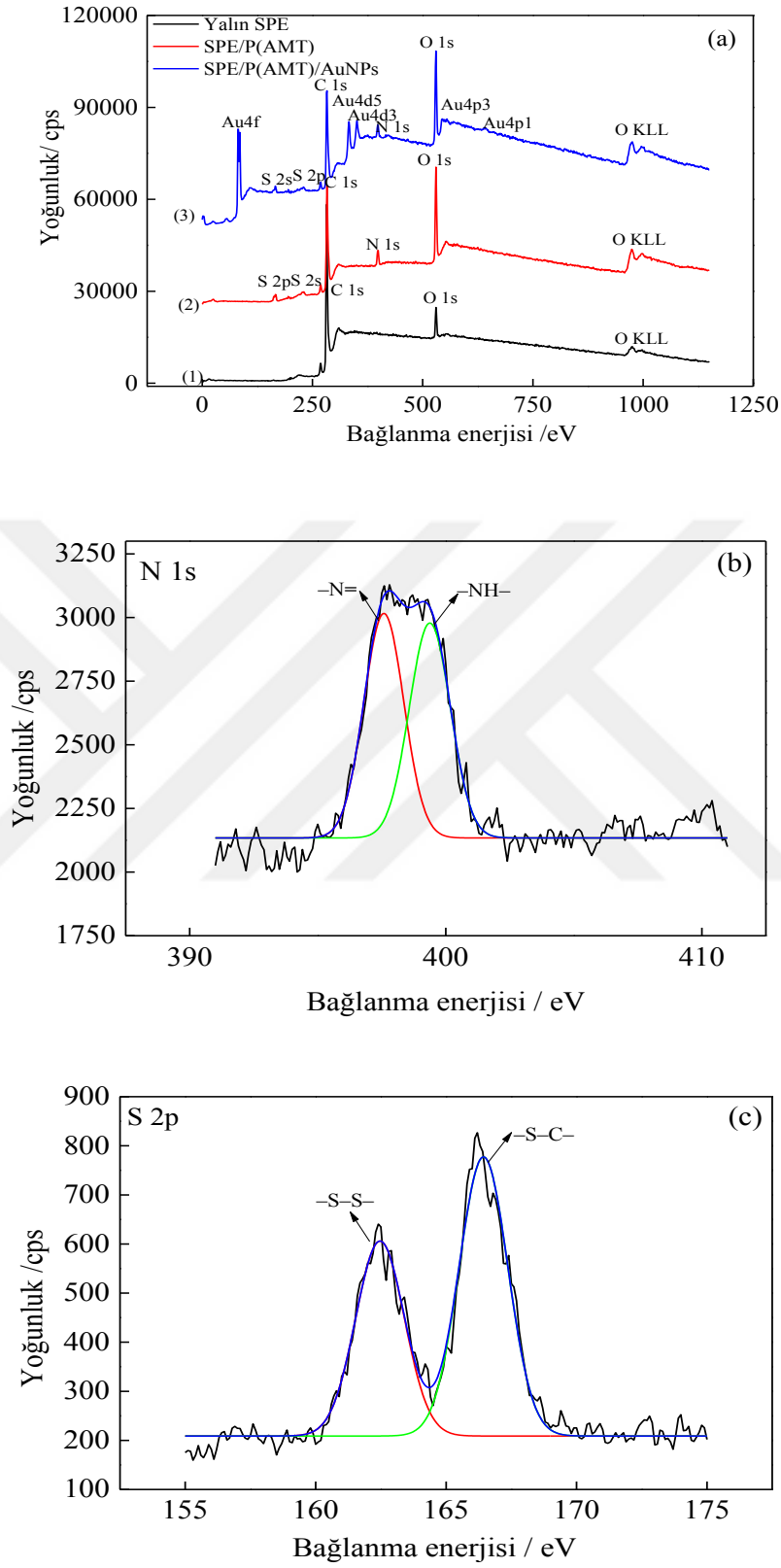
Şekil 4.5.a Yalın SPE, b. SPE/P(AMT), c,d. SPE/P(AMT)/AuNPs, e,f. SPE/ P (AMT)/ AuNPs/Apt1 elektrotlarının SEM görüntüleri

Yalın SPE (Şekil 4.4.a) ve SPE/P(AMT) (Şekil 4.4.b) elektrotlarının SEM görüntüleri incelendiğinde P(AMT)'nin ince bir film oluşturarak SPE yüzeyine kaplandığı ve yalın SPE yüzey porözitesini azalttığı görülmektedir. SPE/P(AMT) yüzeyine AuNPs'lerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesinin ardından yüzeyde homojen dağılımlı ve

nanoboyutta bulunan AuNPs şekil 4.4.c,d.'de görülmektedir. Modifikasyondan sonra, AuNPs'in polimer film üzerine homojen bir şekilde biriktirildiği görüldü. SPE/P(AMT) yüzeyine AuNPs'in yayılması, yüzey alanını arttırmış ve elektrokimyasal duyarlılığın artmasında neden olmuştur. SPE/P(AMT)AuNPs yüzeyine Apt1 immobilizasyonundan sonra ise AuNPs'lerin arasındaki boşlukların giderilerek Apt1'ler ile kaplandığı görüldü (Şekil 4.4.e,f.).

Hazırlanan elektrotların yüzeyinde biriktirilen P(AMT) ve AuNPs'lerin belirlenmesi amacıyla X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) ölçümleri alındı ve sonuçlar şekil 4.5'te verildi. XPS, elementlerin, anorganik bileşilerin, biyomedikal materyaller ve polimerlerin analizi ve yüzey karakterizasyonları için kullanılan bir tekniktir. XPS, malzemenin yüzeyi ile ilgili olarak atomik ve moleküler bilgi sağlanması amacıyla kullanılır. Çekirdek seviyelerinin incelenmesi ile yayılan fotoelektronların analiz edilmesiyle numune yüzeyinin bileşimi, elementin kimyasal çevresi ve yükseltgenme durumu hakkında bilgi verir. XPS, geniş bir malzeme yelpazesine uygulanabildiği ve incelenen materyalin yüzeyinden değerli niceliksel ve kimyasal durum bilgisi sağlayabildiği için en yaygın kullanılan yüzey analizi tekniğidir (Istone 1995).

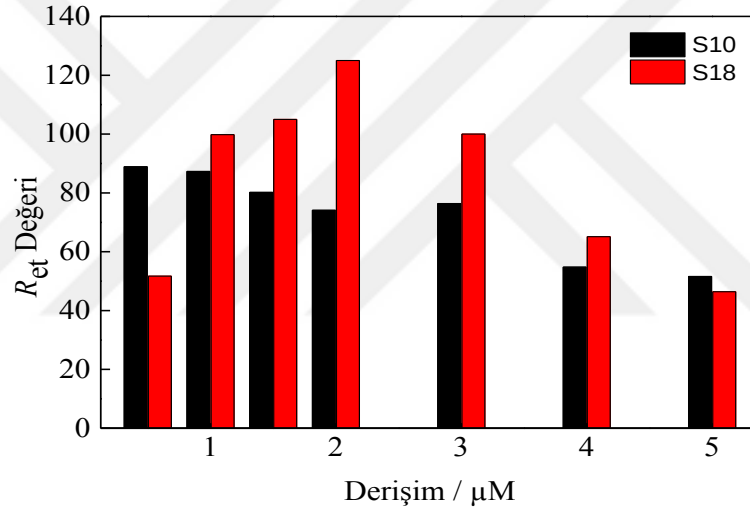
Şekil 4.5 (a)'da SPE (1), SPE/P(PAMT) (2) ve SPE/P(AMT)/AuNPs (3) elektrotlarına ait survey spektrumları incelendiğinde yalın SPE'de sadece C1s, O1s ve OKLL pikleri bulunmaktadır. Yalın SPE'de O1s pikinin gözlenmesinin hazırlama ve saklama işlemlerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Tığ vd. 2016). SPE/P(AMT) elektrotta bu piklere ek olarak S2p ve N1s piklerinin gelmesi yapıda polimerin varlığını göstermektedir (Şekil 4.5 (a) (2)). P(AMT) kaplı elektroda AuNPs biriktirilmesinin ardından Au'a ait pikler de görülmektedir (Şekil 4.5 (a) (3)). Genişletilmiş XPS spektrumları incelendiğinde N1s'e ait kimyasal çevresi farklı iki pik elde edildi (Şekil 4.5 (b)). Bu piklerin sırasıyla -N= (397,6 eV) ve -NH- (399,4 eV) olduğu belirlendi. S2p'ye ait XPS spektrumu incelendiğinde aromatik halkadaki -S-C- 165,2 eV'da gözlenirken, polimerizasyonun ardından elde edilen disülfid bağına ait pik ise 163,5 eV'da elde edildi (Şekil 4.5 (c)). Elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, SPE yüzeyine AuNPs ve P(AMT)'nin başarılı bir şekilde kaplandığı sonucuna varıldı (Kalimuthu ve John 2009)



Şekil 4.6.a (1) yalın SPE, (2) SPE/P(AMT) and (3) SPE/P(AMT)/AuNPs elektrotlarına ait XPS spektrumları, b. SPE/P(AMT) elektrotta N1s ve c. S2p için genişletilmiş XPS spektrumları

4.3 Aptamer 1 Dizisinin ve Miktarının Belirlenmesi

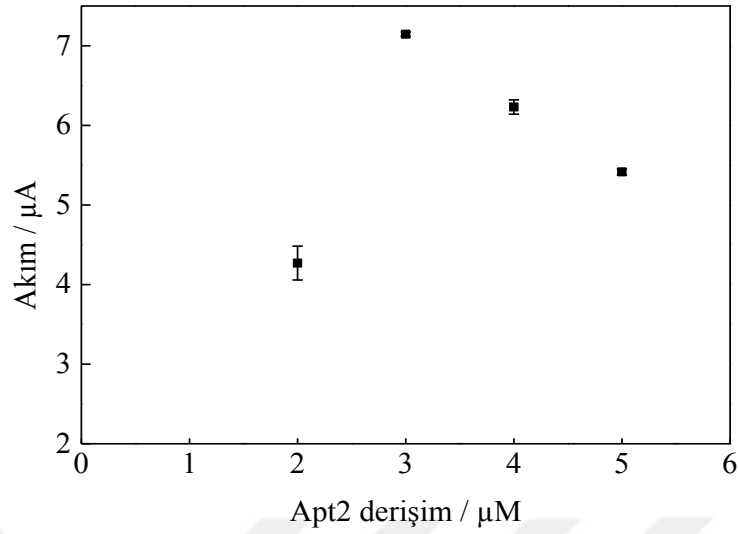
Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda S18 aptameri kullanılarak elde edilen R_{et} değerlerinin S10 aptameri ile elde edilen R_{et} değerlerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6). S18 aptamer miktarı arttıkça R_{et} değerlerinin 2 μM 'a kadar arttığı daha sonra ise azaldığı belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre optimum Apt1 dizisi ve derişimi sırasıyla S18 ve 2 μM olarak seçildi ve devam eden çalışmalarda bu dizi ve miktar kullanıldı. Rapini ve Marazza (2015) tarafından yapılan çalışmada da asetamiprit tayini için aynı aptamer dizisi kullanılmış ve optimum Apt1 miktarı 2 μM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7 S10 ve S18 dizilerinin 0,5-5,0 μM derişimleri için elde edilen R_{et} değerleri

4.4 Aptamer 2 Miktarının Belirlenmesi

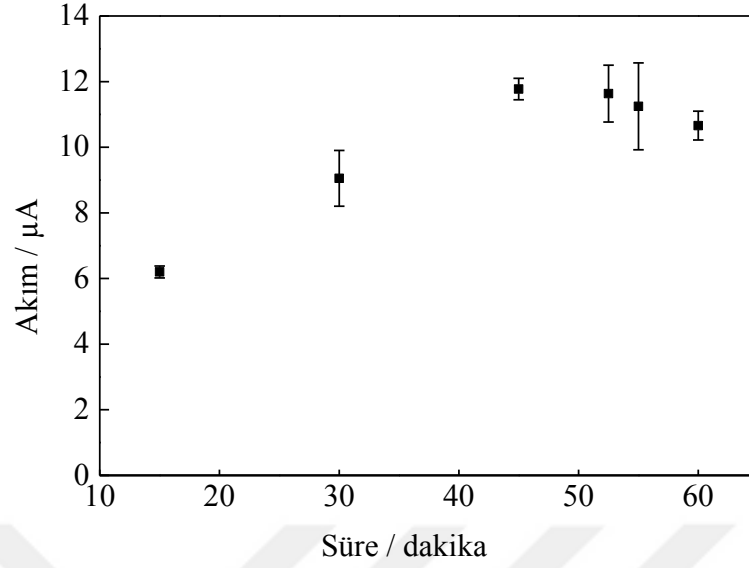
En uygun Apt1 miktarı belirlendikten sonra biotin ile işaretli ikinci aptamerin (S10-BIO) immobilizasyonuna geçildi. En uygun Apt2 miktarının belirlenmesi için Bölüm 3.4.4'te anlatılan işlemler uygulandı. Yapılan çalışmalar sonucunda optimum Apt2 miktarı 3 μM olarak bulundu.



Şekil 4.8 Apt2 (S10-BIO) dizisinin 2,0–5,0 μM derişimleri için elde edilen akım

4.5 SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 Elektrodunun Asetamiprit İle Etkileşim Süresinin Optimizasyonu

Optimum Apt1 ve Apt2 miktarlarının belirlenmesinden sonra modifiye elektrot ile tayini yapılacak ACE arasındaki etkileşim süresi çalışıldı. Bu aşamada, ACE miktarı sabit tutularak SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodu ACE ile belirli sürelerde (15; 30; 45; 52,5; 55 ve 60 dakika) etkileştirdi ve optimum etkileşim süresi belirlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda etkileşim süresi arttıkça α -naftol pik akımlarının 45. dakikaya kadar arttığı, daha sonra ise sabit kaldığı görüldü (Şekil 4.8). Elde edilen sonuçlara dayanarak optimum etkileşim süresi 45 dakika olarak belirlendi ve daha sonraki çalışmalarda da bu süre kullanıldı. Bulunan etkileşim süresi, asetamiprit tayini için geliştirilen diğer biyosensörlerde bulunan etkileşim süresine oldukça yakındır (Rapini ve Marazza 2015).



Şekil 4.9 SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodu ile ACE arasındaki etkileşim süresinin belirlenmesi

4.6 ACE İçin Çalışma Aralığının Belirlenmesi

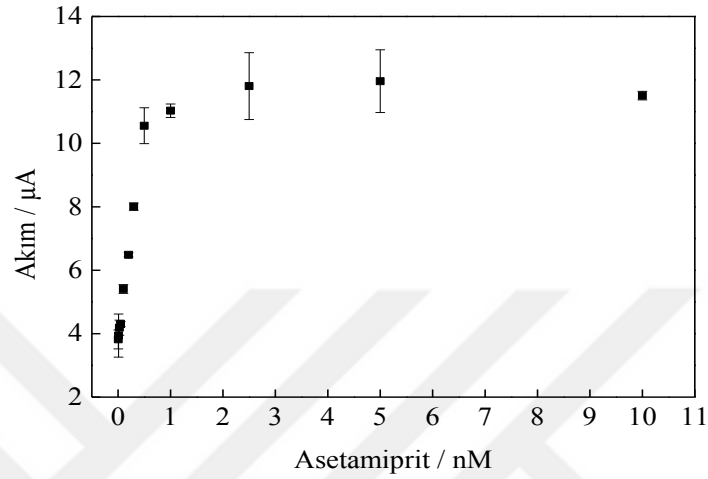
Çalışmanın bu aşamasında, elektrokimyasal tayini yapılan asetamipritin farklı derişimlerdeki çözeltileri kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi. Hazırlanan SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1 elektrodu üzerine 0,005–10 nM derişim aralığındaki ACE çözeltileri damlatılarak önceki bölümlerde anlatılan işlemler gerçekleştirildi. ACE için 0,005–0,5 nM derişim aralığında, $y=13,633x+3,81$ ($R^2=0,997$) eşitliğine uyan doğrusal bir çalışma aralığı elde edildi. 0,5 nM'dan sonra ise α -naftol yükseltgenme sinyallerinin sabit kaldığı görüldü. ACE için gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı (Tığ vd. 2016).

$$LOD=3s/m$$

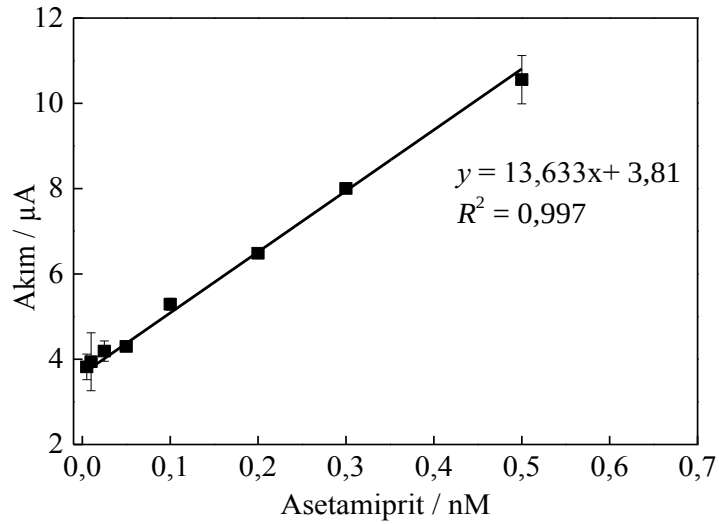
$$LOQ=10s/m$$

Asetamiprit için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,0015 nM ve 0,005 nM olarak bulundu. Geliştirilen aptasensör ile elde edilen çalışma aralığı ve tayin sınırının asetamiprit tayini için kullanılan diğer yöntemlerle kıyaslandığında (Jin vd. 2015; Rapini vd. 2016) daha düşük olduğu ve daha düşük derişimlerde ACE tayinini

gerçekleştirdiği sonucuna varıldı. Literatürde asetamiprit tayini için doğrusal çalışma aralığı 5-600 nM (Fan vd. 2013), 75 nM-7,5 μ M (Shi vd. 2013), 0,25-2 μ M (Rapini ve Marazza 2015), 0,001-2 μ M (Jin vd. 2016) ve 0-1500 nM olan biyosensörler de yer almaktadır.



Şekil 4.10 0,005–10 nM derişimlerde asetamipritin SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1-ACE-Apt2 elektrodu kullanılarak elde edilen α -naftol yükseltgenme sinyallerinin ortalamaları



Şekil 4.11 Asetamiprit için 0,005–0,5 nM derişim aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.7 Girişim Etkisi

Atrazin, omethoate, imidacloprid ve chlorpyrifos pestisitleri kullanılarak girişim etkisi incelendi ve sonuçlar çizelge 4.2’de gösterildi. Çizelge 4.2 incelendiğinde, her bir türün girişim etkisinin oldukça düşük olduğu ve ACE tayinini önemli ölçüde etkilemediği sonucuna varıldı.

Çizelge 4.2 ACE tayini için geliştirilen biyosensöre diğer türlerin girişim etkisi

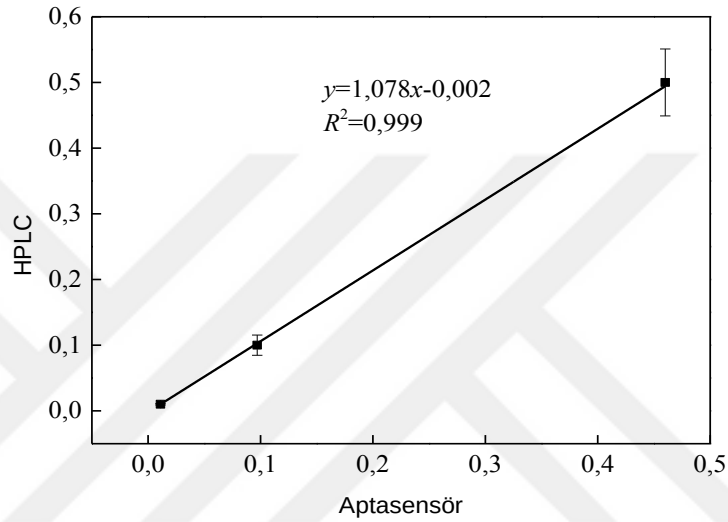
Girişim yapan tür	Derişim (nM)	%Girişim
Atrazin	0,05	-0,52
Omethoate	0,05	0,84
Imidacloprid	0,05	-6.65
Chlorpyrifos	0,05	-4,52

4.8 Tekrar Üretilirlik

Geliştirilen aptasensörün tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla birbirinden bağımsız olarak hazırlanan 7 elektrot kullanılarak DPV ölçümleri alındı. Elde edilen sonuçlardan yararlanarak % BSS değeri % 7,00 olarak hesaplandı. Bulunan bu % BSS değerinin oldukça düşük olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlara dayanarak, düşük %BSS değerine sahip olan bu aptasensörün tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğu ve asetamipritin hızlı ve duyarlı bir şekilde tayinine olanak sağladığı söylenebilir.

4.9 Geliştirilen Aptasensör ile Gerçek Numune Analizi

Geliştirilen aptasensörün pratik analizlerdeki uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, bölüm 3.4.9’da anlatıldığı gibi, Hacettepe Üniversitesi Teknokentte bulunan “Pestisit Tayinleri” ünitesinden alınan ACE içeren pestisit örnekleri geliştirilen aptasensör ile tayin edildi ve elde edilen sonuçlar şekil 4.11’de gösterildi.



Şekil 4.12 Pestisit numunelerindeki ACE tayininde yöntemlerin uyumluluğu

Elde edilen sonuçlar, geliştirilen aptasensör kullanılarak pestisit örneklerinde bulunan bazı girişim yapan türlerin etkisi olmaksızın, ACE tayininin başarılı bir şekilde yapılabileceğini göstermektedir.

Ayrıca, geliştirilen aptasensörün uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, atık su, domates ve salatalıkta bulunan asetamipritin tayini için de bu aptasensör kullanıldı. Atık su, domates ve salatalık örneklerine belirli miktarlarda ACE çözeltileri standart ekleme yöntemi ile eklendi ve geliştirilen aptasensör kullanılarak ölçümler alındı. Her bir örnek için % geri kazanımlar hesaplandı ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.3’de verildi. Geri kazanım değerleri %99,6 ile %106,0 arasında ve % BSS değerleri de düşük bulundu. Literatürde geri kazanım değerleri %93,8–105,0 (Jin vd 2016), %90,4–114,0 (Liu vd. 2016), %100,68–112,8 (Bai vd. 2013) olan çalışmalar bulunmaktadır.

Elde edilen sonuçlar, geliştirilen aptasensörün gıda örnekleri ve çevresel atıklardaki asetamiprit tayini için yeni bir elektrokimyasal yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.3 Farklı derişimlerdeki asetamiprit ile gerçek örnek analizi sonuçları

Numune	Eklenen (nM)	Bulunan (nM)	% Geri Kazanım	% BSS*
Atık su	0,0050	0,0049	99,6	4,69
	0,0500	0,0510	102,0	10,36
Domates	0,0050	0,0052	104,0	4,45
	0,0100	0,0106	106,0	2,04
	0,1000	0,1042	104,2	0,05
Salatalık	0,0100	0,0101	101,0	3,76
	0,1000	0,1040	104,0	1,06

*Her sonuç üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bilindiği üzere pestisitler tarım alanlarından yüksek verim elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Üretimlerinin ekonomik olmaları bilinçsiz ve denetimsiz bir şekilde kullanılmalarını da beraberinde getirmektedir. Bu durum, insan sağlığı ve çevreyi olumsuz etkilemektedir. Pestisitler hedef dışındaki organizmalara da çeşitli yollarla girmekte ve sinir sistemi, endokrin sistemi, bağışıklık sistemi, karaciğer, kas, kalp, kan, boşaltım ve diğer sistemleri olumsuz bir şekilde etkileyebilmektedir. Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile diğer su kaynaklarına ulaşabilirler. Eğim, bitki örtüsü, toprak tipi ve yağış miktarına bağlı olarak taşınan pestisitler, bu sularda balık ve diğer su organizmalarının yok olmasına, organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların gıda zincirine girmesine veya kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına neden olurlar. Ayrıca, pestisitlerin uzun süreli kullanımı kanser, mutasyon, doğumsal şekil bozuklukları gibi ciddi sağlık problemlerine de neden olabilmektedir. Bu nedenle atık sularda, toprakta, meyve ve sebzelerde bulunan pestisitlerin tayin edilmesi büyük bir önem taşımaktadır.

Tarımsal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ve doğada sıkça rastlanan bir pestisit türü olan asetamipritin tayini için mevcut yöntemlere alternatif olabilecek sandviç hibridizasyona dayalı aptamer temelli elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaç için, son yıllarda biyosensör uygulamalarında kullanılan perde baskılı elektrotlardan yararlanıldı. SPE'lerin yüzeyi ilk olarak elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak poli(5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadizol) ile kaplandı. Daha sonra altın nanopartiküller hem birincil aptamerlere immobilizasyon için geniş bir yüzey alanı sağlamak hem de ALP ile α -naftil fosfat arasında meydana gelecek elektriksel indirgenme sırasında elektrokimyasal sinyali yükseltmek için P(AMT) modifiyeli SPE yüzeyinde elektrokimyasal olarak biriktirildi. Ardından, SELEX yöntemi ile seçilmiş, tiyol grubuna sahip olan birinci aptamer yüzeye bağlandı. Yüzeye bağlı aptamer, asetamiprit ile etkileştirildi. İkinci aptamer ise analite özgü fakat Apt1'den farklı bir dizilime sahiptir ve biotin ile işaretlenmiştir. İkinci aptamer de analit ile etkileştirildi ve enzim işaretli basamağa geçildi. Yüzeye bağlı ikinci aptamer biotin ile modifiye

olduğundan streptavidin-alkalen fosfataz konjugatı ile etkileşimi sonucunda alkalen fosfataz yüzeye bağlandı. Alkale fosfatazın α -naftil fosfat ile etkileşimi sonucu oluşan ürün elektroaktif olduğundan alfa naftol üzerinden asetamiprit tayini yapıldı.

Optimizasyon parametreleri;

- ✓ Aptamer 1 dizisi ve miktarı: S18 ve 2 μ M
- ✓ Aptamer 2 miktarı: 3 μ M
- ✓ Elektrodun asetamiprit ile etkileşim süresi: 45 dakika olarak bulundu.

Geliştirilen aptasensör için;

- Çalışma aralığı 5×10^{-12} - 5×10^{-10} M,
- Gözlenebilirlik sınırı (3s/m) $1,5 \times 10^{-12}$ M,
- Tekrar üretilebilirlik çalışmalarında elde edilen bağıl standart sapma %7,00 olarak belirlendi.

Ayrıca, geliştirilen aptasensörün yalnızca asetamiprite özgü olduğunu kanıtlamak için atrazin, omethoate, imidacloprid ve chlorpyrifos pestisitleri kullanılarak girişim etkisi incelenerek her bir tür için % girişim değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, girişim etkisinin oldukça düşük olduğu ve ACE tayinini önemli ölçüde etkilemediği sonucuna varıldı.

Atık su, domates ve salatalık örnekleri kullanılarak geliştirilen aptasensörün gerçek numunelere uygulanabilirliği test edildi. Geri kazanım değerleri %99,6 ile %106,0 arasında bulundu ve önerilen yöntemin tatmin edici sonuçlarla gerçek örneklerdeki asetamiprit tayininde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Asetamiprit tayini için hazırlanan elektrokimyasal biyosensör için optimizasyon parametreleri ve elde edilen sonuçlar çizelge 5.1'de diğer biyosensörler ile karşılaştırıldı.

Çizelge 5.1 Asetamiprit için geliştirilen aptasensör ile diğer yöntemlerin kıyaslanması

Kullanılan Elektrot	Yöntem	Doğrusal Çalışma Aralığı	Alt Tayin Sınırı	Kaynak
GSPE/P(ANI)/AuNPs/oligo1/ACE/oligo2	DPV	0,25-2,0 μ M	0,086 μ M	Rapini vd. 2016
GCE/r-GONR-MWCNT/Au/Apt/MCH	İmpedimetri	5×10^{-14} - 1×10^{-5} M	$1,7 \times 10^{-14}$ M	Fei vd. 2015
GE/AuNPs/Apt/MCH	İmpedimetri	5-600 nM	1 nM	Fan vd. 2013
GCE/TiO ₂ -ACE	Voltametri	0,01-2 nM	0,2 nM	Jin vd. 2016
GCE/hemin-rGO	Kolorimetri	100 nM-10 μ M	40 nM	Yang vd. 2014
Triple-helix molecular switch (THMS)	Floresans	100-1200 nM	9,12 nM	Liu vd. 2016
Asetamiprit aptamer Modifiyeli ZnS:Mn probu (ZnS:Mn-Aptamer)	Floresans	0-150 nM	0,7 nM	Lin vd. 2016
GCE/Ag-NG/Aptamer/MCH	İmpedimetri	1×10^{-13} - 5×10^{-9} M	$3,3 \times 10^{-14}$ M	Jiang vd. 2015
SPE/P(AMT)/AuNPs/Apt1-ACE-Apt2	DPV	5×10^{-12} - 5×10^{-10} M	5×10^{-12} M	Bu çalışma

Çizelge 5.1, asetamiprit tayini için bu tez çalışmasında hazırlanan sandviç hibridizasyona dayalı aptamer temelli elektrokimyasal biyosensör ile asetamiprit tayini için diğer yöntemlerle hazırlanan biyosensör sonuçlarını göstermektedir. Çizelgede, geliştirilen aptasensörün diğer voltametrik yöntemlerle (Jin vd. 2015; Rapini vd. 2016) kıyaslandığında, asetamiprit tayinini oldukça hassas ve seçici bir şekilde gerçekleştirdiği görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, önemli bir pestisit türü olan asetamipritin hızlı, güvenilir ve duyarlı tayini için sandviç hibridizasyona dayalı bir aptamer temelli elektrokimyasal biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Geliştirilen yöntem ile tarımsal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir pestisit türü olan asetamipritin tayini için geleneksel yöntemlere üstünlük sağlayacak, duyarlılığı yüksek ve kullanımı kolay bir aptasensör geliştirildi. Geliştirilen aptasensörün pestisit tayinlerinde yaygın olarak kullanılan HPLC, GC-MS ve ELISA gibi geleneksel yöntemlere göre basit, hızlı ve maliyetinin düşük olması, uygulama alanlarının daha geniş olması, daha düşük tayin sınırlarında ve daha kısa sürede analiz yapma imkanı sunması gibi avantajlara sahip olduğu görüldü. Ayrıca, geliştirilen aptamer temelli sandviç yönteminin, diğer pestisit türlerinin nanomolar seviyelerinde, hassas ve seçici bir şekilde tayini için de kullanılabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Afonso, A. S., Uliana, C. V., Martucci D. H., and Faria, R. C. 2016. Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. *Talanta*, 146: 381-87.
- Altintas, Z., Guerreiro, A., Piletsky, S.A. and Tothill, I.E. 2015. NanoMIP based optical sensor for pharmaceuticals monitoring. *Sens. Actuators B Chem.* 213,305–313.
- Amelin, V. G., and Andoralov, A. M. 2016. High-performance liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry in the identification and determination of 111 pesticides in food, feed, water, and soil. *Journal of Analytical Chemistry*, 71: 82-93.
- Anonim. 2012. <http://www.megep.meb.gov.tr>
- Arya, S.K., Chaubey, A. and Malhotra, B. 2006. Fundamentals and applications of biosensors. *Proceedings-Indian National Science Academy*, 72(4), 249.
- Aydoğdu, G., Günendi, G., Zeybek, D. K., Zeybek, B. and Pekyardımcı, Ş. 2014. A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-mercapto-1, 3, 4-thiadiazole) modified glassy carbon electrode for the determination of nitrofurantoin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 197, 211-219.
- Bai, Y., Feng, F., Zhao, L., Wang, C., Wang H., Tian, M., Qin, J., Duan, Y. ve He. X. 2013. Aptamer/thrombin/aptamer-AuNPs sandwich enhanced surface plasmon resonance sensor for the detection of subnanomolar thrombin. *Biosensors and Bioelectronics*, 47: 265-70.
- Bala, R., Kumar, M., Bansal, K., Sharma, R. K. and Wangoo, N. 2016. Ultrasensitive aptamer biosensor for malathion detection based on cationic polymer and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 85: 445-49.
- Beiranvand, Z. S., Abbasi, A. R., Dehdashtian, S., Karimi, Z. and Azadbakht, A. 2017. Aptamer-based electrochemical biosensor by using Au-Pt nanoparticles, carbon nanotubes and acriflavine platform. *Analytical Biochemistry*, 518: 35-45.
- Bonanni, A., Loo, A. H. and Pumera, M. 2012. Graphene for impedimetric biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37: 12-21.
- Buerk, D.G. 1993. *Biosensors Theory and Applications*, Technomic Publishing, 221s. Pennsylvania, USA.

- Castro, R., Moyano, E. and Galceran, M.T. 2000. On-line ion-pair solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides. *Journal of Chromatography A*, 869(1–2), 441-449.
- Centi, S., Messina, G., Tombelli, S., Palchetti, I. and Mascini, M. 2008. Different approaches for the detection of thrombin by an electrochemical aptamer-based assay coupled to magnetic beads. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 1602-09.
- Cesarino, I., Moraes, F.C., Lanza, M.R.V. and Machado, S. A.S. 2012. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline–carbon nanotubes. *Food Chemistry*, 135 (3), 873-879.
- Chaubey, A. and Malhotra, B.D. 2002. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(6–7), 441-456.
- Coly, A. and Aaron, J.-J. 1998. Fluorimetric analysis of pesticides: Methods, recent developments and applications. *Talanta*, 46(5), 815-843.
- Corasaniti, M.T. and Nisticò, G. 1993. Determination of paraquat in rat brain by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 643(1), 419-425.
- Çetinkaya Acar, Ö. 2015. Pestisit Analizleri. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı.
- Degefa, T. H., Hwang, S., Kwon, D., Park, J. H. and Kwak, J. 2009. Aptamer-based electrochemical detection of protein using enzymatic silver deposition. *Electrochimica Acta*, 54(27), 6788-6791.
- Dinçkaya, E. Enzim sensörleri. In *Biyosensörler, Biyokimya Yaz Okulu Kitabı*, (Ed. A Telefoncu):81-142. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 1999.
- Dou, J., Ding, A., Cheng, L., Sekar, R., Wang, H. and Li, S. 2012. A screen-printed, amperometric biosensor for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. *Journal of Environmental Sciences*, 24 (5), 956-962.
- Escamilla-Gomez, V., Hernandez-Santos, D., Gonzalez-Garcia, M. B., Pingarron-Carrazon, J. M. and Costa-Garcia, A. 2009. Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2678–2683.
- Ellington, A. D. and Szostak, J. W. 1990. In Vitro Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands. *Nature*, 346 (6287), 818-822.

- Fan, L., Zhao, G., Shi, H., Liu, M. and Li, Z. 2013. A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid. *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 12–18.
- Fang, L., Lü, Z., Wei, H. and Wang, E. 2008. A electrochemiluminescence aptasensor for detection of thrombin incorporating the capture aptamer labeled with gold nanoparticles immobilized onto the thio-silanized ITO electrode. *Analytica Chimica Acta*, 628: 80-86.
- Fei, A., Liu, Q., Huan, J., Qian, J., Dong, X., Qiu, B., Mao, H. and Wang, K. 2015. Label-free impedimetric aptasensor for detection of femtomole level acetamiprid using gold nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotube-reduced graphene oxide nanoribbon composites. *Biosensors and Bioelectronics*, 70: 122-29.
- Freire, R.S., . Pessoa, C. A., Mello, L. D. and Kubota, L. T. 2003. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14, 230-243.
- Gursoy, O., Kınık, O. ve Kavas, G. 2002. Gıda güvenliği ve HACCP kapsamında süt teknolojisi açısından biyosensörlerin değerlendirilmesi. *Dünya Yayıncılık*, 62-30, İstanbul.
- Hall, E.A.H. 1990. *Biosensors*, Ch. 1: Biosensors in context, Open University Press, 3-30, London.
- Hatchett, D. W. and Josowicz, M. 2008. Composites of Intrinsically Conducting Polymers as Sensing Nanomaterials. *Chemical Reviews*, 108: 746-69.
- He, J.-B., Qi, F., Wang, Y. and Deng, N. 2010. Solid carbon paste-based amperometric sensor with electropolymerized film of 2-amino-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145(1), 480-487.
- He, J., Liu, Y., Fan, M. and Liu, X. 2011. Isolation and Identification of the DNA Aptamer Target to Acetamiprid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1582-1586.
- Heyrovský, J. 1922. *Chemické Listy*. The Chemical Record, 16, 256–264.
- Huizenga, D.E. and Szostak, J.W. 1995. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*, 34(2):656-65.
- Imamura, T., Yanagawa, Y., Nishikawa, K., Matsumoto, N. and Sakamoto, T. 2010. Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clinical toxicology*, 48: 851-53.

- Istone, W.K. 1995. X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS), In: Surface analysis of paper. Connors, T.E. ve Banerjee, S. (eds). 235-269, New York.
- Jain, A., Verma, K.K. and Townshend, A. 1993. Determination of paraquat by flow-injection spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 284(2), 275-279.
- Jarosch, F., Buchner, K. and Klussmann, S. 2006. In vitro selection using a dual RNA library that allows primerless selection. *Nucleic Acids Research*, 34: e86-e86.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. and Elbert, A. 2011. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2897-908.
- Jiang, D., Du, X., Liu, Q., Zhou, L., Dai, L., Qian, J., and Wang, K. 2015. Silver nanoparticles anchored on nitrogen-doped graphene as a novel electrochemical biosensing platform with enhanced sensitivity for aptamer-based pesticide assay. *Analyst*, 140: 6404-11.
- Jin, D., Xu, Q., Yu, L., Mao, A. and Hu, X. 2016. A novel sensor for the detection of acetamiprid in vegetables based on its photocatalytic degradation compound. *Food chemistry*, 194: 959-65.
- Jo, H., Her, J., Lee, H., Shim, Y. and Ban, C. 2017. Highly sensitive amperometric detection of cardiac troponin I using sandwich aptamers and screen-printed carbon electrodes. *Talanta*, 165: 442-48.
- Kalimuthu, P. and John, S. A. 2009. Nanostructured electropolymerized film of 5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole on glassy carbon electrode for the selective determination of l-cysteine. *Electrochemistry Communications*, 11: 367-70.
- Karadeniz, H. 2004. DNA analizlerine yönelik elektrokimyasal genosensörün tasarımı ve uygulamaları. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 2004, İzmir.
- Kesik, M., Kanik, F. E., Turan, J., Kolb, M., Timur, S., Bahadır, M. ve Toppare, L. 2014. An acetylcholinesterase biosensor based on a conducting polymer using multiwalled carbon nanotubes for amperometric detection of organophosphorous pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 205, 39-49.
- Kim, Y. S., Jung, H. S., Matsuura, T., Lee, H. Y., Kawai, T. and Gu, M. B. 2007. Electrochemical detection of 17 β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 2525-31.

- Kumar, S., Chauhan, N., Gopal, M., Kumar, R. and Dilbaghi, Neeraj. 2015. Development and evaluation of alginate–chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81: 631-37.
- Leandro, C.C., Hancock, P., Fussell, R. J. and Keely, B. J. 2006. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1103(1), 94-101.
- Li, Y., Qi, H., Peng, Y., Yang, J. and Zhang, C. 2007. Electrogenenerated chemiluminescence aptamer-based biosensor for the determination of cocaine. *Electrochemistry Communications*, 9: 2571-75.
- Lin, C., Katilius, E., Liu, Y., Zhang, J. and Yan, H. 2006. Self-assembled signaling aptamer DNA arrays for protein detection. *Angewandte Chemie*, 118: 5422-27.
- Lin, B., Yu, Y., Li, R., Cao, Y. and Guo, M. 2016. Turn-on sensor for quantification and imaging of acetamiprid residues based on quantum dots functionalized with aptamer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 229: 100-09.
- Liu, M., Yin, X. Ulin-Avila, E., Geng, B., Zentgraf, T., Ju, L., Wang, F. and Zhang X. 2011. A graphene-based broadband optical modulator. *Nature*, 474,64–67.
- Liu, X., Li, Y., Liang, J., Zhu, W., Xu, J., Su, R., Yuan, L. and Sun, C. 2016. Aptamer contained triple-helix molecular switch for rapid fluorescent sensing of acetamiprid. *Talanta*, 160: 99-105.
- Liu, S., Wang, Y., Xu, W., Leng, X., Wang, H., Guo, Y. and Huang, J. 2016 A novel sandwich-type electrochemical aptasensor based on GR-3D Au and aptamer-AuNPs-HRP for sensitive detection of oxytetracycline. *Biosens Bioelectron*, S0956-5663(16), 30775-8.
- Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G. and Mascini, M. 2002. Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. *Talanta*, 56: 949–957.
- Mairal, T., Nadal, P., Svobodova, M. and O'Sullivan, C. K. 2014. FRET-based dimeric aptamer probe for selective and sensitive Lup an 1 allergen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 207-10.
- Maity, A. and Biswas, M. 2006. Recent progress in conducting polymer, mixed polymer-inorganic hybrid nanocomposites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 12: 311-51.

- Malhotra, B.D. and Singhal, R. 2003. Conducting polymer based biomolecular electronic devices. *Pramana-Journal of Physics* 61.2, 331-343.
- Malhotra, Bansi D., Asha Chaubey, and S. P. Singh. 2006. Prospects of conducting polymers in biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 578: 59-74.
- Martín-Esteban, A. 2016. Recent molecularly imprinted polymer-based sample preparation techniques in environmental analysis *Trends Environ. Anal. Chem.* 9, 8–14.
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M. and Sattelle, D.B. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22: 573-80.
- Matveeva, E.G., Samsonova, J.V. and Eremin, S.A. 1997. A quenching fluoroimmunoassay for analysis of the pesticide propazine in an apolar organic solvent, reverse micelles of AOT in octane: Effect of the micellar matrix and labeled antigen structure. *Journal of Fluorescence*, 7(3), 211-216.
- McGarvey, B.D. 1993. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of N-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air. *Journal of Chromatography A*, 642(1), 89-105.
- McKeague, M., Giamberardino, A. and DeRosa, M. C. 2011. Advances in aptamer-based biosensors for food safety. INTECH Open Access Publisher Environmental Biosensors. Editor: Somerset, V. Croatia: InTech.
- Mercey, R., Lantier, I., Maurel, M.C., Grosclaude, J., Lantier, F. and Marc, D. 2006. Fast, reversible interaction of prion protein with RNA aptamers containing specific sequence patterns. *Arch Virol*, 151(11):2197-214.
- Mello, L.D. and Kubota L.T. 2001. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, Vol. 77; pp. 237-256.
- Monk, P.M.S. 2001. Fundamentals of electroanalytical chemistry, Wiley, 342, New York.
- Moye, H.A. and Wade, T.E. 1976. A Fluorometric Enzyme Inhibition Detector for Carbamate Pesticide Analysis by High Speed Liquid Chromatography. *Analytical Letters*, 9(10), 891-920.
- Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J. and Rogers, K.R. 2001. "Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides", *Biosensors and Bioelectronics*, 16(4–5), 225-230.

- O'Dea, J. J., Osteryoung, J. and Osteryoung, R. A. 1981. Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. *Analytical Chemistry*, 53: 695-701.
- Ozaki, H., Nishihira, A., Wakabayashi, M., Kuwahara, M. and Sawai, H. 2006. Biomolecular sensor based on fluorescence-labeled aptamer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 4381-84.
- Parham, H. and Rahbar, N. 2010. Square wave voltammetric determination of methyl parathion using ZrO₂-nanoparticles modified carbon paste electrode. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), 1077-1084.
- Picó, Y., Rodríguez, R. and Mañes, J. 2003. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(3), 133-151.
- Qi, Y., Xiu, F., Zheng, M. and Li, B. 2016. A simple and rapid chemiluminescence aptasensor for acetamiprid in contaminated samples: Sensitivity, selectivity and mechanism. *Biosensors and Bioelectronics*, 83: 243-49.
- Ragas, Ad M. J., Oldenkamp, R., Preeker, N. L., Wernicke, J. and Schlink, U. 2011. Cumulative risk assessment of chemical exposures in urban environments. *Environment International*, 37: 872-81.
- Rapini, R. and Marrazza, G. 2015. DNA technology for small molecules sensing: a new approach for Acetamiprid detection. In *AISEM Annual Conference, 2015 XVIII*, 1-4. IEEE.
- Ricci, F., Adometto, G. and Palleschi, G. 2012. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, 84, 74-83.
- Riskin, M., Tel-Vered, R., Lioubashevski, O. and Willner, I. 2009. Ultrasensitive Surface Plasmon Resonance Detection of Trinitrotoluene by a Bis-aniline-Cross-Linked Au Nanoparticles Composite. *Journal of the American Chemical Society*, 131: 7368-78.
- Saberi, R.-S., Shahrokhian, S. and Marrazza, G. 2013. Amplified Electrochemical DNA Sensor Based on Polyaniline Film and Gold Nanoparticles. *Electroanalysis*, 25(6), 1373-1380.
- Schoukroun-Barnes, L. R., Wagan, S. and Ryan White, J. 2014. Enhancing the Analytical Performance of Electrochemical RNA Aptamer-Based Sensors for Sensitive Detection of Aminoglycoside Antibiotics. *Analytical Chemistry*, 86: 1131-37.

- Seccia, S., Fidente, P., Barbini, D. A. and Morrica, P. 2005. Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 553, 21–26.
- Serafin, V., Eguílaz, M., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P. and Pingarrón, J. M. 2011. An Electrochemical Immunosensor for Testosterone Using Gold Nanoparticles – Carbon Nanotubes Composite Electrodes. *Electroanalysis*, 23(1), 169-176.
- Sharma, S.K., Sehgal, N. and Kumar, A. 2003. Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*, Vol. 3, pp. 307-316.
- Sharma, R., Ragavan, K., Thakur, M. and Raghavarao, K. 2015. Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants. *Biosens. Bioelectron.* 74, 612–627.
- Shi, H., Zhao, G., Liu, M., Fan, L. and Cao, T. 2013. Aptamer-based colorimetric sensing of acetamiprid in soil samples: Sensitivity, selectivity and mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 754–761.
- Shivhare, P. and Gupta, V.K. 1991. Spectrophotometric method for the determination of paraquat in water, grain and plant materials. *Analyst*, 116(4), 391-393.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. and Crouch, S.R. 2004. (Çeviri editörleri: Kılıç, E. and Yılmaz, H.) *Analitik Kimya Temel ilkeler I*, 8. Baskı, Bilim Yayıncılık, 706 p., Ankara-Türkiye.
- Srivastava, S. and Kotov, N. A. 2008. Composite Layer-by-Layer (LBL) Assembly with Inorganic Nanoparticles and Nanowires. *Accounts of Chemical Research*, 41: 1831-41.
- Taleat, Z., Cristea, C., Marrazza, G., Ardakani, M. and Sandulescu, M. R. 2014. Electrochemical immunoassay based on aptamer–protein interaction and functionalized polymer for cancer biomarker detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 717-718, 119–124.
- Tang, J., Su, B., Tang, D. and Chen, G. 2010. Conductive carbon nanoparticles-based electrochemical immunosensor with enhanced sensitivity for α -fetoprotein using irregular-shaped gold nanoparticles-labeled enzyme-linked antibodies as signal improvement. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (12), 2657–2662.
- Tapsoba, I., Bourhis, S., Feng, T. and Pontie, M. 2009. Sensitive and Selective Electrochemical Analysis of Methyl-parathion (MPT) and 4-Nitrophenol (PNP) by a New Type p-NiTSPc/p-PPD Coated Carbon Fiber Microelectrode (CFME). *Electroanalysis*, 21(10), 1167-1176.

- Tcheumi, H.L., Tonle, I. K., Ngameni, E. and Walcarius, A. 2010. Electrochemical analysis of methylparathion pesticide by a gemini surfactant-intercalated clay-modified electrode. *Talanta*, 81(3), 972-979.
- Telefoncu, A. 1997. Enzimoloji, Lisans Üstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Aydın-Türkiye, 446.
- Telefoncu, A. 1999. Biyosensörler, Lisans Üstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Aydın- Türkiye, 280s.
- Tığ, G.A., Zeybek, B. and Pekyardımcı, Ş. 2016. Electrochemical DNA biosensor based on poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) modified glassy carbon electrode for the determination of anticancer drug gemcitabine. *Talanta*, 154, 312-321.
- Tian, Y., Wang Y., Sheng, Z., Li, T. and Li, X. 2016. A colorimetric detection method of pesticide acetamiprid by fine-tuning aptamer length. *Analytical Biochemistry*, 513: 87-92.
- Tomita, M., Okuyama, T. and Nigo, Y. 1992. Simultaneous determination of paraquat and diquat in serum using capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 6(2), 91-94.
- Tombelli, S., Minunni, M. and Mascini, M. 2005. Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (12), 2424–2434.
- Türkiye İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği. Pestisit ve pestisitlerin sınıflandırılması.
- Uyar, D., Güven Ö. ve Artıktay, I. Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı.
- Velasco-Garcia, M.N. and Mottram T. 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosensing Engineering*, 84(1), 1-12.
- Viswanathan, S., Rani, C. and Ho, J.A. 2012. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode. *Talanta*, 94, 315-319.
- Wang, J. 2000. Analytical electrochemistry. John Wiley and Sons. Inc., 186. NewYork.
- Wang, J. 2005. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130: 421-26.
- Wang, J. 2006. Analytical electrochemistry, methodology and applications of dynamic techniques. Third edition, John Wiley, 250 p., New Jersey.

- Wang, Y., Li, Z., Hu, D., Lin C., Li, J. and Lin Y. 2010. Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 132: 9274-76.
- Wang, W., Wang, W., Luo, X. and Davis, J. J. 2015. Ultrasensitive and selective voltammetric aptasensor for dopamine based on a conducting polymer nanocomposite doped with graphene oxide. *Microchimica Acta*, 182(5), 1123-1129.
- Weerathunge, P., Ramanathan, R., Shukla, R., Sharma, T.K. and Bansal.,V. 2014. Aptamer-Controlled Reversible Inhibition of Gold Nanozyme Activity for Pesticide Sensing. *Analytical Chemistry*, 86: 11937-41.
- Wijaya, W., Pang, S., Labuza, T. P. and He, L. 2014. Rapid Detection of Acetamiprid in Foods using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). *Journal of food science*, 79: T743-T47.
- Willner, I., Willner, B. and Tel-Vered, R. 2011. Electroanalytical applications of metallic nanoparticles and supramolecular nanostructures. *Electroanalysis*, 23: 13-28.
- Yamamoto, I. and Casida., J. E. 1999. Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor (Springer).
- Yang, Z., Qian J., Yang, X., Jiang, D., Du, X., Wang, K., Mao, H. and Wang, K. 2015. A facile label-free colorimetric aptasensor for acetamiprid based on the peroxidase-like activity of hemin-functionalized reduced graphene oxide. *Biosensors and Bioelectronics*, 65: 39-46.
- Xiao, Y., and Li, C. M. 2008. Nanocomposites: from fabrications to electrochemical bioapplications. *Electroanalysis*, 20: 648-62.
- Zhang, W., Asiri, A.M., Liu, D., Du, D. and Lin Y. 2014. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. *Trends in Analytical Chemistry* 54, 1–10.
- Zhou, L. Li, D., Gai, L., Wang, J. and Li, Y. 2012. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 162: 201-08.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa Barış KOÇER

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi: 19.11.1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Başkent Anadolu Lisesi (2010)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2014)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
(Eylül 2014- Haziran 2017)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2017-

Uluslararası Kongre

Koçer, M. B., Tığ, G. A., Bolat, E. Ö. and Pekyardımcı, Ş. Development of Electrochemical Biosensors Based on Aptamer for Pesticide Detection. Biosensors 2016, Gothenburg, Sweden, Poster, 25-27/05/2016.

Koçer, M. B., Tığ, G. A., Günendi, G. and Pekyardımcı, Ş. A Disposable Voltammetric Aptasensor Based On Sandwich Assay For Pesticide Detection. BIOMED 2017, Ankara, Turkey, Poster.