ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİZOZİMİN HASSAS VE SEÇİCİ TAYİNİNE YÖNELİK APTAMER TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI

Niran Öykü ERDOĞAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LİZOZİMİN HASSAS VE SEÇİCİ TAYİNİNE YÖNELİK APTAMER TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI

Niran Öykü ERDOĞAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gözde AYDOĞDU TIĞ

Bu tez çalışması kapsamında gıda alerjeni olan lizozimin (Lyz) hassas ve seçici tayini için MIP-Apt temelli elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmiştir. Lyz, gıda endüstrisinde inceltici ve antibakteriyel ajan olarak kullanılır. Lyz duyarlı bireyler için risk oluşturan bir alerjendir. Aynı zamanda birçok hastalığın teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında hem gıda endüstrisinde hem de medikal alanda önemli bir yere sahip olan Lyz alerjeninin tayini, grafen oksit (GO) ve altın nanopartikül (AuNP) ile modifiye edilen perde baskılı grafik elektrotlar (AuNP/GO/SPE) ile yapılmıştır. Hazırlanan biyosensörde hem aptamer (Apt) biyobileşeninin hem de moleküler baskılı polimer (MIP) teknolojisinin avantajlarından yararlanılmıştır. Elde edilen MIP-Apt/AuNP/GO/SPE sensör yüzeyi üzerinde diferansiyel puls voltametrisi (DPV), dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile yapılan tüm ölçümlerde $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu kullanılmıştır Sensörün yüzey karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), CV, DPV ve EIS yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Geliştirilen sensör ile Lyz tayini gerçekleştirilmiştir. Uygun koşullar altında doğrusal çalışma aralığı 0,001-100 pM, gözlenebilme sınırı (LOD) 0,00367 pM ve alt tayin sınırı (LOQ) 0,012 pM olarak belirlenmiştir. Biyosensörün seçicilik, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve depolama kararlılığı parametreleri incelenmiştir. Gerçek örnekler üzerinde yapılan uygulamalarda yerel marketten alınmış vişne suyu, karışık meyve suyu ve kırmızı şarap örnekleri kullanılmış ve %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Haziran 2023, 76 sayfa

Anahtar Kelimeler: Lizozim, Elektrokimya, Biyosensörler, MIP, Aptamer

ABSTRACT

Master Thesis

PREPARATION AND APPLICATIONS OF APTAMER-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR THE SENSITIVE AND SELECTIVE DETERMINATION OF LYSOZYME

Niran Öykü ERDOĞAN

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gözde AYDOĞDU TIĞ

In this thesis, an electrochemical biosensor based on MIP-Apt was developed for the sensitive and selective determination of lysozyme (Lyz), a food allergen. Lyz is used in the food industry as a thinning and antibacterial agent. Lyz is an allergen that poses a risk to susceptible individuals. It is also used as a biomarker in the diagnosis of many diseases. Within the scope of this thesis, the determination of Lyz allergen, which has an important place in both the food industry and the medical field, was made with screen printed graphic electrodes (AuNP/GO/SPE) modified with graphene oxide (GO) and gold nanoparticle (AuNP). The advantages of both aptamer (Apt) biocomponent and molecular imprinted polymer (MIP) technology were utilized in the prepared biosensor. Fe(CN)63-/4- redox probe was used in all measurements made with differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) on the obtained MIP-Apt/AuNP/GO/SPE sensor surface. Surface characterization was performed using scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), CV, DPV and EIS methods. Lyz determination was carried out with the developed sensor. Under appropriate conditions, the linear working range was determined as 0.001-100 pM, the limit of detection (LOD) of 0.00367 pM, and the lower limit of detection (LOQ) of 0.012 pM. The selectivity, reproducibility, reproducibility and storage stability parameters of the biosensor were investigated. In the applications made on real samples, sour cherry juice, mixed fruit juice and red wine samples from the local market were used and the % recovery values were calculated.

June 2023, 76 pages

Key Words: Lysozyme, Electrochemistry, Biosensors, MIP, Aptamer

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatımın ilk gününden itibaren bilgisi ve tecrübesinden yararlandığım, tez çalışmalarım boyunca öneri ve yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmalarımı dikkatle takip eden, sosyal ve akademik hayatımda benim için çok önemli bir yere sahip olan, sayesinde etik ve disiplin kavramlarını hayatımın her alanı ile bütünleştirdiğim saygıdeğer danışman hocam Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gözde AYDOĞDU TIĞ'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Birlikte çalışmaya başladığımız andan itibaren hiçbir tecrübesini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, uyum sürecimin kahramanı Uzm. Nazlı ŞİMŞEK'e ve sonsuz fikir alışverişleri ile ufkumu daima genişleten, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan Dr. Kübra TURAN'a teşekkürlerimi borç bilirim. Yüksek lisans çalışmalarım boyunca Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen 2210/A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında bursiyeri olduğum Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) sağlamış olduğu maddi desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Araştırma Üniversiteleri Destek Programı (ADEP) tarafından yürütülen FBA-2022-2628 numaralı proje desteği ile katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü'ne maddi yardımlardan dolayı çok teşekkür ederim.

Son olarak; tüm eğitim hayatımda bir meleğin kanatları gibi ellerini daima sırtımda hissettiğim annem Nimet ERDOĞAN ve babam Emre ERDOĞAN'a, attığım her adımda ismini zikrettiğim, idolüm, canım teyzem Semiha Balki BOĞA'ya sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Niran Öykü ERDOĞAN
Ankara, Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK ..... **i**

ÖZET ..... **ii**

ABSTRACT ..... **iii**

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iv**

SİMGELER DİZİNİ ..... **viii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **3**

2.1 Gıda Alerjisi **3**

2.2 Gıda Alerjisi İstatistik Bilgileri **5**

2.3 Gıda Alerjenleri **7**

2.3.1 Süt alerjenleri **8**

2.3.2 Yumurta alerjenleri **8**

2.3.3 Yer fıstığı alerjenleri **11**

2.3.4 Soya alerjenleri **12**

2.3.5 Kabuklu deniz ürünleri ve balık alerjenleri **12**

2.3.6 Kabuklu ağaç yemişleri ve buğday alerjenleri **12**

2.4 Standart Alerjen Tespit Yöntemleri **14**

2.4.1 Enzim etiketli immünosorbent assay (ELISA) **14**

2.4.2 Yanal akış testi (LFD) **15**

2.4.3 Kütle spektroskopisi (MS) **15**

2.4.4 Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) analizi **16**

2.5 Biyosensörler **16**

2.5.1 Elektrokimyasal biyosensörler **18**

2.5.2 Aptamerler (Apt'ler) **19**

2.5.3 Moleküler baskılı polimerler (MIP) **19**

2.6 Voltametrik Yöntemler **21**

2.7 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) **25**

2.8 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi **26**

2.9 Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) **26**

2.10 Duyarlılık **26**

2.11 Sensör Cevabının Tekrarlanabilirliği ve Sensörün Tekrar Üretilebilirliği **27**

2.12 Doğrusal Çalışma Aralığı, Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Alt Tayin Sınırı (LOQ) **27**

3. KAYNAK ÖZETLERİ **29**

4. MATERYAL VE YÖNTEM **34**

4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler **34**

4.2 Kullanılan Cihaz Sistemleri ve Diğer Ekipmanlar **36**

4.3 Yapılan elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan parametreler **38**

4.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlık Aşamaları **38**

4.4.1 Grafen oksit (GO) çözeltisinin hazırlanması **38**

4.4.2 $HAuCl_4$ çözeltisinin hazırlanması **38**

4.4.3 Lyz çözeltilerinin hazırlanması **39**

4.4.4 Apt çözeltilerinin hazırlanması **39**

4.4.5 Aptamer-Lizozim (Apt[Lyz]) kompleks çözeltisinin hazırlanması **39**

4.4.6 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin hazırlanması **39**

4.4.7 *o*rto-fenilendiamin (*o*PD) çözeltisinin hazırlanması **39**

4.4.8 SDS:AA uzaklaştırma çözeltisinin hazırlanması **40**

4.4.9 Girişim yapan madde çözeltilerinin hazırlanması **40**

4.4.10 Gerçek numune çözeltilerinin hazırlanması 40

4.4.11 pH 8 TRIS-EDTA (TE) tampon çözeltisinin hazırlanması 40

4.4.12 pH 7,4 TRIS-HCl tampon çözeltisinin hazırlanması 41

4.5 Lyz Tayini için MIP-Apt Temelli Sensörün Hazırlanması 41

4.5.1 Biyosensör yüzeyinin modifikasyon aşamaları 41

4.5.2 MIP-Apt temelli biyosensör yüzeyinde MIP oluşumu 41

5. BULGULAR ve TARTIŞMA 44

5.1 MIP-Apt Temelli Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu 44

5.2 Tarama Hızı Çalışması 46

5.3 MIP-Apt Temelli Sensörün Yüzey Karakterizasyonu 48

5.4 Deneysel Koşulların Belirlenmesi 51

5.4.1 GO derişim optimizasyonu 51

5.4.2 AuNP elektrobiriktirme döngü sayısı optimizasyonu 52

5.4.3 *o*PD elektropolimerizasyon döngü sayısı optimizasyonu 53

5.5 Lizozimin Elektrokimyasal Tayini ve Kalibrasyon Çalışması 56

5.6 MIP-Apt Temelli Sensörün Seçicilik Çalışmaları 57

5.7 MIP-Apt Temelli Biyosensörden Elde Edilen Sonuçların Tekrarlanabilirliği ve Biyosensörün Tekrar Üretilebilirliğinin İncelenmesi ... 58

5.8 MIP-Apt Temelli Sensörün Depolama Kararlılığı Çalışması 59

5.9 Gerçek Gıda Numunelerindeki Lizozimin MIP-Apt Temelli Sensör ile Analiz Edilmesi 60

6. SONUÇ 62

KAYNAKLAR 66

ÖZGEÇMİŞ 76

SİMGELER DİZİNİ

µA	Mikro amper
µg	Mikro gram
µL	Mikro litre
µM	Mikro molar
ºC	Santigrat derece
a	Ağırlık
Au	Altın
C_{dl}	Çift katmanlı kapasitans
E	Potansiyel
E_{pa}	Anodik pik potansiyeli
E_{pc}	Katodik pik potansiyeli
fM	Femtomolar
g	Gram
h	Hacim
H	Hidrojen
$HAuCl_4$	Tetrakloroaurikasit
HCl	Hidroklorik asit
He	Helyum
I	Akım
I_{pa}	Anodik pik akımı
I_{pc}	Katodik pik akımı
K	Güvenilirlik sayısı
$K_3Fe(CN)_6$	Potasyum ferrisiyanür
$K_4Fe(CN)_6.3H_2O$	Potasyum ferrosiyanür
KCl	Potasyum Klorür
K_d	Denge sabiti
kΩ	Kilo ohm
m	Eğim
M	Molar
Mg	Miligram
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nM	Nanomolar
pg	Pikogram
pM	Pikomolar
R_{ct}	Yük transfer direnci
R_s	Çözelti direnci
S	Saniye
V	Volt
Z_w	Warburg impedansı
Ω	Ohm

Kısaltmalar

A2m	Alfa 2 Makroglobülin
AA	Asetik asit
AFB1	Aflatoksin B1
AFM	Atomik kuvvet mikroskopisi
AgNP	Gümüş nanopartiküller
Alb	Albümin
Apt	Aptamer
Apt[Lyz]	Aptamer-Lizozim Kompleksi
AuNP	Altın Nanopartikül
AβO	Amiloid-β oligomerleri
BSA	Sığır serum albümini
BSS	Bağıl standart sapma
CAP	Kloramfenikol
Cas	Kazein
cCNT	Karboksillenmiş karbon nanotüp
CV	Dönüşümlü voltametri
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ELISA	Enzim etiketli immünosorbent assayi
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GCE	Camsı karbon elektrot
GO	Grafen Oksit
HIS	Histamin
Hp	Haptoglobin
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kramotografisi
IgA	Immünoglobulin A
IgE	Immünoglobulin E
IgG	Immünoglobulin G
IgM	Immünoglobulin M
IUIS	Uluslararası İmmünoloji Dernekler Birliği
IUPAC	Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği
kDa	Kilodalton
LFD	Yanal Akış Testi
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
Lyz	Lizozim
MIP	Moleküler baskılı polimer
MS	Kütle Spektroskopisi
MWCNT	Çoklu Duvarlı Karbon Nanotüp
Myg	Miyoglobin
NIP	Moleküler baskılı olmayan polimer
*o*PD	orto-fenilen diamin
P4	Progesteron

PCR	Polimeraz zincir tepkimesi
p*o*PD	Poli-*o*-fenilendiamin
PPy	Polipirol
PSA	Prostat spesifik antijen
RAC	Raktopamin
RMS	Karekök ortalama
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SPE	Perde Baskılı Elektrot
TE	TRIS-EDTA
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 IgE'nin molekül yapısı. CL: hafif zincir, C_H1, C_H2, C_H3: ağır zincir, Fab: Antijen bağlayıcı parça, Fc: kristalize parça 4

Şekil 2.2 Tayvan'da (A) pediyatrik grup, (B) yetişkin grupta gıda alerjisi görülme sıklığının 2004 ve 2017 yıllarına ait veriler ile karşılaştırılması (Hata çubukları %95 güven aralığını temsil etmektedir.) 6

Şekil 2.3 Tavuk yumurtasının akından izole edilmiş Lyz yapısının şematik olarak gösterimi. Gösterimin α-domain bölümünde A, B, C ve D olmak üzere 4 sarmal yer almaktadır 10

Şekil 2.4 Bitki kaynaklı alerjen bileşenlerinin üç boyutlu yapılarının şematik olarak gösterimİ 13

Şekil 2.5 Yanal akış testinin temel yapısı 15

Şekil 2.6 Bir biyosensörün şematik diyagramı 17

Şekil 2.7 MIP oluşumunun şematik olarak gösterimi 20

Şekil 2.8 Tipik bir dönüşümlü voltamogram ($İ_{pc,a}$: anodik ve katodik pik noktaları, tersinir tepkime) 22

Şekil 2.9 (A) DPV için potansiyel dalga formu (B) Tipik bir DPV eğrisi 23

Şekil 2.10 Randles eşdeğer devre modeli 24

Şekil 2.11 Nyquist eğrisinin şekilsel gösterimi 25

Şekil 4.1 DropSense DRP-110 perde baskılı elektrot 36

Şekil 4.2 (A) Autolab-PGSTAT 302N ve (B) Palmsens4 potansiyostat/galvanostat ölçüm cihazı 37

Şekil 4.3 MIP-Apt temelli biyosensörün üretim aşamalarının şematik olarak gösterimi 43

Şekil 5.1 Sensörün hazırlık aşamalarının (a) SPE, (b) GO/SPE, (c) AuNP/GO/SPE, (d) Apt[Lyz]/AuNP/GO/SPE, (e) MIP-Apt/AuNP/GO/SPE uzaklaştırma öncesi, (f) MIP-Apt/AuNP/GO/SPE uzaklaştırma sonrası (sensör), (g) MIP-Apt/AuNP/GO/SPE yeniden bağlanma sonrası (A) DPV eğrileri, (B) Nyquist eğrileri (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl redoks çözeltisi içerisinde) 46

Şekil 5.2 (A) SPE, (B) GO/SPE, (C) AuNP/GO/SPE elektrotlarına ait tarama hızı çalışmaları 48

Şekil 5.3 (A) SPE, (B) GO/SPE, (C) AuNP/GO/SPE ve (D) Apt/AuNP/GO/SPE yüzeylerinin SEM görüntüleri 49

Şekil 5.4 (A) NIP, (B) uzaklaştırma çözeltisi ile yıkanmış MIP, (C) 10 nM Lyz ile yeniden bağlanmış MIP modifiye elektrotların AFM mikrografları 50

Şekil 5.5 (A) (a) AuNP/GO/SPE ve (b) Apt/AuNP/GO/SPE'nin XPS spektrumları; (B) AuNP/GO/SPE, (C) Apt/AuNP/GO/SPE'nin genişletilmiş XPS spektrumları 51

Şekil 5.6 SPE yüzeyi üzerine (a) 0 mg mL^{-1}, (b) 0,5 mg mL^{-1}, (c) 1 mg mL^{-1}, (d) 1,5 mg mL^{-1}, (e) 2 mg mL^{-1} GO miktarlarında GO ile modifikasyonun (A) CV ve (B) Nyquist eğrileri (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde)....52

Şekil 5.7 GO/SPE yüzeyi üzerine (a) 10, (b) 15, (c) 20, (d) 25, (e) 30 döngü sayılarında elektrobiriktirilmiş AuNP ile elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) Nyquist eğrileri (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl çözeltisinde).53

Şekil 5.8 (A) Modifiye elektrot üzerine 50 mVs^{-1} tarama hızında, (0 V)-(+0,8 V) potansiyel aralığında, 30 döngü sayısında yapılan *o*PD elektropolimerzasyonunun CV eğrileri, (B) Farklı elektropolimerizasyon döngü sayılarının DPV'den elde edilen redoks pik akımı değerlerine etkisi (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde) 54

Şekil 5.9 (A) SDS:AA ile uzaklaştırma aşamasının süre optimizasyonu. (B) Uzaklaştırma aşamasından sonra 100 pM Lyz'nin yeniden bağlanma süresinin optimizasyonu 55

Şekil 5.10 (A) 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içinde Lyz'nin 0,001-100 pM derişim aralığında DPV eğrileri. (B) log C_{Lyz} - pik akım farkı (ΔI) kalibrasyon grafiği (a: MIP sensörü, b:NIP sensörü) 56

Şekil 5.11 MIP-Apt temelli sensörün BSA, Alb, Hp, Cas, Myg ve A2m ile yapılan seçicilik çalışmalarının DPV yöntemi kullanılarak yapılan ölçümlerine ait pik akım değerleri....57

Şekil 5.12 Hazırlanan MIP-Apt temelli sensörün (A) tekrarlanabilirlik (n=5), (B) tekrar üretilebilirlik (n=4) çalışması....59

Şekil 5.13 Hazırlanan MIP-Apt temelli sensörün depolama günlerine karşı ortalama pik akım değerleri (n=3)....59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Lübnan'da 18-65 yaş arası yetişkinlerin alerjik tepkime araştırması 6
Çizelge 2.2 Sütte bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri 8
Çizelge 2.3 Yumurtada bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri 9
Çizelge 2.4 Yer fıstığında bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri 11
Çizelge 2.5 Soyada bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri..... 12
Çizelge 4.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve temin edildikleri firma..... 34
Çizelge 5.1 Uzaklaştırma ve yeniden bağlanma aşamalarında yapılan süre optimizasyonu ile elde edilen pik akımlar (µA)..... 55
Çizelge 5.2 MIP-Apt temelli biyosensöre ait seçicilik çalışmasından elde edilen % girişim değerleri 58
Çizelge 6.1 Farklı elektrokimyasal sensörlerde Lyz algılamanın analitik performanslarının karşılaştırılması..... 64

1. GİRİŞ

Gıda güvenliği, gıdaların bir kişinin sağlığına zarar verebilecek maddeler içermesini önleyen bilime dayalı bir disiplindir. Bu disiplininin amacı, yenmesi güvenli olan gıdaya sahip olmaktır (FAO, 2011). Gıda hijyeni, gıdanın üretiminden tüketimine kadar olan tüm aşamalarda gıda güvenliğini sağlamak için gerekli olan tüm şartları ifade etmektedir (Kamboj vd., 2020).

Gıda güvenliği temel bir ihtiyaçtır ancak birçok halk sağlığı yetkilisi bu terime yeterince önem vermemektedir. Kentleşme, mikrobiyal ve ekolojik sistemlerde meydana gelen değişimler, gıda miktarında ve tatlı su kaynaklarında azalma gibi faktörler, gıda güvenliğinin ilgi görmesinde rol oynayan bazı küresel değişiklikler arasında yer almaktadır (Kaferstein ve Abdussalam, 1999). 2012-2015 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde *Escherichia coli O157:H7, Listeria, Salmonella, Norovirus* ve diğer patojenlerin; ton balığı, somon, süt ürünleri, tavuk ve sığır eti yoluyla neden olduğu salgınlar bildirilmiştir (Vasilescu vd., 2020). Son yıllarda ise dioksin ile kontamine olmuş yumurtalar, melamin ile kontamine olmuş süt tozu ve *Salmonella* tipi bakteriler ile kontamine olmuş birçok gıda ürünü bildirilmiştir. 2017 yılında Avrupa Birliği, Belçika ve Almanya'yı da kapsayan birçok Avrupa ülkesinde tüketime sunulan yumurtalarda fipronil isimli bir böcek ilacı tespit edildiğini bildirmiştir (P. Wang vd., 2019). Bunun gibi gıda güvenliği ile ilgili problemler halk sağlığını tehdit etmeye devam etmektedir. Bu da hükümetlerin politikalarında özellikle gıda güvenliğine yönelik acil güncellemeler yapmasını zorunlu kılmaktadır.

Küresel gıda sektöründe politikalar, standartlar, düzenlemeler ve yönergeler sürekli değişmekte ve güncellenmektedir. Bu değişim ve güncellemelerin toplumda yaratacağı karmaşaların önüne geçilebilmesi için üretici ve tüketicilere gereken eğitimler verilmeli ve bilgilendirmeler yapılmalıdır (King vd., 2017). Dünya'da yer alan hükümetler gıda güvenliğini sağlamak için çeşitli politikalar ile çalışsalar da gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gıda güvenliğinin önemli bir halk sağlığı problemi olduğu bilinmektedir (Kamboj vd., 2020). 2050 yılında Dünya nüfusunun 9 milyar olması beklenmektedir. Bu istatistikten yola çıkılarak, gıda arz ve talebinin dengede tutulabilmesi için atılması

planlanan çeşitli adımlar yer almaktadır. Bu dengenin sağlanabilmesi için büyük ölçekli çiftçilik, yoğunlaştırılmış hayvansal üretim ve büyük ölçekli gıda işleme ve dağıtım sistemleri son yıllarda dünya genelinde oldukça arttırılmıştır (King vd., 2017). Gıdalar; kesim, hasat, işleme, depolama, dağıtım, nakliye ve tüketime hazırlama işlemlerinin tamamında kontamine olabilir. 200'den fazla hastalığın gıdalardan kaynaklandığı bilinmektedir. Gıda kaynaklı hastalıklar, gıdaların sofraya gelene kadar geçtikleri işlemlerin prosedürlere uygun gerçekleştirilmesi sonucunda engellenebilir. Gıda güvenliğini sağlamada başarılı olmak için yetersiz çevre koşulları, yetersiz kişisel hijyen, hijyenik olmayan hazırlama prosedürleri, uygun olmayan depolama koşulları engellenmeli ve sosyo-ekonomik alt sınıflarda yapılan denetlemeler sıklaştırılmalıdır (Kamboj vd., 2020).

Gıdalarda bulunan ve gıda güvenliğini engelleyen kirleticiler arasında patojenler, ağır metaller, mikotoksinler, pestisitler, herbisitler, tarım ve veteriner ilaçları ile yasa dışı katkı maddeleri bulunmaktadır. Ayrıca, alerjenlere karşı duyarlı bireyler için oldukça önemli bir yere sahip olan protein yapılı alerjenler de bu kirleticiler arasında yer almaktadır. İlgili personeller ve tüketiciler, gıdalarda alerjen tespiti yapabilmek için çeşitli yöntemlerden yararlanmaktadır (Hua vd., 2021).

Lizozim (Lyz), gıda sektöründe inceltici ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılan protein yapılı bir biyomoleküldür. Ayrıca Lyz, çeşitli insan biyolojik sıvılarında da bulunmaktadır. Bu nedenle birçok hastalığın teşhis edilmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, hem gıda sektöründe hem de medikal alanda oldukça geniş bir yere sahip olan Lyz alerjeninin hassas, seçici ve duyarlı tayininin yapılabilmesi için bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu biyosensörde Aptamer (Apt) ve moleküler baskılı polimer (MIP) tekniklerinin avantajlarından yararlanılarak yüksek özgüllük elde edilmiştir. Bu çalışmada ilk kez, karışık matriks yapısına sahip vişne suyu ve karışık meyve suyu örneklerinde Lyz tayini yapılmıştır. Sensörün gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0,00367 pM, alt tayin sınırı (LOQ) değeri 0,012 pM olarak belirlenmiştir. Hazırlanan biyosensörün doğrusal çalışma aralığı 0,001 pM-100 pM olarak belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

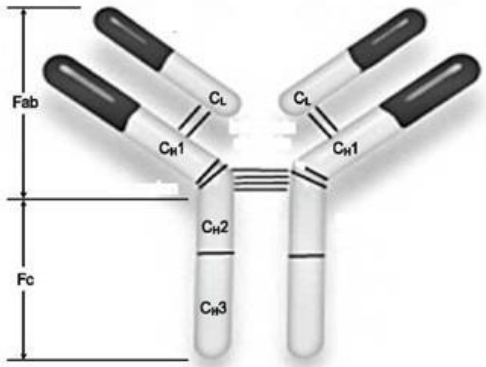
2.1 Gıda Alerjisi

Alerji, bağışıklık aracılı olumsuz sistemik bağışıklık tepkisidir (Zhou vd., 2019). "Alerji" terimi ilk olarak 1906 yılında Avusturyalı bir pediatrist olan Clemens von Pirquet tarafından kullanılmıştır. Pirquet, alerjiyi, "aşırı duyarlılık, alerjen veya antijene karşı vücudun abartılı veya beklenmeyen immün yanıtı" olarak tanımlamaktadır (Karakiliç vd., 2014). Gıda alerjisinin görülme çoğunluğu batı ülkelerinde artmakta olan bir halk sağlığı problemidir. Gıda alerjisi tanımı, Avrupa Alerji ve Klinik İmmünoloji Akademisi tarafından bildirilmiştir (Hosu vd., 2018). Buna göre gıda alerjisi, gıdalara karşı gelişen olumsuz bağışıklık tepkilerini tanımlamak için kullanılmaktadır (Sicherer & Sampson, 2010).

Genel olarak 170'den fazla gıda ürününün ve 923 alerjenin insanlar üzerinde alerjik tepkimelere sebep olduğu tespit edilmiştir (Zhou vd., 2019). Çocuklarda sıklıkla alerjiye yol açan gıdalar arasında yumurta, süt, soya ve buğday yer almaktadır. Yetişkinlerde ise yaygın olarak alerjiye neden olan gıdalar kabuklu ağaç yemişleri, yer fıstığı, kabuklu deniz ürünleri ve balıktır. Aynı zamanda ceviz, badem, karabuğday, yulaf, kereviz, hardal, acı bakla ve fındık da alerjik tepkimeye yol açan gıdalar arasında yer almaktadır (Neethirajan vd., 2018). İlgili gıdaların alerjik olmayan bireylerde herhangi bir yan etkisi yoktur (Hosu vd., 2018)

Gıda alerjileri belirli bir gıdaya ya da bileşene maruz kalındığında tekrarlanabilir. Vücudun alerjenlere karşı gösterdiği bağışıklık tepkisi, Immünoglobulin E (IgE) aracılı ya da IgE aracısız olarak sınıflandırılabilir. IgE molekülünün kimyasal yapısı **Şekil 2.1**'de verilmiştir. Gıda alerjisinin IgE aracılı olduğu durumlarda alerjenik proteinler, bağırsakta bulunan mast hücreleri/bazofiller ile bağlantılı olan spesifik IgE'ler ile etkileşime girerler. Alerjik enflamatuar vericilerin serbest kalması ile deri döküntüsü, ürtiker, ishal, karın ağrısı, anafilaktik şok gibi yaşamı tehdit edebilecek semptomlar ortaya çıkar. IgE aracılı olmayan alerjilerde ise süreç, T hücreleri ile ilerler. Süreçte IgE'den farklı olarak

Immünoglobulin G (IgG), Immünoglobulin M (IgM) ve Immünoglobulin A (IgA) antikor izotopları yer almaktadır (Sena-Torralba vd., 2020; Zhou vd., 2019). Gıda alerjileri ve intoleranslarının benzer semptomları, tepkimeler arasındaki farkları tam olarak anlamayı gerektirir. İntoleranslar sonucunda sindirim zorlaşır ancak alerjik tepkimelerin sonucunda ölümcül semptomlar ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle hasta güvenliği için alerjen teşhislerinin doğru yapılması önem taşımaktadır (Shin vd., 2022).



Şekil 2.1 IgE'nin molekül yapısı. CL: hafif zincir, C_H1, C_H2, C_H3: ağır zincir, Fab: Antijen bağlayıcı parça, Fc: kristalize parça (Karakiliç et al., 2014)

Gıda alerjisi semptomları hafif ürtikerden hayati tehlike oluşturan anafilaktik şoka kadar değişmektedir (Hosu vd., 2018). Analitik bir bakış açısından, gıda alerjenlerini saptamanın iki yolu vardır. Bunlardan biri şüpheli kaynaklardan temin edilen gıdalarda alerjen tespiti yapmak, diğeri ise alerjene özgü IgE'nin klinik tespitinin gerçekleştirilmesidir (Khedri vd., 2018). Mevcut hiçbir tedavi ve aşı, duyarlı kişilerin gıda alerjilerine karşı gösterdikleri bağışıklık tepkilerini iyileştirmemektedir. Bu nedenle tüketicilerin maruziyetini azaltacak önlemler alınmalıdır. Bunun için atılacak en önemli adım hastaların ve sağlık görevlilerinin uygun şekilde eğitiminin sağlanmasıdır (Neethirajan vd., 2018). 2004 yılında Gıda Alerjen Etiketleme ve Tüketiciyi Koruma Yasası sayesinde gıda ambalajlarına ana alerjenleri etiketlemek zorunluluğu gelmiştir. Araştırmalar, tüketicilerin alerjenlerden bilinçli olarak kaçınmaları durumunda dahi anafilaktik tepkimelerin ortaya çıktığını göstermektedir. Bu nedenle ürün ambalajlarına yapılan yanlış etiketlemeler, çapraz kontaminasyonlar, yasa dışı katkı madde kullanımları

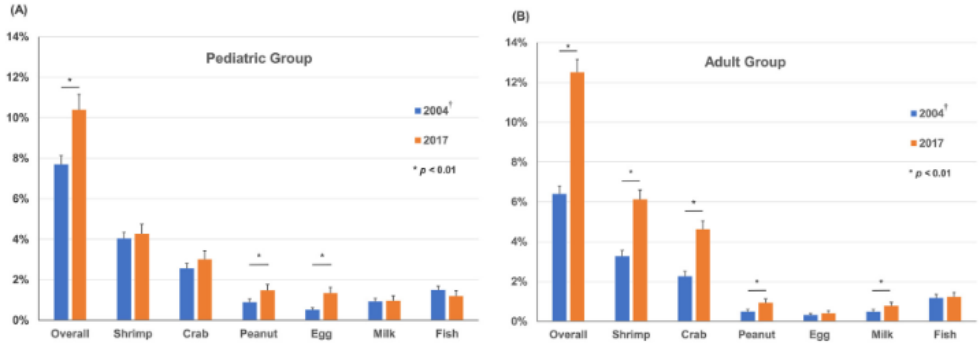
ve düşük kaliteli hammadde kullanımlarının gıda alerjisi vakalarında büyük etkisi vardır (Hosu vd., 2018).

Gıdaların birçoğu üretim ve tüketime hazırlanma aşamasında ısı, basınç, ışık/radyasyon, mekanik ve kimyasal enzimatik aktiviteler gibi farklı etkilere maruz kalırlar. Bu etkilerin IgE bağlama kapasitesi ile ilişkisi araştırılmalıdır. Bunun sebebi, gıda işleme teknolojilerinin bitki ve hayvan proteinlerinin alerjeniteleri üzerinde farklı oranlarda etkilerinin olmasıdır. Özellikle ısıl işlem sonrasında ortaya çıkacak olan gizli lineer epitoplar nedeniyle alerjenlerin potansiyellerinde artış olabilir (Cavazza vd., 2022). Günümüzde gıda işleme sanayisinin gelişimi ile halk sağlığını tehdit eden alerjenlerin tespit edilebilirliği önemli bir konu haline gelmiştir. Bu nedenle risk değerlendirmesini kolaylaştırmak ve ürünlerdeki alerjen içeriklerini tespit edebilmek için güvenilir, hassas, kullanıcı dostu tespit yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2 Gıda Alerjisi İstatistik Bilgileri

Gıda alerjisi, tüm dünya için endişe verici bir halk sağlığı sorunudur. Gelişmiş ülkelerde IgE ile ilişkili gıda alerjisinin yetişkinlerin %1-3'ünü, çocukların ise %3-6'ini etkilediği bilinmektedir (Khedri vd., 2018). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ise, dünyada her yıl 150 ölümün gıda alerjileri sebebiyle gerçekleşen anafilaktik şok kaynaklı olduğunu belirtmektedir (Zhou vd., 2019).

Su ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (2023), Tayvan'da pediatrik grup ve yetişkin grubunda gıda alerjisinin yaygınlığı yıllara göre karşılaştırılmıştır **(Şekil 2.2)** Çalışmada 2004 verileri ile 2017 verileri karşılaştırılmıştır. Pediyatrik grupta bulunan hastalar 6-7 yaş çocuklar ve 13-14 yaş ergenlerden oluşmaktadır. Karides, yengeç, yer fıstığı, yumurta, süt ve balık alerjileri karşılaştırılan bu araştırmada genel yaygınlığın %7,7'den %10,4' yükseldiği görülmüştür (Su vd., 2023).



Şekil 2.2 Tayvan'da (A) pediyatrik grup, (B) yetişkin grupta gıda alerjisi görülme sıklığının 2004 ve 2017 yıllarına ait veriler ile karşılaştırılması (Hata çubukları %95 güven aralığını temsil etmektedir.) (Su et al., 2023)

Enhari ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Lübnan'dan yaşları 18-65 arasında değişen 1091 yetişkin birey incelenmiştir. **Çizelge 2.1**'de görüldüğü gibi, 1091 yetişkinin 280'i (%25,4) en az bir gıdaya karşı alerjik tepkime göstermektedir. Araştırmaya katılan tüm yetişkinler arasında duyarlı olan 280 bireyin %29,6'sı çeşitli meyvelere, %21,4'ü baharatlara, %12,9'u sebzelere, %10'u kabuklu ağaç yemişlerine ve %8,2'si balığa karşı alerjik tepkime göstermiştir. Bireylerin bir kısmının da buğday, süt, yer fıstığı, yumurta gibi gıdalara karşı reaksiyon verdiği belirtilmiştir (Elrahi vd., 2023).

Çizelge 2.1 Lübnan'da 18-65 yaş arası yetişkinlerin alerjik tepkime araştırması (Elrahi et al., 2023)

Demografi	Sayı	%
Cinsiyet		
Kadın	530	48,6
Erkek	561	51,4
Yaş		
18-24	666	61
25-34	207	19
35-44	77	7,1
45-54	61	5,6
55-64	52	4,8

Çizelge 2.2 Lübnan'da 18-65 yaş arası yetişkinlerin alerjik tepkime araştırması (Elrahi et al., 2023) (devam)

Demografi	Sayı	%
Alerji Sayısı		
0	811	74,3
1	213	19,5
2	54	4,9
3	11	1
4	2	0,2

Bireylerin alerjenlere duyarlılığının araştırıldığı başka bir çalışmada, ABD'de doğan bebeklerin yaklaşık %1,9'unun süt ve süt ürünlerine karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmaya göre Avrupa'da toplumun %3,0-4,2'si buğdaya karşı alerjik reaksiyon göstermektedir (Zhou vd., 2019). İnsanlarda alerjik reaksiyona sebep olan gıdalar ve içerdikleri alerjenler aşağıda ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

2.3 Gıda Alerjenleri

Gıda alerjenleri suda çözünen; mantar, bitki ve hayvan kaynaklı, glikoprotein yapılı maddelerdir. Molekül kütleleri 10-70 kDa aralığındadır. Ayrıca farklı ısı ve pH değerlerine sahip ortamlara karşı oldukça dayanıklıdırlar. Alerjenlerin sahip olduğu bu özellikler, alerjenin türüne göre değişiklik göstermektedir. Tüketimi yaygın olan birçok gıda, insanlar üzerinde alerjik reaksiyon gösterebilme özelliğine sahip protein yapılı alerjenleri barındırmaktadır. 170'den fazla gıdanın insanlar üzerinde IgE aracılı alerjik reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (Sathe vd., 2016). Tüm bu alerjik reaksiyonların %90'ı, "Big Eight" (Büyük Sekiz) adlı grubun altında toplanmış olan 8 gıda hammaddesinden kaynaklanmaktadır. Bu gıdalar süt, yumurta, yer fıstığı, soya, kabuklu deniz ürünleri, balık, buğday ve kabuklu ağaç yemişleridir (Zhou vd., 2019). Gıdalarda bulunan alerjenler dizilim ve kimyasal yapı farklılıklarına göre sınıflandırılmış ve Uluslararası İmmünoloji Dernekler Birliği (IUIS) tarafından isimlendirilmişlerdir. Big 8 grubunda yer alan gıdalara ait alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri ile birlikte aşağıda verilmiştir.

2.3.1 Süt alerjenleri

Çocukların %7,5'i, yetişkinlerin ise %1'i süt ve süt ürünlerine karşı duyarlıdır. Sütte bulunan tam 25 alerjen tanımlanmıştır. Bu 25 alerjenden başlıcaları, IUIS isimleri ve molekül kütleleri ile **Çizelge 2.2**'de yer almaktadır. α-laktalbumini kalsiyum bağlayıcı görevi görmektedir. Bu alerjenler arasında en yaygın olanı β-laktoglobulin'dir ve tüm süt alerjenlerinin %60'ını oluşturmaktadır (Zhou vd., 2019).

Çizelge 2.3 Sütte bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri (Sathe et al., 2016)

Alerjenler	Molekül Kütlesi (kDa)
α-Laktalbumin	14,2
β-Laktoglobulin	18,3
αS1-Kazein	25
β-Kazein	25
Sığır Serum Albumini	67
IgG	160
αS2-Kazein	26
K-Kazein	21,2

2.3.2 Yumurta alerjenleri

Yumurta, sütten sonra alerjik reaksiyon oluşumuna sebep olan ikinci ana gıda maddesidir. Atopik dermatite sahip çocuklarda en çok yumurta alerjisine rastlanmaktadır (Dhanapala vd., 2015). Bireylerin %1,6-3,2'sinde alerjik reaksiyon oluşumuna sebep olan yumurta, gıda alerjisi istatistiklerinin %38,3'ünü kapsamaktadır. Bildirilen anafilaktik şok vakalarının ise %25,8'i, yumurta tüketiminden kaynaklanmaktadır (Zhou vd., 2019). Alerjik reaksiyonlara sebep olan yumurta alerjenleri **Çizelge 2.3**'te verilmiştir.

Yumurta akı %54 ovalbumin, %12 ovotransferrin, %3,4 Lyz ve ovomukoid içermektedir. Yumurta akında bulunan bu 4 ana alerjen arasından en alerjik olanın ovomukoid olduğu bilinmektedir. 28 kDa molekül kütlesine sahip olan ve 186 amino asit kalıntısından oluşan ovomukoid alerjeni, %20-25 glikozil bileşeni içermektedir. Ovalbüminler, suda çözünür yapıdadır. Ayrıca ısıtma, pH değişimi gibi gıda işleme prosesleri sırasında sahip olduğu serbest sülfhidril grubu nedeniyle moleküler yapıyı değiştirme gücüne sahip tek alerjen

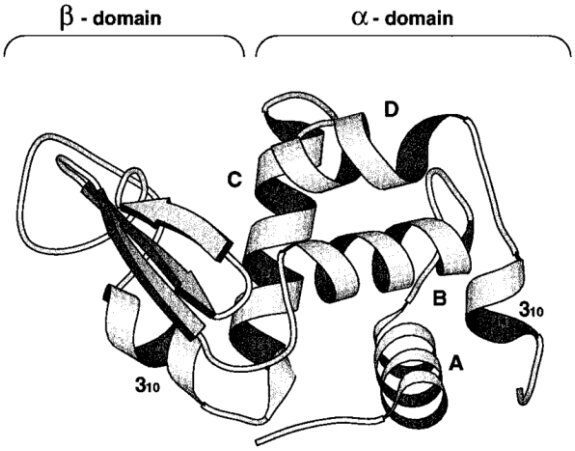
proteinidir. 385 adet amino asit kalıntısından oluşurlar. Ovotransferrin 686, Lyz 129 amino asit kalıntısından meydana gelmektedir. Lyz, gıdalarda katkı madde olarak kullanılabilmekte ve immünoglobulin büyümesini teşvik etmektedir. Yumurta akı alerjenlerinin, yumurta kanalında bulunan magnum bölümünün büyük bir kısmını kapsayan tübüler bez hücreleri tarafından üretildiği bilinmektedir. Yumurta sarısı ise serum albumini ve YGP42 alerjenlerini içermektedir (Dhanapala vd., 2015; Zhou vd., 2019)

Çizelge 2.4 Yumurtada bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri (Sathe et al., 2016)

Alerjenler	**Molekül Kütlesi (kDa)**
Ovomukoid	28
Ovotransferrin	78
Ovalbumin	44
YGP42	35
Lyz	14
Serum Albumini	69

Lizozim (Lyz)

Lyz, 14 kDa molekül kütlesine sahip bir yumurta alerjenidir. Tavuk yumurtasında bulunan Lyz alerjeni, antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Potansiyel mikrobiyal tehlikelere karşı koruma sağlaması sayesinde farmasötik ve nutrasötik alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Kaynağı olan tavuk yumurtasından saflaştırılmış Lyz proteinleri gıda endüstrisinde şarap, bira, peynir ve sosis gibi gıdaların üretiminde inceltici ve antimikrobiyal ajan olarak rol almaktadır. Ovomukoid ve ovalbumine oranla düşük alerjik özellik gösteren Lyz'nin birçok sanayi dalında yaygın ve yüksek oranda kullanımı, onu önemli bir hedef haline getirmektedir (Dhanapala vd., 2015; Vasilescu vd., 2020). Yumurtadan izole edilmiş Lyz alerjeninin kimyasal yapısı **Şekil 2.3'**de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Tavuk yumurtasının akından izole edilmiş Lyz yapısının şematik olarak gösterimi. Gösterimin α-domain bölümünde A, B, C ve D olmak üzere 4 sarmal yer almaktadır (Gilquin et al., 2000)

Lyz, tavuk yumurtası haricinde insan vücudunda tükürük, gözyaşı, mukus, idrar ve serumda bulunmaktadır. Canlı ortamda bakterilerin polisakkarit duvarında bulunan asetal grubun parçalanmasını kataliz etme özelliği ile vücudun kendi antibiyotiği olarak kabul edilmektedir. Lyz birçok ciddi hastalığın teşhisinde önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Lösemi hastalarından alınan idrar örneklerinde Lyz'nin yüksek oranda çıkması böbreklerde fonksiyon bozukluğunun göstergesi olarak kabul edilebilir (Y. Bai vd., 2017; Beiki vd., 2023). Bunun yanı sıra AIDS, akciğer tüberkülozu ve Crohn hastalığı gibi çeşitli hastalıklarda da biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Beyin omurilik sıvısında tespit edilen Lyz miktarı, menenjitin viral ve bakteriyel olması arasında ayrım yapılabilmesini sağlar. Sağlıklı bir insandan alınan serum örneklerinde Lyz miktarı 0,462-2,958 mg L^{-1} olmalıdır. Bu aralıklar idrar için 1,7-123 ng mL^{-1}, beyin omurilik sıvısı için 7,7-84 g L^{-1} ve anne sütü için 300 mg L^{-1} olarak belirtilmiştir (Vasilescu vd., 2016).

Lyz, birçok alerjen gibi anafilaktik şoka varan semptomlarla halk sağlığını ciddi oranda tehdit etmektedir. Lyz'nin antibakteriyel ve antifungal aktivitesi sebebi ile endüstride sıkça kullanımı, duyarlı bireylerin hayat kalitesi ve sağlığı için olumsuz durumların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda protein yapılı bu biyomolekül, lösemi ve Crohn gibi birçok hastalığın teşhisinde biyobelirteç olarak kullanıldığından, düşük sınırlarda tayini oldukça önemlidir. Günümüzde; uzun süren, maliyetli ve yetkili

personele ihtiyaç duyulan proseslere alternatif olarak üretilen hassas, seçici, kolay, taşınabilir ve düşük maliyetli sensörler ile yapılan tayinler oldukça önemlidir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından oldukça önemli olan Lyz alerjeninin tespiti için tasarlanmış elektrokimyasal MIP-Apt temelli bir biyosensör üretimi gerçekleştirilmiştir.

2.3.3 Yer fıstığı alerjenleri

Çocuklarda sıkça görülen yer fıstığı alerjisi, gıda alerjilerinin toplam görülme sıklığının %1-20'sini oluşturmaktadır. Yer fıstığına duyarlı bireyler için gizlenmiş alerjen riskinin olduğu üç farklı durum vardır. Bu durumlar işlenmemiş ham madde, gıdanın nakliyesi sırasında ortamda bulunan diğer gıdalar ile kontaminasyon ve gıda işleme prosedürlerinde gerçekleşen çapraz kontaminasyondur (Zhou vd., 2019).

Yer fıstığında tanımlanmış 13 alerjen bulunmaktadır. Bunlar arasında yer fıstığı alerjisi vakalarının %90'ında etkili olduğu bilinen en temel iki alerjen Ara h1 ve Ara h2'dir (Zhou vd., 2019). **Çizelge 2.4**'te yer fıstığında yaygın olarak bulunan alerjenler ve molekül kütleleri yer almaktadır. İlginç bir şekilde, yer fıstığı alerjenlerinin alerjenik reaksiyona sebep olma yetenekleri ile molekül kütleleri orantılı değildir. Örneğini Ara h2 ve Ara h6'nın molekül kütleleri Ara h1'den düşük olmalarına rağmen hassas popülasyonlarda Ara h2 ve Ara h6'nın alerjenitesi daha kuvvetlidir (Pi vd., 2019).

Çizelge 2.5 Yer fıstığında bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri (Ross vd., 2018; Sathe vd., 2016)

Alerjenler	Molekül Kütlesi (kDa)
7S-8S Visilin	44-64
2S Albumin	15-17
11 S Legumin	60
nsLTP	8,5-11

2.3.4 Soya alerjenleri

Soya fasulyesi tohumları bol miktarda doymamış yağ asidi, vitamin ve mineral içerirler. Kanser, diyabet ve obeziteyi önleme özelliği, diyetlerde soya tüketimi öne çıkarmaktadır. Soya ürünlerinin Avrupa ve Kuzey Amerika'da tüketim oranı oldukça yüksektir. Bu da, alerjik reaksiyonların ortaya çıkma sıklığını arttırmaktadır. Son yıllarda soya tüketimi sonucunda bireylerde kusma, ishal, burun akıntısı, öksürük gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır. Soyada yaygın olarak bulunan alerjenler ve molekül kütleleri **Çizelge 2.5**'te yer almaktadır. Soya ürünlerinde en az 16 farklı protein yapılı maddenin alerjen özellik taşıdığı bilinmektedir (Mulalapele ve Xi, 2021a).

Çizelge 2.6 Soyada bulunan alerjenler, IUIS isimleri ve molekül kütleleri (Maruyama, 2021; Sathe vd., 2016)

Alerjenler	**Molekül Kütlesi (kDa)**
Hydrophobic seed protein	7
Defensin	8-12
Profilin	14-15
Bet v 1–related protein	16-18
7S/8S vicilin	44-64
11S legumin	60
2S albumin	15-17

2.3.5 Kabuklu deniz ürünleri ve balık alerjenleri

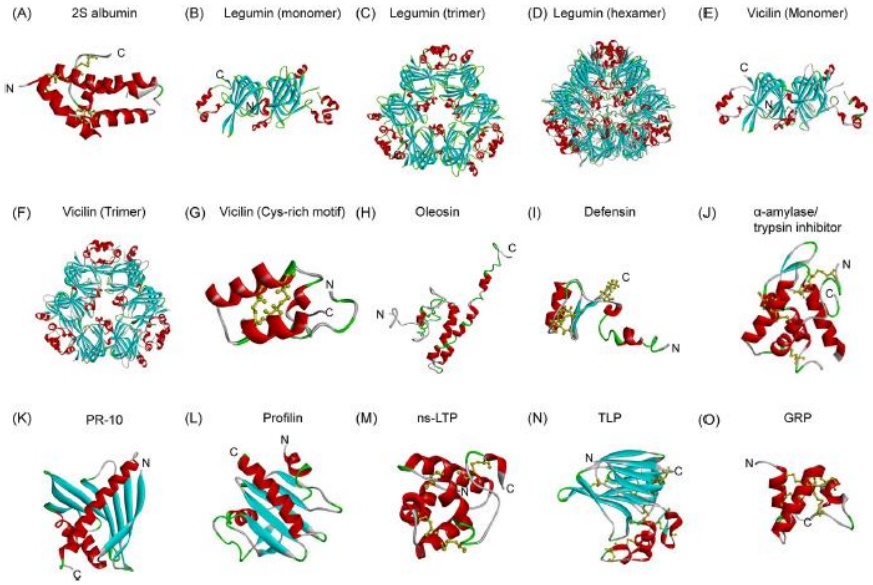
Balık ve kabuklu deniz hayvanlarının dünya çapında yaygın olarak alerjik reaksiyon oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Bireylerin bu ürünlere karşı duyarlılık gösterme sıklığı ülkelere ve tüketim alışkanlıklarına göre değişse de dünya nüfusunun %1-2,5'inde bu duyarlılığın olduğu düşünülmektedir (Blaschke vd., 2023).

2.3.6 Kabuklu ağaç yemişleri ve buğday alerjenleri

Bitkisel kaynaklı birçok gıda alerjeni bulunmaktadır. Bu alerjenlerin alerjenik aktiviteleri ile yapısal özellikleri arasında bir bağlantı söz konusudur. Bazı alerjenler disülfit bağlara, tekrarlanan sekanslara ve ligandlara bağlanma gibi yapısal özelliklere sahip olmaları

nedeniyle yüksek termal kararlılık gösterirler. Aynı zamanda insanlarda bulunan sindirim enzimlerine karşı direnç gösterdikleri bilinmektedir (Maruyama, 2021).

2S albümin ve legumin, tohumlarda bulunan depo protein yapılı alerjenlerdir. nsLTP ise bir savunma proteinidir. **Şekil 2.4**'te bitkisel kaynaklara sahip alerjenlerin üç boyutlu yapıları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Bitki kaynaklı alerjen bileşenlerinin üç boyutlu yapılarının şematik olarak gösterimi (Maruyama, 2021)

Gıda alerjileri global bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu soruna sebep olan alerjenlere karşı duyarlı bireylerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle gıda alerjilerine neden olan protein yapılı alerjenlerin hassas, seçici, hızlı ve pratik tespiti bilim insanları tarafından oldukça ilgi gören popüler bir konu haline gelmiştir. Alerjenlerin tespit yöntemleri; enzim etiketli immünosorbent assay (ELISA), yanal akış cihazları (LFD), kütle spektroskopisi (MS), polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ve biyosensörler olmak üzere sınıflandırılmıştır. Bu yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

2.4 Standart Alerjen Tespit Yöntemleri

Gıda alerjenlerinin tespit yöntemleri protein ve deoksiribonükleik asit (DNA) bazlı olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Protein bazlı yöntemler alerjenin kendisini tespit etmeye odaklanırken DNA bazlı yöntemler alerjenin kaynağı olan bitki, hayvan ya da mantar türünün DNA'sını tanımlamaya odaklanır. Gıda endüstrisinde en çok kullanılan immünoassay yöntem ELISA yöntemidir. Diğer popüler yöntemler ise MS ve PCR yöntemleridir. Bu yöntemler, kendilerine özgü avantaj ve kısıtlayıcı dezavantajlara sahiptir. İmmünoassay yöntemlerde alerjen proteinlerinin tespiti için bir ayırma adımına ihtiyaç duyulmaz. Tespit aşamasında spesifik antikor kullanımı gerçekleştirilmektedir. Numunelere uygulanan ön işlem, sulu bir tamponda hedef alerjenin ekstrakte edilmesi ile gerçekleştirilir. DNA testi, immünoassay yöntemlere göre zaman alıcı ve maliyetlidir (Vasilescu vd., 2020).

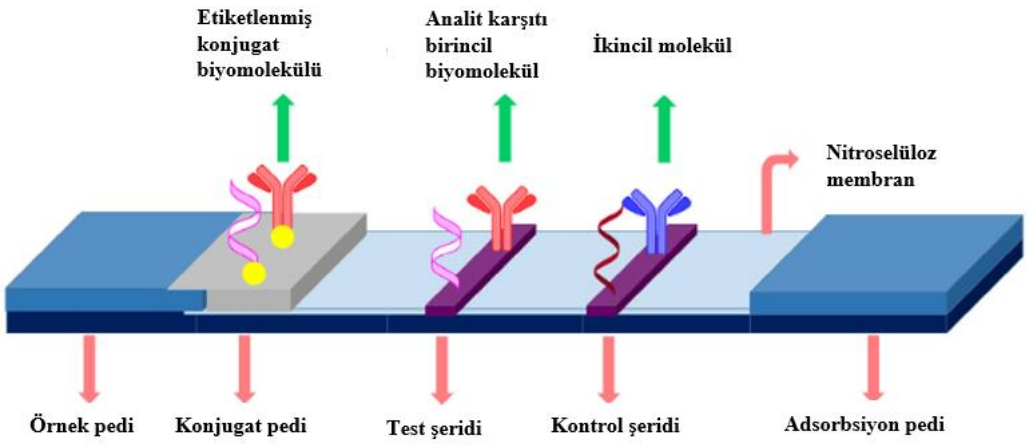
İmmünoassay yöntemlerde alerjen içeriklerinin belirlenmesi için protein/peptit biyobelirteçleri saptanmakta, bu işlemin gerçekleşebilmesi için de spesifik antikorlar kullanılmaktadır. Yöntem türüne göre poliklonal ya da monoklonal yapılı antikorlar seçilmektedir. Poliklonal antikorlar maliyeti düşük ve üretimi hızlı olduğundan, monoklonal antikorlar ise yüksek tutarlılık oranı sağladıklarından tercih edilebilirler. Kullanılan en yaygın immünoassay yöntem ELISA yöntemidir (Sena-Torralba vd., 2020).

2.4.1 Enzim etiketli immünosorbent assay (ELISA)

ELISA yöntemi, alerjen tespiti için tercih edilen oldukça yaygın bir yöntemdir. ELISA kitleri ticari olarak satın alınabilmekte ve analizler 0,005-10 $\mu g\ g^{-1}$ alerjen seviyelerine kadar yapılabilmektedir. Tüm bu avantajların yanı sıra ELISA yöntemi ile yapılan analizlerde çeşitli dezavantajlarla karşılaşılmaktadır. Bu dezavantajlar arasında düşük protein çözünürlüğü ve çoklu numune işleme adımları yer almaktadır. Aynı zamanda bu yöntem çoğu zaman denatüre olmuş hedef moleküllerin tespiti için yeterli olmamaktadır (Shin vd., 2022). ELISA yöntemi sandviç, karşılaştırmalı ve ticari olmak üzere üç sınıfta incelenmektedir (Sena-Torralba vd., 2020) .

2.4.2 Yanal akış testi (LFD)

LFD'ler, son yıllarda alerjen tespitinde kullanılan basit ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Bu yöntemin temelinde altın nanopartikül (AuNP) kullanımı yatar. **Şekil 2.5**'te yanal akış testinin temel yapısı şematik olarak gösterilmiştir. Görüldüğü üzere analiz, pozitif veya negatif cevap alınacak olan pedin üzerine sıvı numunenin maruz bırakılması ile gerçekleşir. Ticari olarak satılan LFD kitleri de ELISA kitlerine benzer olarak yaygın olarak görülen tüm gıda alerjenlerinin tespitinde kullanılabilmektedir. Bu yöntemin avantajı, karmaşık ve maliyetli aygıtlara ihtiyaç duyulmamasıdır. ELISA kiti ile karşılaştırıldığında hızının daha yüksek olduğu, aynı zamanda işlenmiş gıdalarda yer alan alerjenlerin tespit edilebilmesinde de daha başarılı olduğu bilinmektedir (Mulalapele & Xi, 2021b; Sena-Torralba vd., 2020).



Şekil 2.5 Yanal akış testinin temel yapısı (Bahadır ve Sezgintürk, 2016)

2.4.3 Kütle spektroskopisi (MS)

MS, son yıllarda gıda alerjenlerinin tespitinde oldukça tercih edilmekte olan bir yöntemdir. İmmünoassay yöntemler ile karşılaştırıldığında, işlenmiş ve değişikliğe uğramış gıdaların analizlerinden oldukça hassas sonuçlar elde edilmektedir. Aynı zamanda antikorların homolog proteinlerle kontaminasyona uğradığı durumlarda immünoassay yöntemlerin yanlış sonuç verme eğilimi, MS'de görülmemektedir. MS'nin

dezavantajı, yüksek maliyetli ekipmanlara ve eğitimli personele ihtiyaç duyulmasıdır (Mulalapele & Xi, 2021b).

MS tekniği dört aşamadan oluşur. Bunlardan ilki peptit hedef seçimi, ikincisi peptitin özgüllüğünün doğrulanması, üçüncüsü analizin başlatılması ve sonuncusu alerjen miktarının belirlenmesidir. Alerjen miktarının belirlenmesi boyunca proteinlerin enzimatik sindirimi ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanımı gibi birkaç işlem gerçekleştirilmektedir (Sena-Torralba vd., 2020).

2.4.4 Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) analizi

PCR analizinin ilkesi, alerjenleri kodlayan genlerin teşhis edilmesine ve gen amplifikasyonuna (kuvvetlendirmesine) dayanmaktadır. Diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında büyük avantajlara sahiptir. Çok düşük derişimlere sahip örneklerde bile kesin sonuçlar alınmasını sağlar. PCR analizleri gen denatürasyonu, gen hibridizasyonu ve gen genişlemesi olmak üzere üç adımda gerçekleşir. Bu analizlerde DNA'nın alerjene özgü olmaması, gerekli analitik ekipmana sahip olunmaması ve kontaminasyon gibi durumlar dezavantaj sağlarlar (Mulalapele & Xi, 2021b; Sena-Torralba vd., 2020).

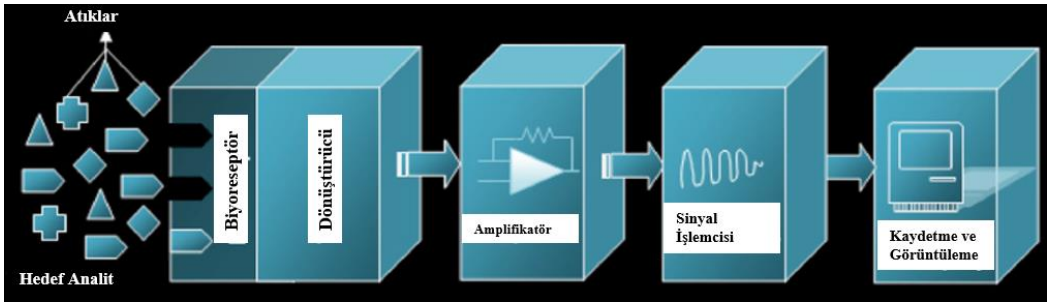
2.5 Biyosensörler

Gıda güvenliğini tehdit eden kirleticilerin tamamen yok edilmesi mümkün değildir. Bu nedenle gıda güvenliğinin ve kalitesinin kontrolüne odaklanılmalı, bunun için analitik yöntemler geliştirilmelidir (Ye vd., 2019). Hükümetlerin politikaları ve doğru etiketleme gıda sektöründe oldukça önemlidir. Doğru etiketleme yapılması ve potansiyel gıda alerjisi riskinin değerlendirilmesi için uygun tespit yöntemlerinin kullanımı önem arz etmektedir (Sheng vd., 2022). Gıda maddelerinin içeriklerinin, aynı zamanda uğradıkları kimyasal ve biyolojik kontaminasyonlarının tespiti sırasında birçok zorlukla karşılaşılmaktadır. Bu sebeple seçici, hassas, güvenilir analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kromatografi, spektroskopi gibi geleneksel yöntemler, tecrübeli personel ve uzun prosedürler gerektirir.

Karşılaşılan zorluklar nedeniyle geleneksel yöntemlerin kullanımına alternatif olarak bileşenlerinin gıdalarda pratik ve hızlı analizine imkan sağlayan biyosensörlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Ye vd., 2019).

Biyosensörler modifikasyon materyali, biyoreseptör ve iletim modları açısından çok yönlü olduklarından birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılırlar (Sena-Torralba vd., 2020). Yüksek özgüllükte, duyarlı, düşük maliyetli ve küçük boyutlarda olan biyosensörler, hızlı yanıt verme avantajları ile son yıllarda gıda maddelerinin tayin edilmesinde kullanılan oldukça kullanıcı dostu ve popüler yöntemlerdir (Ye vd., 2019). Gıda endüstrisinde patojen, katkı maddesi ve alerjen tespitinde kullanılan biyosensörler; ilaç geliştirme, klinik teşhis, güvenlik standartları kontrolü, proses içinde gerçekleştirilen fermantasyon kontrolü ve çevresel analiz gibi birçok alanda aktif olarak kullanılmaktadırlar (Bankole vd., 2022; Sena-Torralba vd., 2020).

Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC), biyosensör tanımını "izole enzimler, bağışıklık sistemleri, dokular, organeller veya tüm hücrelerin aracılık ettiği spesifik biyokimyasal tepkimeleri, genellikle elektriksel, termal veya optik sinyallerle kimyasal bileşikleri tespit etmek için kullanan bir cihaz" olarak yapmaktadır (Griesche & Baeumner, 2020). Biyosensörler hedef molekülü tayin etmek için biyoreseptör elemanı ile donatılırlar. Bu elemanlar hücre, antikor, MIP, enzim gibi formlarda bulunabilirler. Son yıllarda peptit ve bakteriyofajların da biyoreseptör olarak kullanıldığı görülmektedir (Shin vd., 2022). Tanıma elemanı ve hedef analit arasında oluşan etkileşim, dönüştürücü tarafından bir sinyale dönüştürülür ve böylece sonuç nicel hale getirilir (Singh, 2022). Tipik bir biyosensörün çalışma prensibi **Şekil 2.6**'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Bir biyosensörün şematik diyagramı (Velusamy et al., 2010)

Biyosensörler dönüştürücülerine göre optik, elektrokimyasal, mikromekanik, kolorimetrik, manyetik olarak sınıflandırılabilirler (Bankole vd., 2022). Bu sınıflandırmada en çok tercih edilen, elektrokimyasal biyosensörlerdir.

2.5.1 Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler; çalışma elektrotu ve karşıt elektrottan oluşan iki elektrotlu ya da çalışma elektrotu, karşıt elektrot ve referans elektrottan oluşan üç elektrotlu sistemleri içerirler. Prensip olarak çalışma elektrotunun yüzeyinde bulunan analit maddenin yükseltgenmesine ve indirgenmesine dayalıdır (Sheng vd., 2022). Elektrokimyasal yöntemler, biyokatalitik ve afinite sensörleri olmak üzere iki grupta incelenebilirler. Biyokatalitik sensörler elektroaktif moleküllerin üretilmesi için enzim ve hedef arası tepkime analizi gerçekleştirirken, afinite sensörler biyoreseptör ile hedef molekül arasındaki tepkimeyi izleyerek bir sinyalin ölçülmesine odaklanmaktadır. Elektrokimyasal sensörlerde sinyal güçlendirme için etiketleme işlemine başvurulabilir. Bu durumda bu sensörler etiketli (labelled) ve etiketsiz (label free) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Singh, 2022)

Elektrokimyasal sensörlerin düşük maliyetli, hızlı, taşınabilir ve minyatürleştirilebilir olmaları; aynı zamanda analitik doğruluk sağlamaları gıda örnekleri ile yapılan analizlerde optik sensörlere karşın belirgin avantajlar sağlar. Bu sensör tipi aynı zamanda düşük hacimli örneklerle çalışabilme, seçici olma ve geleneksel yöntemlere göre hızlı cevap süresi gibi avantajlara sahiptir. Alerjen ve tağşiş bileşenleri voltametrik, impedimetrik veya amperometrik temelli elektrokimyasal yöntemler ile tespit edilebilirler (Sheng vd., 2022; Singh, 2022).

Elektrokimyasal sensörlerde tespit edilecek analitlerin enzim, antikor, DNA zinciri veya Apt gibi biyoreseptörler yardımıyla tanınması ve tanınan sinyalin dönüştürücüye yakalanması gerekir. Biyoreseptör ve analit arasındaki ilişki antikor/antijen, enzimatik modalite ya da hücresel iletim şeklinde olabilir (Hartati vd., 2022). Oldukça avantajlı özelliklere sahip olan Apt'ler; antikorlara kıyasla yüksek hassasiyet, seçicilik ve düşük

maliyetli analizeler sunarlar. Aynı zamanda elektrokimyasal algılama platformuna oldukça kolay entegre edilebilirler. Apt'ler, elektrokimyasal dönüştürücülerle birleştiğinde doğru bir algılama platformu oluştururlar (Singh, 2022).

2.5.2 Aptamerler (Apt'ler)

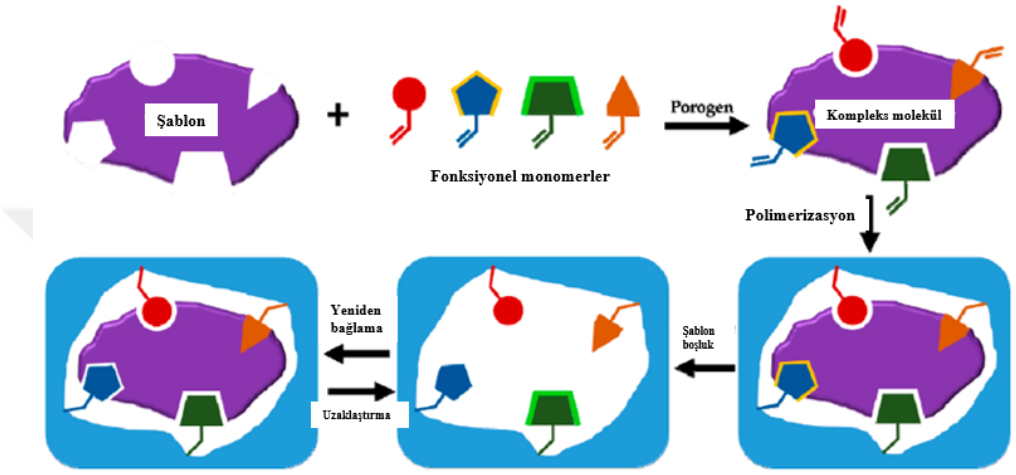
Antikorlar yalnızca immünojenik moleküllere karşı üretilebilirken, Apt'lerin üretimi laboratuvar ortamında yapay olarak gerçekleştirilebilmektedir. Apt'lerin bu avantajı, yaygın olarak kullanılan antikorların yerine sentetik hedef bağlayıcı oligonükleotit yapılı bu biyobelirteçlerin kullanımını yaygınlaşmıştır. Teknolojik gelişmeler ile paralel olarak, Apt bazlı teşhis yöntemlerinin gelişmesi ve yaygınlaşması son yirmi yılda hızlanmıştır (Canovas vd., 2023).

Ayrıca Apt'lerin polietilen glikol gibi taşıyıcı moleküllere kimyasal stabilizasyonu konjugasyon yoluyla gerçekleştirilebilir veya zincir, nükleaz direncini arttırmak için 3'- ve/veya 5'-uçları ile kapatılabilir. Yapay olarak sentezlenen Apt'ler, katlanma kinetiğini ve bağlanma afinitelerini kontrol etmek için ayarlanabilirler. Apt'ler, pM-nM aralığında K_d değerleri ile antikorlara kıyasla yüksek afinite gösterirler. Yüksek çözünürlüklü moleküler ayrım ve Apt'lerin hedeflerine yüksek afinitesi, teşhis, tedavi ve analitik uygulama alanında Apt'lerin araştırılmasına olan ilgiyi arttırmıştır (Canovas vd., 2023; Khedri vd., 2018; Weaver vd., 2023).

2.5.3 Moleküler baskılı polimerler (MIP)

Moleküler baskılama tekniği ilk olarak 1931 yılında Polyakov tarafından silika matrisleri kullanılarak bildirilmiştir. MIP, sentetik polimer yapıdadır. Sahip olduğu tanıma bölgeleri ile analit molekülünü yapısal ve işlevsel olarak tamamlar. Bu tanıma bölgeleri MIP'e seçici moleküler tanıma özelliği kazandırmaktadır (Ali & Omer, 2022). Bu teknik, anahtar-kilit uyumuna dayalı olarak geliştirilmiştir (Doostmohammadi vd., 2022). MIP, fonksiyonel monomer ile çapraz bağlama maddesinin şablon varlığında kopolimerizasyonu ile oluşturulmaktadır (Shin vd., 2022). Monomerler, polimer matrisi

içindeki kompleksleri koruyarak uygun bir çapraz bağlayıcı ile polimerize edilir. Daha sonra şablon polimer matristen çıkarılır. Böylece şablonun boyut, şekil ve yönelim özelliklerini tamamlayıcı olan moleküler boşluklar açılır. Bu boşluklar ile hedef analit molekülleri seçici olarak bağlanabilmektedir (El-Sharif vd., 2022). **Şekil 2.7'**de MIP oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7 MIP oluşumunun şematik olarak gösterimi

MIP'ler, doğal antikorlar ile karşılaştırıldığında afinitesi ve seçiciliği oldukça yüksek baskılı boşluklara sahiptir. Bu baskılı boşlukların sahip olduğu bağlanma bölgeleri, hedef molekülü bağlamayı sağlar (Ali & Omer, 2022). MIP temelli biyosensörler, geleneksel tespit yöntemlerinin bazı sınırlamalarının üstesinden gelir (Shin vd., 2022). Geniş uygulama alanı yelpazesi, kimyasal stabilite, kolay üretim, sağlamlık ve sert koşullara karşı dirençli yapı, MIP'leri biyokimyasal algılama uygulamaları için uygun bir platform haline getirmiştir (El-Sharif vd., 2022). Tüm bu avantajların yanı sıra, MIP'lerin karşı karşıya olduğu bazı zorluklar ve dezavantajlar bulunmaktadır. Düşük baskılama faktörü (baskılanmış polimerin baskılanmamış polimere bağlanma afinite oranı) ve şablon sızıntısı, bu dezavantajlardandır. Ayrıca deneysel süreçle elde edilecek fonksiyonel monomer seçimi de oldukça önemlidir (Ali & Omer, 2022). Apt ve MIP temelli sensörlerin dezavantajlarının bertaraf edilmesi ve her iki tekniğin de avantajlarından yararlanılabilmesi için MIP-Apt temelli sensör üretimleri gerçekleştirilmektedir. MIP-

Apt temelli sensörler ile gıda maddeleri ve diğer birçok alanda oldukça seçici analizler yapılabilmektedir.

Apt ve MIP'in benzersiz özelliklerine dayanarak tasarlanan kombine sensörler, hedefin seçici tespiti için yüksek afiniteye sahip bir sistem içerirler. Bu yapıda üretilen sensörlerde Apt'lerin rolü, MIP bağlanma afinitesi ve özgünlüğü arttırmak için makro monomer görevi görmektir. Yapılan moleküler baskılama ise, şablon substrata karşı özgüllüğün artmasını sağlar (Jolly vd., 2016; Tamboli vd., 2016). Şablon oluşumuna dayalı bu hibrit sensörler ile olağanüstü seçicilik skalaları yakalanır ve oldukça verimli gıda alerjen analizleri yapılır.

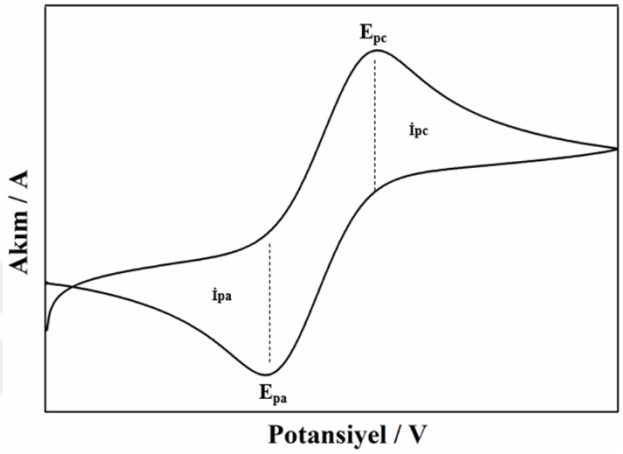
2.6 Voltametrik Yöntemler

Voltametri, 1922'de Çek bilim insanı Jaroslav Heyrovský tarafından geliştirilmiş elektrokimyasal bir yöntemdir. 1960-1970 yıllarında voltametrinin analitik duyarlılığı ve aralığının geliştirilmesi için ilerleme kaydedilmiştir. Voltametri, bir elektrokimyasal hücre tepkimesi sırasında elektrokimyasal süreçlerde gözlemlenen akım ve voltaj arasındaki ilişkiyi takip etmektedir. Voltametrik teknikler, uygulanan potansiyel ve akımın zaman periyodundaki değişimini ölçmektedir. Bu yöntemlere aktif yöntemler denir. Aktif yöntemler, uygulanan potansiyel sebebiyle ortaya çıkan değişikliklerin elektrot yüzeyindeki elektroaktif maddenin derişiminde bir farka neden olmasına neden olmaktadırlar. Meydana gelen değişiklikler, elektrokimyasal indirgenme veya yükseltgenmenin sonucudur (Sharma vd., 2020).

Dönüşümlü Voltametri (CV)

CV yöntemi ilk olarak 1938'de, Randles tarafından, bir substratın elektrolitik ortamdaki elektrokimyasal davranışının araştırıldığı bir çalışmada bildirilmiştir. Bu yöntem farmasötik analiz ve biyolojik materyal analizleri gibi kimyanın birçok alanında elektrokimyasal reaksiyon ve elektroanalitik tekniği incelemek için önemli bir araç haline gelmiştir. CV'de uygulanan potansiyel, elektrot boyunca verilen akım tarafından toplandığı ve analiti indirgediği/yükseltgediği için, çalışma elektroduna doğrusal bir

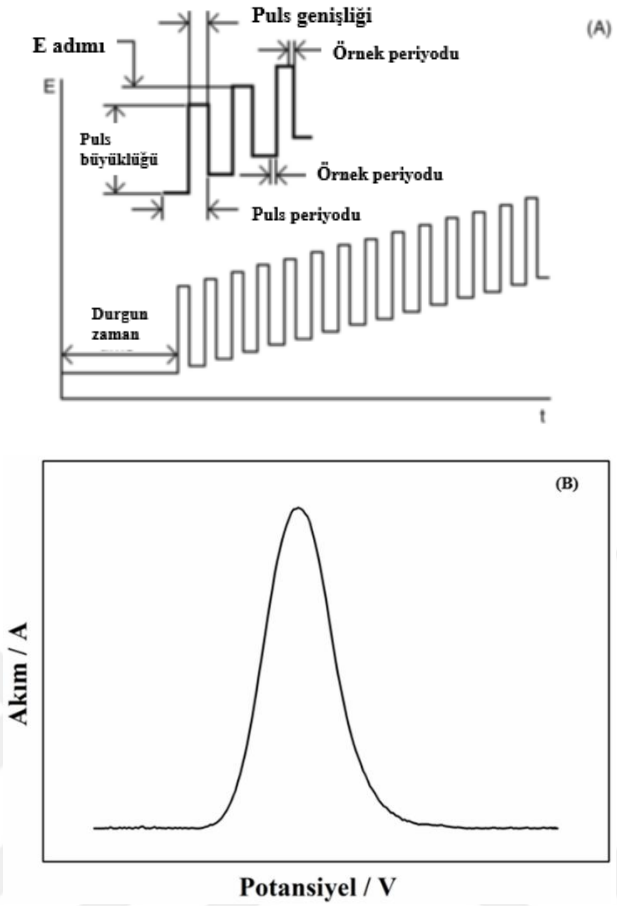
potansiyel taramasının uygulanması ile elde edilmektedir (Sharma vd., 2020). Potansiyodinamik bir ölçüm yöntemi olan CV yöntemine ait tipik bir voltamogram örneği **Şekil 2.8**'de gösterilmiştir. x ekseni sistemde uygulanan potansiyeli (E), y ekseni ise uygulanan potansiyele karşı ortaya çıkan akımı (I) göstermektedir. (Elgrishi vd., 2018). Voltamogramda, anodik pik akımı (I_{pa}), katodik pik akımı (I_{pc}), anodik pik potansiyeli (E_{pa}) ve katodik pik potansiyeli (E_{pc}) verilmektedir (Sharma vd., 2020).



Şekil 2.8 Tipik bir dönüşümlü voltamogram ($İ_{pc,a}$: anodik ve katodik pik noktaları, tersinir tepkime) (Okugawa, 2014)

Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)

DPV, moleküllerin bireysel veya eşzamanlı analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. DPV'deki ana kavram, akımın potansiyel adımın sonunda ölçülmesi ve adımdan önce ölçülen akımdan çıkarılmasıdır. Kısacası iki akım arasındaki farkın ölçülmesinden kaynaklanan bir dalga formuna sahiptir. DPV'de uygulanan potansiyel pulsu sabittir (Grumezescu & Andronescu, 2017; Sharma vd., 2020). DPV'nin potansiyel dalga formu ve tipik bir DPV eğrisi **Şekil 2.9**'da verilmiştir.



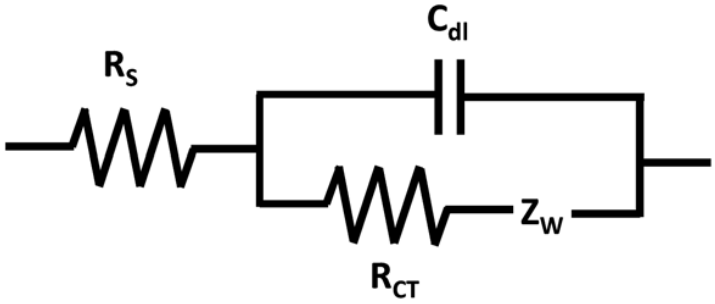
Şekil 2.9 (A) DPV için potansiyel dalga formu (B) Tipik bir DPV eğrisi (Grumezescu & Andronescu, 2017)

DPV yönteminin ortamdan gelen sinyalleri bastırma gücünün CV yöntemine göre yüksek olduğu ve bu sayede algılama hassasiyetini arttırdığı bilinmektedir (Xian vd., 2022).

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

EIS yönteminin temeli, 1880'lerde Oliver Heaviside tarafından, impedans kavramının ortaya çıkarılması ile atılmıştır (Nechache vd., 2014). Bu yöntem ile basit ve otomatikleştirilmiş elektriksel bir ölçüm ile tepkime hızı, kütle aktarımı, korozyon gibi süreçler hakkında bilgi elde edilebilmektedir. EIS yöntemi sensör teknolojisinde gerçekleştirilen elektrokimyasal karakterizasyon aşamalarının yorumlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Esser vd., 2022). Çok yönlü işlevleri sayesinde metalürjik sistemler, biyolojik hücreler, dokular gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar (Sadeghi vd., 2023).

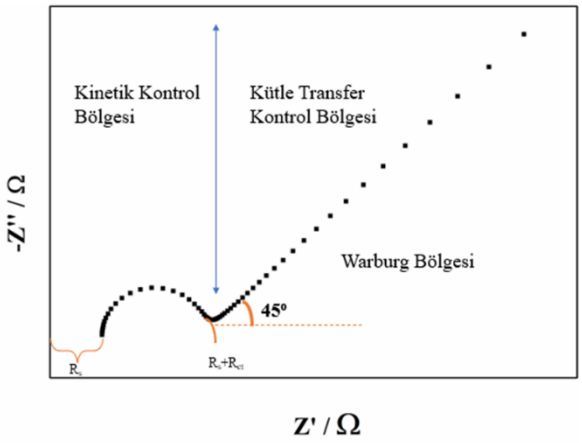
İmpedans, bir elektrik devresinde uygulanan voltaj ile ortaya çıkan akıma karşı olan direnç miktarıdır. Yük transferinin elektrot yüzeyinde gerçekleştiği heterojen tepkimelerde impedans değişikliği; yük transferi, adsorpsiyon ve iyon difüzyonu unsurlarına bağlıdır. Bu unsurların yanı sıra morfoloji, elektrodun doğası ve malzeme bileşiminden de etkilenmektedir. Stratejik olarak bir elektrik devresindeki farklı bileşenlerin etkinliğini ve büyüklüğünü değerlendirmekte kullanılmaktadır. Ayrıca elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan nanomalzemelerin performansları hakkında bilgi vermektedir (Laschuk vd., 2021). İmpedans, dirençten farklıdır. Doğru akım devrelerde gözlenen direnç direkt olarak Ohm Yasası'na uymaktadır ancak impedans tepkisini ölçmek için sinyal uyarımı gerekmektedir (Magar vd., 2021). EIS ölçümüne başlamak için verilerin özel bir yazılımda açılması ve uygun bir eşdeğer devre modeline yerleştirilmesi gerekmektedir. Birçok iletken yüzeyde EIS ölçümü yapılması için kullanılan model, "Randles eşdeğer devre modeli"dir (**Şekil 2.10**). Bu modelin devre elemanları yük transfer direnci (R_{ct}), üretilen çözelti direnci (R_s), çift katmanlı kapasitans (C_{dl}) ve difüzyon kontrollü bir elektron transfer işlemi varlığında büyüklüğü önem arz eden bir unsur olan Warburg impedansı (Z_w)'dır (Laschuk vd., 2021).



Şekil 2.10 Randles eşdeğer devre modeli

EIS yönteminden elde edilen bulgular Nyquist, Bode, akım yoğunluk-gerilim ve anodik/katodik polarizasyon eğrileri gibi farklı gösterimlere sahip olabilirler. Bunun yanı sıra, bu gösterimler arasında en yaygın kullanıma sahip olanın Şekil 4.4'de şematik olarak gösterilen Nyquist eğrisi olduğu bilinmektedir (Sadeghi vd., 2023). **Şekil 2.11**'de görüldüğü gibi Z′ ekseni, frekansla ters bir ilişkiye sahiptir. Z′ ve Z″ eksenleri, elektrotun geometrik yüzey alanı kullanılarak standart hale getirilebilir, böylece farklı alanlara sahip

elektrotların EIS yanıtının doğrudan karşılaştırılması sağlanmaktadır (Laschuk vd., 2021).



Şekil 2.11 Nyquist eğrisinin şekilsel gösterimi

2.7 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM, heterojen formdaki organik ve inorganik malzemelerin mikrometreden nanometreye varan ölçeklerde analiz edilmesi için kullanılan bir karakterizasyon aracıdır. Bu yöntem kullanılarak çeşitli malzemelerin yüzeylerinin üç boyutlu görüntüleri elde edilebilmektedir. Bu nedenle SEM, birçok mikroanaliz uygulamasında rol oynamaktadır. SEM'de kullanılan görüntüleme sinyallerinin kaynağı, değişimi topografik özelliklere bağlı olduğundan düşük enerjili ikincil elektronlar ile geri saçılan elektronlardır (Mazumder vd., 2018).

SEM'in çalışma prensibi, elektron kaynağının bir elektron demeti oluşturması ve pozitif elektrik potansiyeli kullanarak analiz edilen örneğe doğru hızlandırmasına dayanmaktadır. Oluşturulan elektron ışını, metal açıklıklar ve manyetik mercekler yardımı ile tek bir ışın haline getirilir ve sahip olduğu elektronlar örnek hakkında bilgiler verir. Alınan bu bilgiler görüntüye dönüşür. Yüzey topografyası, bileşimi ve elektriksel özellikleri bu görüntüler sayesinde yorumlanır (Subramanian vd., 2018).

2.8 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

XPS, maddelerin korozyon özelliklerini, arayüz bilgisini ve yüzey kimyasal bileşimini anlamak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile analiz edilen yüzeylerin sahip oldukları H ve He dışındaki tüm elementlerin analizi, %0,1-1 algılama hassasiyeti ile gerçekleşmektedir (Krishna & Philip, 2022). XPS yönteminin polimer analizi için yaygın hale gelmesine neden olan iki büyük avantajı vardır: Yorumlama kolaylığı ve yalıtım malzemelerinde kullanımı (Chan & Weng, 2016). XPS pik akımları (bağlanma enerjileri) ve bu akımların sahip olduğu şekiller, ilgili referanslar kullanılarak analiz edilmektedirler (Tagami vd., 2022).

2.9 Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

AFM, topografyayı haritalamak ve numunenin özelliklerini nano ölçekte incelemek için kullanılan bir tekniktir. AFM'de, numuneden görüntü alınabilmesi için yay benzeri bir konsolun bir tarafında prob ucu kullanılır. Numune ile uç arasındaki etkileşim, çekici veya itici kuvvetlere yol açar. Bu itici kuvvetler ile numunenin topografyası hakkında bilgi sahibi olunur. Uç ve numune birbirine yakınsa, çekici kuvvet, konsolu numuneye doğru saptırır ve uç numune ile temas ettirildiğinde, itme kuvveti konsolu numuneden saptırır (Hiesgen & Friedrich, 2011). AFM, nanomateryal ve nanopartikül karakterizasyonu için ideal bir tekniktir. Bu teknik boyut, morfoloji, pürüzlülük gibi fizikseller özellik hakkında hem nitel hem de nicel bilgi sunar. Aynı zamanda boyut, yüzey alanı ve hacim dağılımlarını içeren istatistiksel bilgiler de belirlenebilir. AFM taramasında 1 nm'den 8 mm'ye kadar birçok çeşitte parçacık boyutu karakterize edilebilir. Bir AFM'den alınan görüntüler, nanopartiküllerin yüksekliğini kantitatif olarak ölçmenin mümkün olacağı şekilde üç boyutlu veriler sunar (Farré & Barceló, 2012).

2.10 Duyarlılık

Elektrokimyasal ölçümlerde analit derişiminin değişimi, okunan elektrokimyasal sinyal şiddetini değiştirmektedir. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğiminden sensörün

duyarlılığı hesaplanmaktadır. Biyosensör geliştirme süreçlerinde yüksek duyarlılık aranan bir özelliktir.

2.11 Sensör Cevabının Tekrarlanabilirliği ve Sensörün Tekrar Üretilebilirliği

Birden fazla elektrodun aynı parametreler ve ortam koşulları kullanılarak hazırlanması ile oluşturulan sensörlerden alınan cevaplar arasında uyum olması gerekir. Bu uyum sensörün tekrar üretilebilir özellikte olduğunu göstermektedir. Sensör cevabının tekrarlanabilirliği ise tek bir elektrot ile yapılan birden fazla ölçüme ait cevapların karşılaştırılması ile incelenmektedir. Sensör cevabının tekrarlanabilirliği ve sensörün tekrar üretilebilirliği, elektrotlardan alınan cevapların bağıl standart sapma %'lerinin (%BSS) hesaplanması ile elde edilmektedir.

2.12 Doğrusal Çalışma Aralığı, Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Analitik yöntemlerin doğrusal çalışma aralıkları, doğrusal kalibrasyon grafiği ile tayin edilen derişim aralığıdır. Derimin aralığının alt sınırı genelde gözlenebilme sınırı olarak kabul edilmektedir. Aralığın üst sınırı, kalibrasyon grafiğine ait eğimin doğrusallıktan sapmaya başladığı derişimdir. Üst sınır belirlenirken dikkate alınan değer, sapmanın %5 olduğu noktadır. Absorpsiyon spektrofotometrisi doğrusallığında üst sınır derişimi, alt sınır derişiminin 10-10^3 katıdır (Skoog vd., 2007).

LOD, bir güven seviyesi içinde rapor edilebilen en küçük derişim olarak tanımlanır. Her yöntemde bir LOD değeri bulunmaktadır. Analitin standart sapmasından (s) daha büyük bir güvenilirlik sayısına (k) sahip bir sinyal üreten en küçük derişim, kalibrasyon grafikleri kullanan teknikler için LOD değeridir. Bir sistemin veya yöntemin ölçebileceği en küçük analit miktarı, özünde LOD'dir.

$$LOD = \frac{3s}{m}$$

$$LOQ = \frac{10s}{m}$$

Bu değer, kullanılan yöntemin ne kadar iyi performans gösterdiğini ifade eder. LOQ, bir tayinin yapılabileceği en düşük derişimdir ve LOD'nin yaklaşık 3 katı olarak tanımlanır (Kalfa vd., 2009). Daha doğru bulgular elde etmek için örnek içerisindeki analit derişimi en az LOQ kadar olmalıdır.

3. KAYNAK ÖZETLERİ

Jolly ve arkadaşları, 2016 yılında yaptıkları çalışmada, geleneksel moleküler baskılama ile karşılaşılan zorlukların üstesinden gelmek için biyomoleküler tanıma elemanlarının MIP ile birleştirildiği yeni bir sentetik reseptör sensörünün tasarlandığını bildirmiştir. Prostat spesifik antijen (PSA) tiyolatlı DNA Apt'i, öncelikle PSA ile kompleks haline getirilmiştir. Ardından bir Au elektrot yüzeyinde immobilize edilmiştir. Dopaminin, kompleksin etrafındaki kontrollü elektropolimerizasyonu sağlanmıştır. Böylece hem kompleksi hapsetmesi hem de Apt'i bağlanma konformasyonunun içinde veya yakınında tutması sağlanmıştır. PSA'nın yüzeyden uzaklaştırılmasının ardından, MIP boşluğunun gömülü Apt ile sinerjik olarak hareket ederek bir hibrit reseptör (MIP-Apt) oluşturacağı ve tek başına Apt'den daha üstün tanıma özellikleri sergileyeceği öne sürülmüştür. PSA'nın MIP-Apt yüzeyine yeniden bağlanma analizlerinin gerçekleştirilmesi için EIS yöntemi kullanılmıştır. Sensörün LOD değeri 1 pg mL^{-1} olarak belirlenmiş, bu da sensörün yüksek hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir. Sensörün analitik performans gösterdiği doğrusal aralık 100 pg mL^{-1}-100 ng mL^{-1} olarak belirlenmiştir (Jolly vd., 2016).

Roushani ve arkadaşları, 2019 yılında ikili tanıma sistemine sahip bir aptasensör kullanılmıştır. Bu aptasensör, kloramfenikol (CAP) seçici tespitinin MIP ile kombinasyonu üzerine kurulmuştur. Bir antibiyotik olan CAP'ın kalıntılarının insan sağlığı üzerinde ciddi yan etkiler yarattığı bilinmektedir. Camsı karbon elektrot (GCE) yüzey üzerine 3-aminometil piridin ile işlevselleştirilmiş grafen oksit (GO) (3-ampi-RGO) kaplanmıştır. Elde edilen platform üzerine gümüş nanoparçacıklar (AgNP's) kaplanmış ve ardından Ag-N'nin bağ oluşumu kullanılarak GCE üzerine CAP-kompleks-amino-Apt (NH_2-Apt[CAP]) eklenmiştir. MIP oluşumunun gerçekleşmesi için rezorsinol elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından Apt/CAP kompleksi sınırlanmış ve polimer yalnızca Apt'i tutmuştur. CAP'ın yüzeyden uzaklaştırılmasından sonra oluşan boşlukların gömülü Apt'ler ile sinerjistik bir etki yarattığı görülmüştür. MIP ve Apt'in kesinlik özellikleri, mükemmel algılamaya yol açmıştır. Sensörde LOD, 0,3 pM, analitik performansının gerçekleştiği doğrusal aralık ise 1 pM-1 nM aralığındadır (Roushani vd., 2019).

Liang ve arkadaşları, 2019 yılında Lyz'nin elektrokimyasal tayini için GCE yüzey üzerinde nanoyapılı manyetik moleküler baskılı polimer ($CuFe_2O_4$-MIP) temelli seçici ve hassas bir elektrokimyasal sensör geliştirmiştir. $CuFe_2O_4$ nanosfer yüzeyi üzerinde MIP nanopartikülleri hazırlamak için yüzey baskısı kullanılmıştır. Sensörün elektrokimyasal analizi EIS, CV, DPV yöntemleri ile yapılmıştır. Optimum koşullar altında, oluşturulan çok işlevli sensör, hedef Lyz için 1,58 $x10^{-3}$ µg mL^{-1} teşhis sınırı ile 0,05-0,8 µg mL^{-1} arasında iyi bir doğrusallık sunmuştur. Yeniden bağlanma deneylerinin sonuçları ile sensörün Lyz tespiti için oldukça seçici ve hassas olduğu ve karmaşık biyolojik örneklerde analit tespitini başarıyla uyguladığı belirtilmiştir (Liang vd., 2019).

Amiloid-β oligomerleri (AβO'lar), Alzheimer hastalığı (AD) tanısını kolaylaştırmak için büyük önem taşımaktadır. You ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan çalışmada, tanıma elemanı olarak MIP'ler ve Apt kullanılarak AβO'nun oldukça hassas ve seçici tespiti için yeni bir sandviç temelli elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. AβO hedef moleküllerini tanımak için antikor yerine AβO'nun seçici tayininin yapılabilmesi için bir MIPs/hedef/Apt sandviç temelli sensörü oluşturulmuştur. AβO'ya özgü Apt, AgNP'ler ve silis nanoparçacıkları (SiO_2@AgNP'ler) ile birleştiren yüzeyde immobilize edilmiştir. Sensörün LOD değeri 1,22 pg mL^{-1} ve doğrusal çalışma aralığı 5 pg mL^{-1} -10 ng mL^{-1} olarak belirlenmiştir (You vd., 2020).

Mahmoud ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada histaminin (HIS) spesifik olarak tanınması için elektrokimyasal Apt tabanlı bir sensör (aptasensör) tasarlanmıştır. Sensör tasarımı GCE üzerine modifiye edilmiş AuNP ve karboksillenmiş karbon nanotüpler (cCNT'ler) ile MIP ve DNA aptameri (MIP-Apt/AuNPs/cCNTs/GCE) kullanımına dayanmaktadır. Aptasensör, MIP boşlukları ve Apt etkileşimi olmak üzere iki tanıma elemanına sahip olduğundan, HIS tespitine karşı yüksek seçicilik sergilemiştir. Hazırlanan sensörün HIS'e maruz kalması üzerine, HIS derişimine bağlı olarak redoks probunun akımı azalmıştır. Apt derişimi, inkübasyon süresi, pH ve AuNP'lerin elektrobiriktirme süresi etkileri optimize edilmiştir. Analizler DPV ve EIS teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. Sensörün analitik performansı DPV yöntemi için 0,46-35 nmol L^{-1}, EIS yöntemi için ise 0,35-35 nmol L^{-1} doğrusal aralığındadır. LOD değeri, DPV ve EIS yöntemleri için sırasıyla 0,15 nmol L^{-1} ve 0,11 nmol L^{-1} olarak belirlenmiştir. Üretilen

sensörün yüksek seçicilik ile iyi tekrarlanabilirlik özellik gösterdiği belirtilmiştir. HIS tespiti için insan plazması ve konserve ton balığı numuneleri kullanılmıştır (Mahmoud vd., 2020).

Di Giulio ve arkadaşları, 2021 yılında skopoletinin elektropolimerizasyonu ile elde edilmiş MIP temelli bir elektrokimyasal sensör üretimi gerçekleştirmiştir. Lyz'nin sensör yüzeyine baskılanması için sırasıyla bir monomer şablon karışımının kullanımına ve polimer sentezinden önce enzimin kovalent immobilizasyonuna dayanan iki farklı yaklaşım kullanılmıştır. İkinci yaklaşımda, Lyz için uygun bir bağlayıcı sağlamak üzere, 4-aminotiofenol yoluyla Au elektrotun amino grupları kullanılarak işlevselleştirilmesi ve ardından glutaraldehit ile tepkime ile çok adımlı bir protokolden yararlanılmıştır. Yapılan elektron modifikasyonlarının her adımı, CV ve EIS teknikleri ile izlenmiştir. Enzim immobilizasyonu uygulanan ve uygulanmayan MIP'ler için LOD, sırasıyla 62 nM ve 141 nM olarak belirlenmiştir. Yeniden bağlama analiz sonuçları, bu algılama malzemesinin Lyz tayini için seçici olduğunu göstermektedir. Geliştirilen sensörün gerçek numunelerde potansiyel uygulamalarını değerlendirmek için yapay tükürük numuneleri kullanılmıştır (Di Giulio vd., 2021).

Zouaoui ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada Lyz'nin hassas tayini için impedimetrik bir mikrosensör tasarlanmıştır. Bu sensörün geliştirilmesi için polipirol (PPy) iletken film ile birleştirilmiş kitosan bazlı MIP uygulanmıştır. Elde edilen mikrosensörleri karakterize etmek için CV, EIS, FT-IR analizi ve SEM gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralık $2{,}17\times10^{-11}$ M-$3{,}5\times10^{-6}$ M ve LOD 5×10^{-12} M olarak belirlenmiştir. Mikrosensör yüksek hassasiyet, iyi seçicilik, iyi tekrarlanabilir sensör cevapları, iyi yeniden üretilebilme özellikleri göstermiştir. Gerçek numune analizleri için yumurta akı kullanılmıştır (Zouaoui vd., 2021).

Roushani ve arkadaşları (2021), yemlerde yasa dışı olarak kullanılan ve insan vücudunda izlemenin önemli olduğu raktopaminin (RAC) ultra hassas tayini için Apt ve MIP ile ikili tanıma stratejisinin kullanıldığı elektrokimyasal bir sensör geliştirmiştir. Yüzey ilk olarak AgNP'ler ile modifiye edilmiştir. Modifiye yüzey üzerine Apt[RAC] kompleksi

immobilize edilmiş, MIP oluşumu için dopamin elektropolimerizasyonu yapılmıştır. Fabrikasyon adımlarının analizi için EIS ve CV tekniklerinden yararlanılmıştır. Sensörün LOD değeri 330 aM, doğrusal çalışma aralığı ise 1 fM-1,9 µM olarak belirlenmiştir. Sensör yüzeyinde RAC tayini için insan kan serumu ve idrar örneklerinden yararlanılmıştır (Roushani vd., 2021).

Roushani ve arkadaşları, 2022 yılında yaptıkları çalışmada aflatoksin B1 (AFB1) tespitinin gıda güvenliği ve insan sağlığındaki önemini göz önünde bulundurarak Apt ve MIP'in hibritine dayalı bir sensör geliştirmiştir. Bu sensörde GCE yüzeyi öncelikle Cu_2O nanoküpleri (Cu_2O NC/GCE) ile modifiye edilmiştir. Ardından Apt/[AFB1] kompleksi immobilize edilmiş ve bu kompleks etrafında dopamin elektropolimerizasyonu ile MIP oluşumu gerçekleştirilmiştir. Sensörün LOD değeri 12 pg L^{-1}, doğrusal analiz aralığı 50 pg L^{-1}- 3,5 ng L^{-1} ve 40 ng L^{-1}- 12 pg L^{-1} olarak belirlenmiştir (Roushani vd., 2022).

Wan ve Han tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada elektrokimyasal olarak Lyz tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için GCE yüzey üzerine AuNP ve ferrosen dikarboksilik asit ($Fc(COOH)_2$) modifikasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada Lyz tayini için basit ve kullanışlı bir sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sensörün analitik performans gösterdiği doğrusal çalışma aralığı 0,10-0,70 mmol L^{-1}, LOD değeri ise 0,07 mmol L^{-1} olarak belirlenmiştir. Çalışmada yumurta akı numunesine standart ekleme yöntemi yapılmış ve %95,45-102,62 aralığında geri kazanım elde edilmiştir (%BSS değeri ≤6,75'tir.) (Wan & Han, 2023).

Beiki ve arkadaşları, 2023 yılında MIP-aptamer çift reseptörünü kullanarak elektrokimyasal bir biyosensör üretimi gerçekleştirmişlerdir. İlk olarak GCE yüzeyi, çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler), nitrojen katkılı karbon kuantum noktaları (N-CQD'ler) ve kitosan içeren bir nanokompozit ile modifiye edildi. Daha sonra Apt[Lyz], nanokompozitte bulunan karboksil grupları ile Apt'in amin grupları arasındaki bağlanma yoluyla MWCNT-N-CQDs-kitosan/GCE üzerinde immobilize edilmiştir. Bunu takiben yüzeydeki Apt[Lyz] etrafında metilen mavisi monomeri elektrokimyasal olarak polimerize edilmiştir. Son olarak şablonun yüzeyden uzaklaştırılmasından sonra kalan boşluklar, yeni bir MIP-aptamer hibrit reseptörü yaratmıştır MWCNT-N-CQDs-kitosan

nanokompoziti, amino işlevli aptamerlere bağlanmak için büyük miktarlarda karboksil grupları, önemli ölçüde elektriksel iletkenlik ve yüksek bir yüzey-hacim oranı sağlamıştır. Böylece Apt[Lyz] immobilizasyonu kolaylaşmış ve gelişmiş elektrokimyasal sinyal sağlamıştır. Elde edilen MIP-aptamer hibrit reseptörü, 1 fM ile 100 nM doğrusal aralığında 4,26 fM kadar düşük derişimlerde bile lizozim analizini gerçekleştirebilmiştir (Beiki vd., 2023).

Huang ve arkadaşları, 2023 yılında seçici progesteron (P4) tespiti için SnO_2-grafen (SnO_2-Gr) nanomateryal ve AuNP'lere dayalı yeni bir moleküler baskılı elektrokimyasal aptasensör etmiştir. Oldukça iletken olan SnO_2-Gr, P4'ün adsorpsiyon kapasitesini geliştirmiştir. Biyouyumlu monomer olarak Apt, AuNP'ler tarafından Au-S bağı yoluyla modifiye edilmiş elektrot üzerinde yakalanmıştır. MIP film, p-aminotiyofenol polimerizasyonu ve P4 şablonundan oluşmuştur. MIP ve Apt'in P4'e yönelik sinerjik etkisi nedeniyle, elde edilen sensör, tek tanıma elemanı olarak MIP veya Apt içeren sensörden daha iyi seçicilik sergilemiştir. Hazırlanan sensörün LOD değeri 1,73 x 10^{-15} M olarak belirlenmiştir (Huang vd., 2023).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması boyunca kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve temin edildikleri firma

Kimyasal Madde	**Saflık Derecesi (%)**	**Firma**
Lizozim(Lyz)	≥90	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür (KCl)	≥99	Sigma-Aldrich
Tris hidroksimetil aminometan	≥99,9	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$)	≥99	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrosiyanür trihidrat ($K_4Fe(CN)_6.3H_2O$)	≥99	Sigma-Aldrich
Tetrakloraurik asit ($HAuCl_4.3H_2O$)	Au %49 min.	Alfa Aesar
Sodyum klorür (NaCl)	≥99	Sigma-Aldrich
Magnezyum klorür ($MgCl_2$)	≥99	Sigma-Aldrich
orto-fenilendiamin (*o*PD)	≥99	Sigma-Aldrich
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	≥99	Merck
Tris hidroklorür (TRIS-HCl)	≥99	Sigma-Aldrich

Çizelge 4.2 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve temin edildikleri firma (devam)

Kimyasal Madde	Saflık Derecesi (%)	Firma
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	≥97	Sigma-Aldrich
Asetik asit (AA)	≥99,8	Sigma-Aldrich
Sığır serum albümini (BSA)	-	Sigma-Aldrich
α-2-makro globülin (A2m)	≥95	Sigma-Aldrich
Albumin (Alb)	-	Sigma-Aldrich
Kazein (Cas)	-	Sigma-Aldrich
Haptaglobin (Hp)	≥95%	Sigma-Aldrich
Miyoglobin (Myg)	≥95	Merck
Vişne Suyu	50	Jucy
Karışık Meyve Suyu	50	Netto
Kırmızı Şarap	50	Belair

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilmiş olan sensörde MIP-Apt yapısının oluşturulabilmesi için gereken Apt, Metabion firmasından temin edilmiştir. Apt, HPLC yöntemi ile saflaştırılarak yapay olarak sentezlenmiştir. Literatürler incelenerek Lyz tayini için kullanılması gereken en uygun Apt dizilimi belirlenmiştir. Kullanılan Apt'in sahip olduğu dizilim aşağıda verilmiştir:

5'-(SH)-$(CH_2)_6$ -ATC TAC GAA TTC ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3' (Rapini & Marrazza, 2017; Sanchez-Martinez & Aguilar-Caballos, M. P., Gomez-Hens, 2004; Sefah vd., 2009).

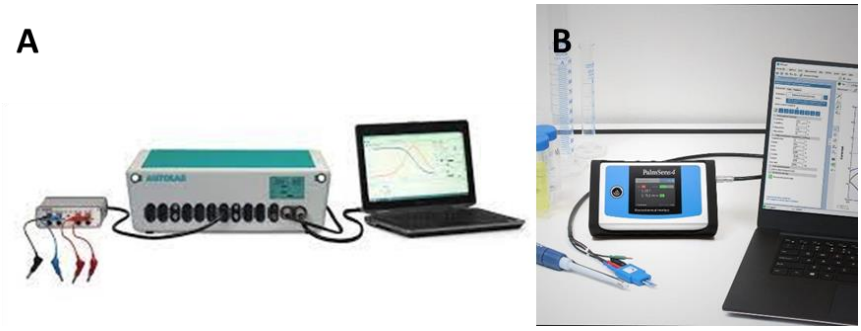
4.2 Kullanılan Cihaz Sistemleri ve Diğer Ekipmanlar

Bu tez çalışmasında, **Şekil 4.1**'de gösterilen DropSense DRP-110 perde baskılı elektrot (SPE) sistemi kullanılmıştır. Bu elektrot sistemi; karşıt elektrot, çalışma elektrodu ve Ag/AgCl referans elektrot olmak üzere üç elektrot çeşidini bir arada bulundurmaktadır. SPE üretimi seramik ve plastik yüzeyler üzerine çeşitli mürekkep türlerinin basılması ile gerçekleştirilir. Kullanılan SPE'lerde seramik yüzey ve karbon temelli çalışma elektrodu bulunmaktadır. SPE'ler düşük maliyetli olma avantajına ve çeşitli malzemelerden üretilebilme esnekliğine sahiptirler. Aynı zamanda tek kullanımlık olmaları ile zaman alıcı temizlik prosedürlerine gerek kalmadan kullanılabilir ve kolayca imha edilebilirler (Mohamed, 2016; Negahdary vd., 2023). Bahsedilen avantajları göz önünde bulundurularak bu çalışmada SPE tipi elektrot sistemi kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.1 DropSense DRP-110 perde baskılı elektrot

Tez çalışması kapsamında yapılan elektrokimyasal analizlerde bilgisayar ile bağlantılı Autolab-PGSTAT 302N (FRA modüllü) **(Şekil 4.2.A)** ve Palmsens4 **(Şekil 4.2.B**.) potansiyostat/galvanostat sistemleri kullanılmıştır.



Şekil 4.2 (A) Autolab-PGSTAT 302N ve (B) Palmsens4 potansiyostat/galvanostat ölçüm cihazı

Deneysel aşamalar boyunca kullanılan çözeltilerin hazırlanması için ELGA Purelab Optimum-Q cihazı ile distile edilmiş ultra saf su kullanılmıştır. Kullanılan katı kimyasal maddelerin tartılması için KERN marka ABT 220-5DM model terazi kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin çözünürlüğünü arttırmak ve çözeltileri karıştırmak için Bandelin Sonorex marka ultrasonik su banyosu ve ISOLAB marka vorteks cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin pH değerlerinin ölçülmesi HAMILTON marka CH7402 Bonaduz model pH elektrodu ve Thermo ORION 720A pH metre ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel aşamalarda Eppendorf Research Plus mikro pipetler; 0,5 mL ve 1,5 mL hacme sahip Eppendorf mikrosantrfifüj tüpleri, 15 mL hacme sahip Falkon tüpleri ve BEMIS marka parafilm kullanılmıştır.

Kullanılan elektrotların yüzey karakterizasyonu için AFM, XPS ve SEM teknikleri kullanılmıştır. AFM ve XPS analizleri Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından gerçekleştirilmiştir. AFM analizleri için Bruker Dimension Edge, XPS analizleri için ise Thermo Scientific K-Alpha ölçüm cihazı kullanılmıştır. SEM analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nde FEI Quanta 400F Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SEM ölçümü yapılacak olan SPE yüzeyleri, mikrograflar kaydedilmeden önce vakum altında Au-Pd alaşımı ile kaplanmıştır.

4.3 Yapılan elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan parametreler

Bu tez çalışmasında, farklı platformlara sahip elektrot yüzeylerinin elektrokimyasal ölçüm sonuçları incelenmiştir. SPE, GO/SPE, AuNP/GO/SPE, MIP-Apt/AuNP/GO/SPE yüzeylerinin optimizasyon ve elektrokimyasal karakterizasyon aşamalarında CV, DPV ve EIS yöntemleri kullanılmıştır. Ölçümlerin tamamı 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl redoks çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. CV ölçümleri (-0,5)-(+0,6) V potansiyel aralığında, DPV ölçümleri ise (-0,3)-(+0,6) V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir. CV 50 mV s^{-1} tarama hızında, DPV ise 14,75 mV s^{-1} tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

EIS ölçümleri, 10^{-1}-10^{5} frekans aralığında açık devre potansiyelinde 0,5 mV pertüsbasyonda gerçekleştirilmiştir. EIS sonuçları Nyquist eğrisi olarak kaydedilmiştir. Elektrot yüzeyleri için elektron transfer direnç değerleri (R_{ct}) eşdeğer devre modeli kullanılarak hesaplanmıştır.

4.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlık Aşamaları

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal çözeltilerin hazırlık aşamaları aşağıda verilmiştir.

4.4.1 Grafen oksit (GO) çözeltisinin hazırlanması

1,5 mg mL^{-1} derişime sahip GO çözeltisi hazırlamak için 1,5 mg katı GO hassas terazide tartılmış ve 1 mL ultra saf su içerisinde dispers olması için 15 dakika ultrasonike su banyosunda sonike edilmiştir.

4.4.2 $HAuCl_4$ çözeltisinin hazırlanması

50 mM $HAuCl_4$ stok çözeltisinin hazırlanması için 85 mg katı $HAuCl_4$ tartılmış ve 5 mL ultra saf su içerisinde çözünmüştür. Deneysel çalışmalarda stok çözelti 0,1 M KCl çözeltisi kullanılarak taze olacak şekilde 1 mM derişime seyreltilmiştir.

4.4.3 Lyz çözeltilerinin hazırlanması

Tavuk yumurtasından izole edilmiş katı Lyz (Sigma-Aldrich) uygun miktarda tartılmış ve ultra saf su ile çözülerek 10^{-6} M stok Lyz çözeltisi elde edilmiştir. Deneysel aşamalarda ihtiyaç duyulan derişime sahip çözeltilerin elde edilmesi için yapılan seyreltmelerde ultra saf su kullanılmıştır.

4.4.4 Apt çözeltilerinin hazırlanması

Bölüm 4.1'de verilen dizilime sahip Lyz Apt'in Bölüm 4.3.11'de anlatıldığı şekilde hazırlanan TE tamponu içerisinde 100 µM stok çözeltisi hazırlanmıştır. Deneysel aşamalar boyunca Apt çözeltileri TE tamponu ile uygun derişimlerde seyreltilmiştir.

4.4.5 Aptamer-Lizozim (Apt[Lyz]) kompleks çözeltisinin hazırlanması

5 µM Apt çözeltisi 2 dakika boyunca 95ºC'de bekletilerek denatüre edilmiştir (Sarabaegi & Roushani, 2021). Ardından denatüre edilmiş 5 µM Apt çözeltisi ile 2 pM Lyz çözeltisi (1:1) bir tüpe aktarılmış ve 1 saat boyunca 37°C'ye ayarlanmış inkübatör içerisinde bekletilmiştir (Rad & Azadbakht, 2019).

4.4.6 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin hazırlanması

Elektrokimyasal ölçümler kullanılan 5 mM redoks çözeltisinin hazırlanması için 0,0825 g $K_3Fe(CN)_6$, 0,105 g $K_4Fe(CN)_6$ ve 0,372 g KCl tartılmış, ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

4.4.7 *o*rto-fenilendiamin (*o*PD) çözeltisinin hazırlanması

5 mg katı *o*PD tartılmış ve 5 mL TRIS-HCl tamponu ile çözülmüştür. Elde edilen çözelti -18°C'de depolanmıştır.

4.4.8 SDS:AA uzaklaştırma çözeltisinin hazırlanması

%5'lik (h/h) asetik asit (AA) çözeltisi, 5 mL AA ve 95 mL ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Ardından ultra saf su ve katı halde bulunan sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılarak %5 (a/h) SDS çözeltisi hazırlanmıştır (Jolly vd., 2016). Bu çözeltiler kullanılarak SDS:AA (1:1) uzaklaştırma çözeltisi elde edilmiştir.

4.4.9 Girişim yapan madde çözeltilerinin hazırlanması

Seçicilik çalışmalarında kullanılan sığır serum albümini (BSA), albümin (Alb), kazein (Cas), haptoglobin (Hp), miyoglobin (Myg) ve α-2makroglobulin (A2m) katıları ayrı ayrı tartılmış ve ultra saf su içinde her birinden stok çözeltiler hazırlanmıştır. Ardından bu stok çözeltiler yine ultra saf su kullanılarak 100 pM'a seyreltilmiştir. Lyz içeren girişim çözeltilerinin hazırlanması için 1 pM Lyz ve 100 pM girişim çözeltisinden eşit hacimde alınmış ve bir tüp içerisinde karıştırılmıştır. Elde edilen çözeltiler -4 °C'de depolanmıştır. Sensörün seçicilik özelliği, aşağıdaki denklem kullanılarak incelenmiştir:

$$[(I_{Girişim+Lyz} - I_{Lyz})/I_{Lyz}]x100$$

4.4.10 Gerçek numune çözeltilerinin hazırlanması

Gerçek numune analizleri sırasında yerel marketten alınmış vişne suyu, karışık meyve suyu ve kırmızı şarap örnekleri kullanılmıştır. Örnekler herhangi bir ön işlem yapılmadan, ultra saf su ile iki kat seyreltilmiştir (Rezaei vd., 2018). Seyreltilmiş örnek ile 1 pM Lyz, (1:1) karıştırılmıştır. Böylece Lyz içeren gerçek numune çözeltileri elde edilmiştir.

4.4.11 pH 8 TRIS-EDTA (TE) tampon çözeltisinin hazırlanması

Apt'in çözücüsü olarak kullanılan TE tamponu 0,788 g Tris-HCl, 0,186 g EDTA ve 500 mL ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltinin pH'ı NaOH ve HCl çözeltileri kullanılarak 8,0'e ayarlanmıştır.

4.4.12 pH 7,4 TRIS-HCl tampon çözeltisinin hazırlanması

0,024 g $MgCl_2$, 0,745 g KCl, 0,292 g NaCl ve 0,1575 g TRIS-HCl katıları tartılmış ve saf suda çözülmüştür. Tamponun pH değeri NaOH ve HCl kullanılarak 7,4'e ayarlanmış, ultra saf su ile çözelti hacmi 50 mL'ye tamamlanmıştır. TRIS-HCl tamponu sensör yüzeyinin yıkanması ve *o*PD çözeltisinin hazırlanması için kullanılmıştır.

4.5 Lyz Tayini için MIP-Apt Temelli Sensörün Hazırlanması

MIP-Apt/AuNP/GO/SPE yüzey platformuna sahip MIP-Apt temelli sensörün tasarlanması sırasında çeşitli nanomalzemeler kullanılarak yapılan modifikasyonlar ve bu nanomalzemelerin kullanım koşulları aşağıda açıklanmıştır.

4.5.1 Biyosensör yüzeyinin modifikasyon aşamaları

SPE yüzeyi üzerine ilk olarak GO modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 10 µL 1,5 mg mL^{-1} (optimize edilmiş GO miktarı) GO çözeltisi yüzeye damlatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuru yüzey üzerine AuNP elektrobiriktirmesi yapılmıştır. Bu aşamada, 60 µL $HAuCl_4$ (0,1 M KCl ile hazırlanmış 1 mM $HAuCl_4$ çözeltisi), oluşturulan GO/SPE yüzeyinin üzerine damlatılmıştır. Elektrobiriktirme işlemi (-0,3)–(+1,2) V potansiyel aralığında (Erkmen vd., 2022), 100 mV s^{-1} tarama hızında, 15 döngüde (optimizasyon ile belirlenmiş döngü sayısı) CV tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon tamamlandıktan sonra yüzey ultra saf su ile yıkanmış ve elektrot oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

4.5.2 MIP-Apt temelli biyosensör yüzeyinde MIP oluşumu

AuNP ve GO modifikasyonları yapılarak hazırlanan modifiye yüzey (AuNP/GO/SPE) üzerine Apt[Lyz] çözeltisinin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Apt[Lyz], Bölüm 4.3.5'te anlatıldığı gibi hazırlanmış ve Bölüm 4.4.1'de hazırlık aşamaları anlatılan modifiye yüzey üzerine damlatılmıştır. Elektrot bir gece boyunca +4 °C'de (Roushani

vd., 2019) nemli bir petri kabı içerisinde bekletilerek damlatılan kompleks çözeltinin kuruması önlenmiş ve başarılı bir immobilizasyon sürecinin gerçekleşmesi sağlanmıştır.

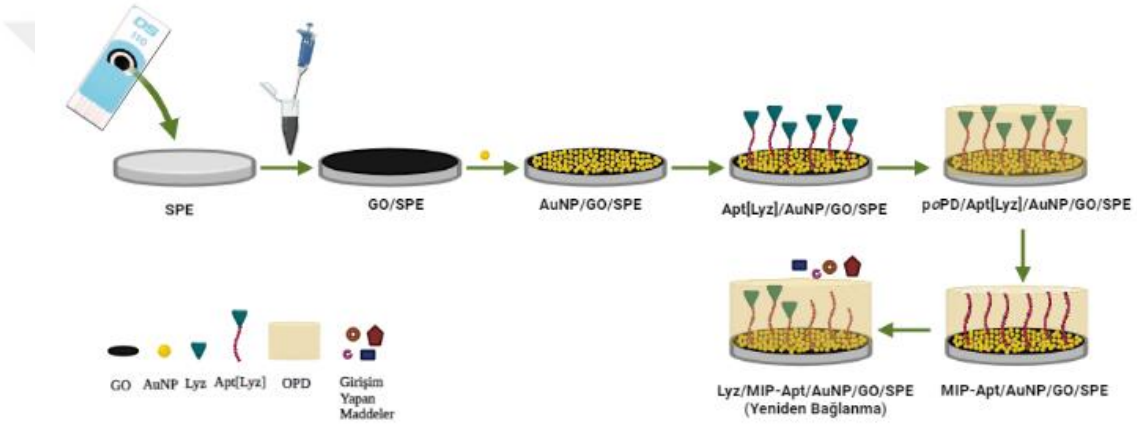
Başarılı bir Apt immobilizasyonu sürecinin ardından yüzeyden Apt[Lyz] çözeltisi ile ilgili olmayan biyomoleküllerin uzaklaştırılması için TRIS-HCl tamponu ile yıkama yapılmıştır. Bir sonraki aşama doyurma aşamasıdır. Doyurma aşamasında, yüzeye bağlanan Apt[Lyz] çözeltisinde serbest halde kalan Apt moleküllerinin (Mahmoud vd., 2020) tamamen immobilize olması için 10 nM Lyz çözeltisi (10 µL) yüzey üzerinde 1 saat bekletilmiştir. Doyurma aşamasının ardından fazla biyomoleküllerin uzaklaştırılması için TRIS-HCl tamponu ile yapılan yıkama işlemi tekrarlanmış ve yüzeyde MIP oluşturma aşamasına geçilmiştir.

MIP oluşumunun gerçekleşmesi için TRIS-HCl tamponu ile çözünmüş 60 µL *o*PD çözeltisi, elektrokimyasal polimerizasyona tabi tutulmuştur (Mahmoud vd., 2020). Elektropolimerizasyon (0 V)–(0,8 V) potansiyel aralığında, 50 mV s^{-1} tarama hızında ve 30 CV döngüsünde gerçekleştirilmiştir. Oluşan *o*PD/Apt[Lyz]/AuNP/GO/SPE yüzey platformundan Lyz'nin uzaklaştırılması ve bu analite ait şablon boşlukların oluşturulması için 10 µL SDS:AA uzaklaştırma çözeltisi yüzeye damlatılmış ve 30 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda uzaklaştırma çözeltisi yüzeyden çekilmiş ve elektrot oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Geliştirilmiş MIP-Apt biyosensörünün doğruluğunu araştırmak için moleküler baskılanmayan kontrol sensörü (NIP-Apt) hazırlanmıştır. NIP-Apt sensörünün hazırlık aşamalarında hiçbir Lyz çözeltisi kullanılmamıştır. NIP-Apt sensörünün bu tez çalışmasında hazırlanan MIP-Apt biyosensöründen tek farkı, içerisinde Lyz molekülü bulunmamasıdır. Bu nedenle NIP-Apt sensöründe yapılan uzaklaştırma aşamasında Lyz'ye ait spesifik şablon boşlukların oluşumu gerçekleşmemiştir. Bu boşlukların oluşmaması nedeniyle sensöre yeniden bağlanmak istenen Lyz molekülleri yüzeye tutunamaz. Lyz moleküllerinin yüzeye tutunamaması, sensörün Lyz moleküllerini ölçme yeteneği araştırıldığında herhangi bir pik akımının ortaya çıkmamasına sebep olmaktadır.

Oluşturulan NIP-Apt sensörüne ve MIP-Apt biyosensörüne ait kalibrasyon eğrileri karşılaştırılarak MIP-Apt biyosensörünün başarılı üretimi kanıtlanmaktadır.

Hazırlanan ve spesifik şablon boşluklarına sahip olan MIP-Apt biyosensörü, farklı derişimlerde Lyz çözeltileri ile bir saat boyunca inkübe edilerek Lyz'nin yüzeydeki spesifik boşluklara yeniden bağlanması sağlanmıştır. MIP-Apt biyosensörünün üretim aşamaları **Şekil 4.3**'de şematik olarak gösterilmiştir. Elektrokimyasal ölçümlerin tamamında redoks probu kullanılmıştır.



Şekil 4.3 MIP-Apt temelli biyosensörün üretim aşamalarının şematik olarak gösterimi

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

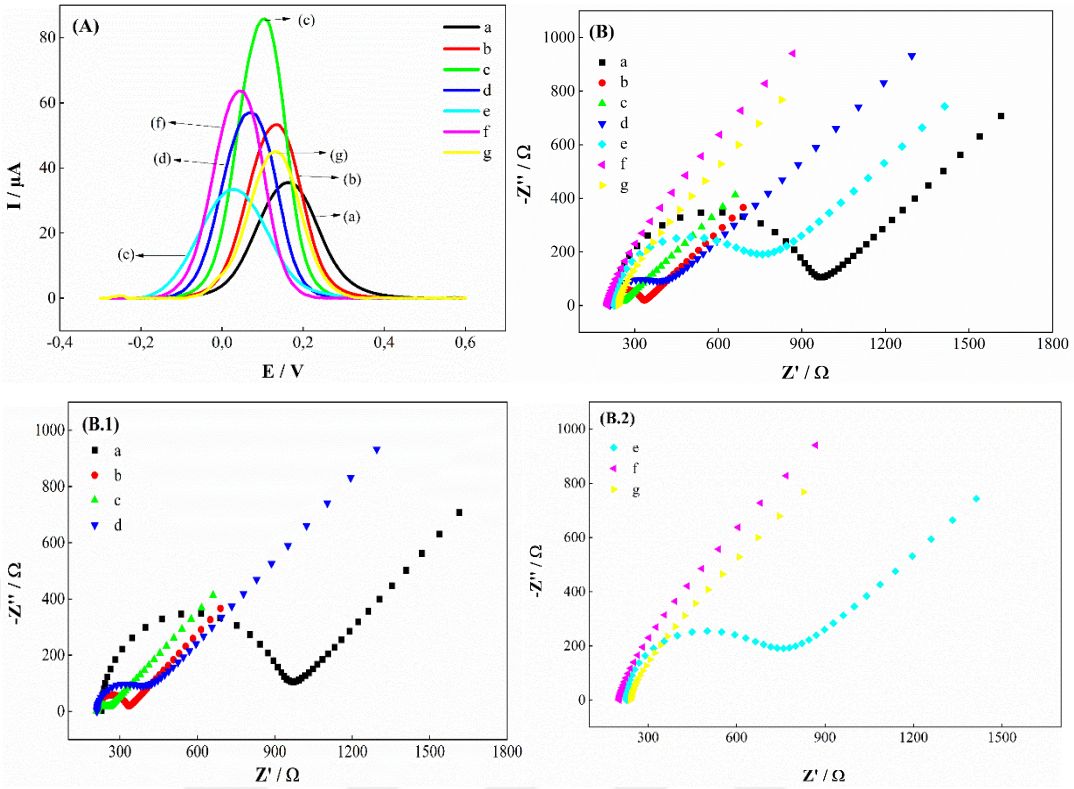
Bu tez çalışması kapsamında Lyz tayini için geliştirilen MIP-Apt temelli biyosensörün modifikasyon ve optimizasyon aşamalarına ait sonuçlar, aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

5.1 MIP-Apt Temelli Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

MIP-Apt biyosensörünün hazırlık aşamalarında yapılan modifikasyonlara ait ölçümler, DPV ve EIS yöntemleri ile kullanılarak yapılmıştır. **Şekil 5.1.A**'da,biyosensörün hazırlık aşamalarında elde edilen farklı yüzeylere ait DPV voltamogramları, karşılaştırmalı olarak verilmiştir. **Şekil 5.1.A**'da görüldüğü üzere, yalın SPE elektrot yüzeyine ait akım değeri, GO modifikasyonunun ardından 35,48 µA'den 53,24 µA'e yükselmiştir (b eğrisi). GO/SPE yüzeyine AuNP elektrobiriktirilmesi, akım değerinin 85,79 µA'e yükselmesine sebep olmuştur. Kararlı bir yapıya sahip olan AuNP'ler elektron transferini hızlandırmıştır (Filippova vd., 2023). Bu modifikasyon kombinasyonu; GO'in oksijen içeren gruplarının AuNP'lerin elektrobiriktirmesi için uygun bir arayüz görevi gördüğünü; AuNP'lerin ise yüzeyin iletkenliğini, elektron transfer hızını ve elektrokatalitik aktivitesini arttırdığını, ve immobilize edilecek Apt ile uyumluluk sağladığını kanıtlamaktadır (Aydoğdu Tığ ve Pekyardımcı, 2020). d eğrisinde (57,02 µA) akım değerinin azalması, modifiye elektrot üzerine bağlanan Apt[Lyz] biyomoleküllerinin bariyer görevi görerek yüzeyde sterik engel meydana getirdiklerini göstermektedir (Beiki vd., 2023; Roushani vd., 2021). e eğrisinde *o*PD'nin elektropolimerizasyonundan (p*o*PD oluşumu) sonra yüzey 33,40 µA akım değeri ile tüm modifikasyonlar arasındaki akım değerlerinin en düşüğüdür. Bunun sebebi, polimerin, redoks probunun elektrot yüzeyine ulaşmasını engelleyen yalıtkan bir tabaka oluşturmasıdır. Bu yalıtkan tabaka çözeltiden elektrot yüzeyine elektron aktarımını engellemektedir (Parnianchi vd., 2021). MIP oluşumunun ardından Apt[Lyz]'nin şeklini alacak şablon boşlukların oluşturulması için Apt[Lyz]'in yüzeyden uzaklaşması sağlanmıştır. f eğrisinde SDS:AA ile yapılan uzaklaştırma işleminin pik akımını 63,62 µA'e yükselttiği görülmektedir. p*o*PD'nin oluşturduğu yalıtkan tabakada açılan spesifik

şablon boşluklar elektron transferini, dolayısıyla pik akımını arttırmıştır (Roushani vd., 2022). Son adımda 100 pM Lyz ile (g eğrisi) yeniden bağlanma gerçekleştirilmiştir. Bu adımda pik akımı uzaklaştırma aşamasına göre azalmıştır (46,42 µA). Akım değerindeki bu düşüş, Lyz için spesifik boşluklara yeniden bağlanan hedef moleküllerin yalıtkan tabakada oluşan boşlukları doldurarak elektron aktarımını engellediğini kanıtlamaktadır.

Şekil 5.1.B'de MIP-Apt sensöründeki modifikasyonların yarattığı değişimler Nyquist eğrileri kullanılarak gösterilmiştir. Tüm veriler Randles eşdeğer devre modeli kullanılarak düzenlenmiştir. a eğrisinde görüldüğü gibi, SPE yüzeyinin yük transfer direnci (R_{ct}) 682,1 kΩ olarak ölçülmüştür. Yüzey üzerine sırasıyla yapılan GO ve AuNP modifikasyonları yüzey alanı ve iletkenliği arttırmış, bu nedenle R_{ct} değerleri sırasıyla 114,6 kΩ'a ve ardından 38,3 kΩ'a düşmüştür (eğri b ve eğri c). Apt[Lyz]'in modifiye yüzeye immobilizasyonu üzerine R_{ct} değeri d eğrisinde 161 kΩ'a yükselmiştir. Bu artışın yüzeyi kaplayan kompleksin varlığından kaynaklandığı bilinmektedir. Bir sonraki adımın gösterimi olan e eğrisinde *o*PD polimerizasyonu ile MIP oluşumunun bir direnç artışına sebep olduğu gözlenmiştir (460,1 kΩ). p*o*PD tabakasında bulunan Apt[Lyz] yüzeyden uzaklaştırıldığında R_{ct} değerinin 294,8 kΩ'a düştüğü görülmüştür (eğri f). Uzaklaştırma aşamasından sonra 100 pM Lyz'nin yeniden bağlanması, yalıtkan tabakadaki boşlukların azalması ile eğri g'nin R_{ct} değerinde artışa sebep olmuştur (332,1 kΩ).



Şekil 5.1 Sensörün hazırlık aşamalarının (a) SPE, (b) GO/SPE, (c) AuNP/GO/SPE, (d) Apt[Lyz]/AuNP/GO/SPE, (e) MIP-Apt/AuNP/GO/SPE uzaklaştırma öncesi, (f) MIP-Apt/AuNP/GO/SPE uzaklaştırma sonrası (sensör), (g) MIP-Apt/AuNP/GO/SPE yeniden bağlanma sonrası (A) DPV eğrileri, (B) Nyquist eğrileri (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl redoks çözeltisi içerisinde)

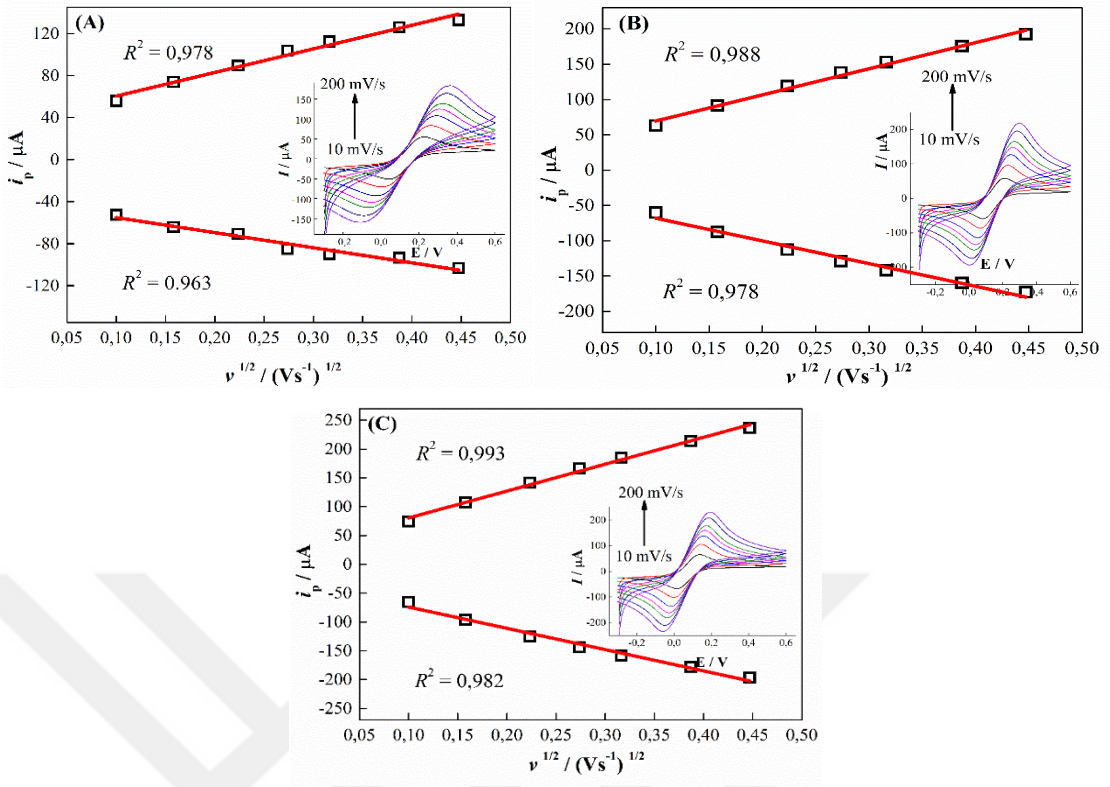
5.2 Tarama Hızı Çalışması

Yalın SPE, GO/SPE ve AuNP/GO/SPE elektrotların $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ türleri arasındaki elektron aktarımı üzerine etkisi CV tekniği ile optimum elektrot bileşimleri kullanılarak 10-200 mV s^{-1} tarama hızlarında incelenmiştir (**Şekil 5.2 iç grafik**). Elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının 10-200 mV s^{-1} aralığında tarama hızı ile orantılı olarak arttığı görülmüştür. Tarama hızının karekköküne karşılık anodik ve katodik pik akımları ayrı ayrı grafiğe geçirilmiş ve **Şekil 5.2'de** verilmiştir. Her iki grafikte elde edilen doğrusal grafik elektron transfer sürecinin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Abrori vd., 2021). Sensörlerin elektroaktif yüzey alanı, yarı tersinir elektron transfer süreçleri için Randles-Sevčik denklemi kullanılarak belirlenmiştir (Aydoğdu vd., 2013; Kadara vd., 2009)

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

Bu denklemde i_p pik akımı (A), n tepkimeye katılan elektronların sayısı (n = 1), A elektrot yüzey alanı (cm^2), C: $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ derişimi (mol cm^{-3}), D difüzyon katsayısı ve υ tarama hızıdır (V s^{-1}).

SPE, GO/SPE ve AuNP/GO/SPE yüzeylerine ait yüzey alan değerleri sırasıyla 0,188 cm^2, 0,252 cm^2 ve 0,303 cm^2 olarak hesaplanmıştır. **Şekil 5.2.B**'de görüldüğü üzere GO/SPE elektrodunda pik akımı artmıştır. Akım cevabındaki artış, GO'in elektroda daha geniş bir yüzey alanı sağlamasından ve elektron transfer hızını arttırmasından kaynaklanmaktadır (Wei vd., 2017). GO/SPE yüzeyinde biriktirilen AuNP'lerin çözelti ile elektrot ara yüzeyinde elektron transferini hızlandırdığı, bu nedenle elektrot performansının arttığı sonucuna varılmaktadır (**Şekil 5.2.C**) (Fan vd., 2013). Ayrıca AuNP kullanımı sayesinde, tiyol (-SH) ile fonksiyonelleştirilmiş Apt dizisinin yüksek afiniteyle AuNP'lere bağlanması sağlanmıştır. Sonuç olarak yapılan modifikasyon başarılı olduğu ve sensörün yüzey alanının arttığı görülmektedir. Yüksek elektroaktif yüzey alanı ve elektriksel iletkenliği nedeniyle modifiye elektrot yüzeyinde elektron transferi kolaylaşmıştır (Aydoğdu vd., 2013).



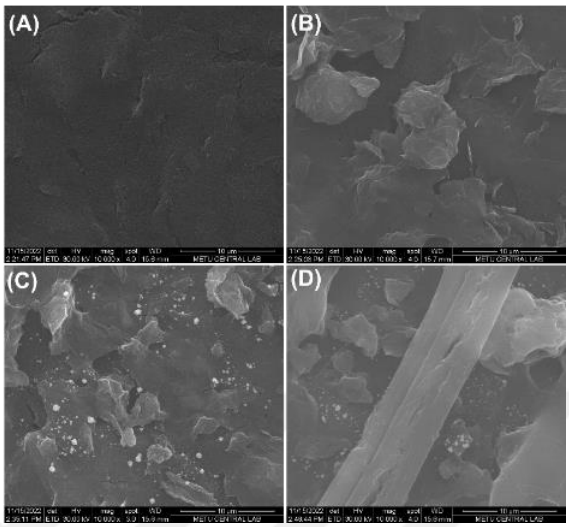
Şekil 5.2 (A) SPE, (B) GO/SPE, (C) AuNP/GO/SPE elektrotlarına ait tarama hızı çalışmaları

5.3 MIP-Apt Temelli Sensörün Yüzey Karakterizasyonu

Hazırlanan farklı elektrot yüzeylerine ait yüzey karakterizasyonları SEM, AFM ve XPS yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

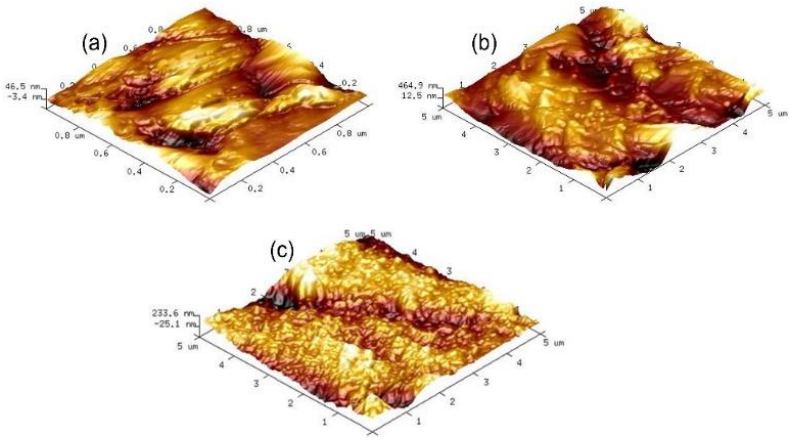
Şekil 5.3'te, (A) yalın SPE, (B) GO/SPE, (C) AuNP/GO/SPE ve (D) Apt/AuNP/GO/SPE yüzeylerine ait SEM görüntüleri verilmiştir. **Şekil 5.3.A**'da görüldüğü üzere, SPE pürüzsüz ve homojen bir yüzeye sahiptir. SPE yüzeyi GO ile modifiye edildiğinde **(Şekil 5.3.B),** yoğun karakteristik kırışık desene sahip bir yüzey morfolojisi sergilemiştir (X. Bai vd., 2014). **Şekil 5.3.C** ise AuNP/GO/SPE elektrotta GO tabakası üzerinde heterojen olarak dağılmış nanoboyutlu AuNP'leri göstermektedir. Ayrıca, AuNP'lerin elektrobiriktirmesi tiyol-etiketli Apt moleküllerini inkübe etmek için uygun bir mikro ortam sunmuştur. Apt'in AuNP/GO/SPE elektroduna immobilizasyonundan sonra (**Şekil 5.3.D)** fibriler yapıların meydana gelmesi Apt moleküllerinin AuNP/GO/SPE

elektroduna hapsolmasına bağlanabilir. Bu da Apt'in başarılı bir şekilde immobilizasyonunu işaret etmektedir (Erkmen vd., 2022).



Şekil 5.3 (A) SPE, (B) GO/SPE, (C) AuNP/GO/SPE ve (D) Apt/AuNP/GO/SPE yüzeylerinin SEM görüntüleri

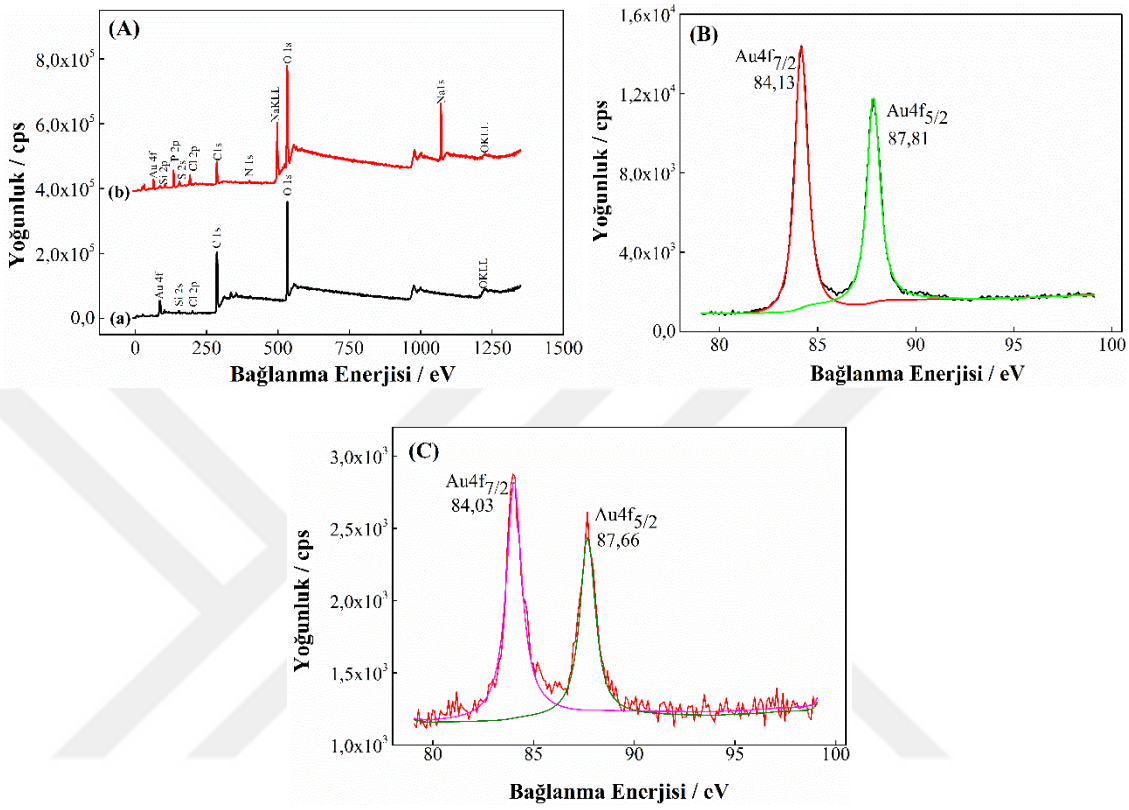
MIP ve NIP elektrotlarının yüzey topografileri AFM ile incelenmiş ve görüntüler 0,5 x 0,5 μm^{2}'de üç boyutlu olarak kaydedilmiştir. **Şekil 5.3.A**'da görüldüğü üzere, NIP sensörü, hedef molekül boşlukların bulunmaması nedeniyle 9,99 nm karekök ortalama (RMS) değeri ile nispeten düzgün bir topografya sergilemiştir (Zhu vd., 2023). Yüzeyin p*o*PD kullanılarak yalıtkan bir tabaka ile kaplanması ve ardından SDS:AA uzaklaştırma çözeltisi ile yıkanması sonucu MIP-Apt/AuNP/GO/SPE biyosensörünün oluşumu gerçekleşmiştir. MIP-Apt biyosensörünün (**Şekil 5.3.B**) RMS değeri 77,3 nm olarak belirlenmiştir. Görülen spesifik şablon boşlukları MIP tabakasının başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermektedir (Karimian vd., 2013). **Şekil 5.3.C**'de MIP sensörü üzerine Lyz moleküllerinin yeniden bağlanma işlemi görülmektedir. RMS değerinde MIP sensörüne göre azalış gözlenmiştir (28,8 nm). Buradan, önerilen MIP-Apt biyosensörünün başarılı bir şekilde üretildiği anlaşılmaktadır.



Şekil 5.4 (A) NIP, (B) uzaklaştırma çözeltisi ile yıkanmış MIP, (C) 10 nM Lyz ile yeniden bağlanmış MIP modifiye elektrotların AFM mikrografları

XPS, özellikle tanıma elemanlarının yeteneklerini tanımlayan sensörlerin karakterizasyonunda önemli rol oynayan bir tekniktir (Mazzotta vd., 2015). **Şekil 5.5.A**'da AuNP/GO/SPE ve Apt/AuNP/GO/SPE yüzeylerine ait XPS tarama spektrumları gösterilmiştir. AuNP/GO/SPE elektrodu C1s (285 eV) O1s (532 eV), $Au4f_{7/2}$ (84 eV), $Au4f_{5/2}$ eV (88 eV) piklerini göstermiştir. Apt immobilizasyonunun ardından AuNP/GO/SPE elektrodu piklerine ilave olarak Apt molekülünün varlığını gösteren N1s (400 eV), S2p3 (168.28 eV), S2p1 (169.58 eV) NaKLL (536 eV), Na1s (1071.28 eV), ve P2p (134.24 eV) pikleri de elde edilmiştir (Tığ ve Pekyardımcı, 2020). Ayrıca, Au4f'e ait genişletilmiş spektrumda, AuNP piklerinin yoğunluğu azalmıştır.

Şekil 5.5.B,C). Au4f piklerinin azalan yoğunlukları, Apt'in AuNP/GO/SPE yüzeyine başarılı bir şekilde immobilizasyonunu göstermektedir (Chandra vd., 2011).



Şekil 5.5 (A) (a) AuNP/GO/SPE ve (b) Apt/AuNP/GO/SPE'nin XPS spektrumları; (B) AuNP/GO/SPE, (C) Apt/AuNP/GO/SPE'nin genişletilmiş XPS spektrumları

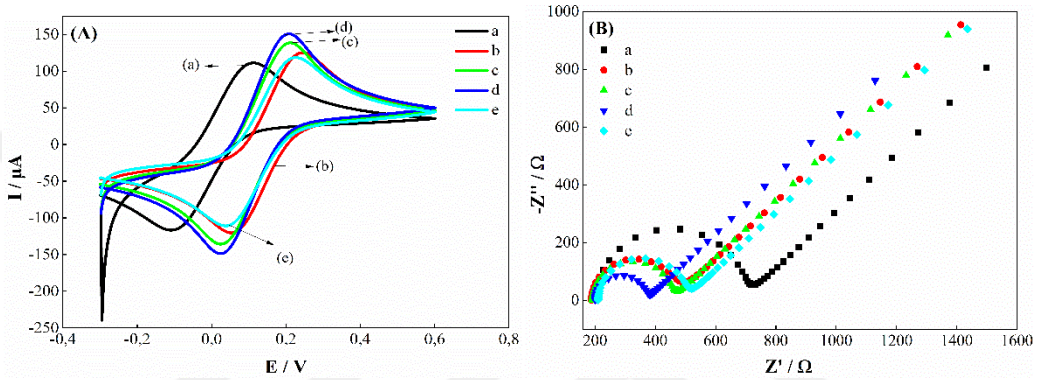
5.4 Deneysel Koşulların Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında hazırlanan MIP-Apt temelli biyosensörün hazırlık aşamalarında kullanılacak en iyi koşulları belirlemek için CV, DPV ve EIS yöntemleri ile farklı modifiye elektrotlar üzerinde optimizasyonlar yapılmıştır.

5.4.1 GO derişim optimizasyonu

GO'in 0,5, 1, 1,5 ve 2 mg mL^{-1} derişimleri ile modifiye edilen SPE'lere ait elektrokimyasal cevaplar, Autolab-PGSTAT 302N markalı ölçüm cihazı kullanılarak

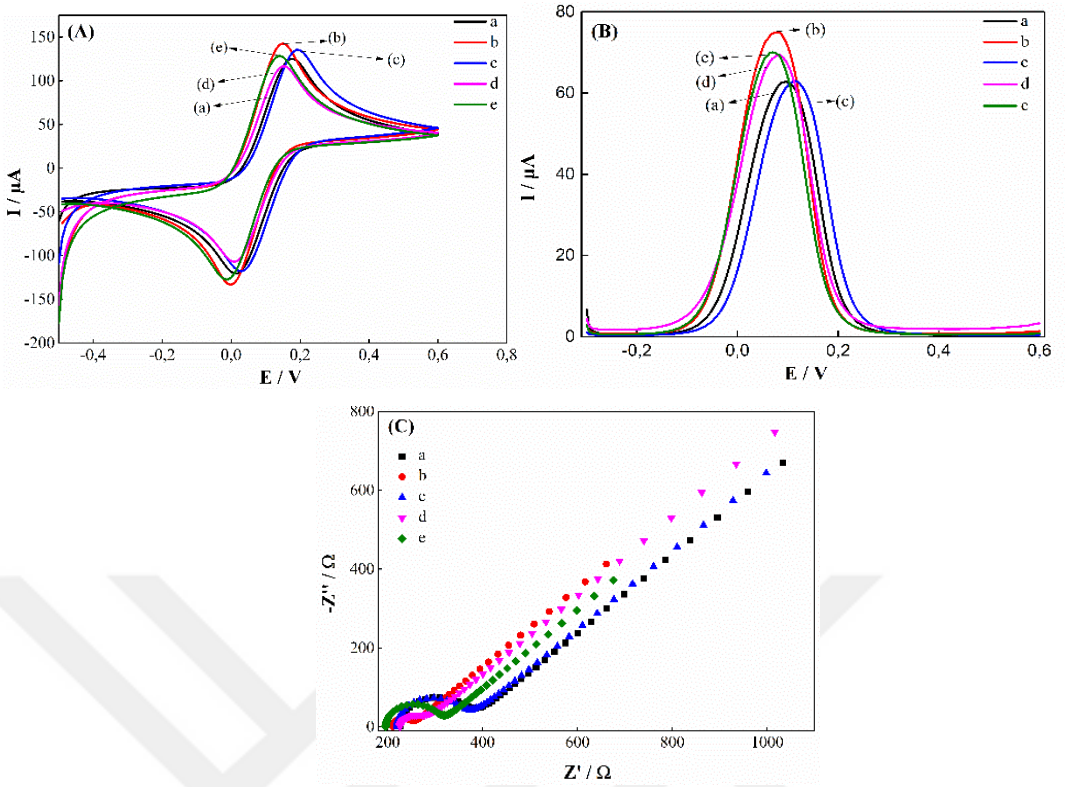
izlenmiştir. **Şekil 5.6.A**'da (-0,3 V)-(+0,6 V) potansiyel aralığında 50 mV s^{-1} tarama hızında, farklı elektrotlara ait voltamogramlar verilmiştir. En yüksek pik akımı 1,5 mg mL^{-1} GO miktarında elde edilmiştir (d eğrisi). **Şekil 5.6.B**'de yer alan Nyquist eğrisi incelendiğinde, 1,5 mg mL^{-1} GO ile modifiye edilmiş elektrotta en düşük direnç değerinin görüldüğü (d eğrisi), bu nedenle CV ile elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Bu nedenle, 1,5 mg mL^{-1} GO derişimi, sensör platformunun modifikasyonu için optimum miktar olarak seçilmiştir.



Şekil 5.6 SPE yüzeyi üzerine (a) 0 mg mL^{-1}, (b) 0,5 mg mL^{-1}, (c) 1 mg mL^{-1}, (d) 1,5 mg mL^{-1}, (e) 2 mg mL^{-1} GO miktarlarında GO ile modifikasyonun (A) CV ve (B) Nyquist eğrileri (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde)

5.4.2 AuNP elektrobiriktirme döngü sayısı optimizasyonu

GO derişiminin belirlenmesinin ardından, CV yöntemi kullanılarak, AuNP'lerin elektrobiriktirilmesi işleminde kullanılacak olan döngü sayısı optimize edilmiştir. GO kaplı SPE yüzey üzerine eşlenik elektrotlarda 10, 15, 20, 25 ve 30 CV döngü sayısında AuNP'ler elektrobiriktirilmiştir. **Şekil 5.7.A** ve **Şekil 5.7.B**'de görüldüğü gibi, eğri b'de yer alan 15 döngü sayısı ile elektrobiriktirilmiş AuNP'ler en yüksek pik akım değerini sunmuştur. **Şekil 5.7.C**'de görülen Nyquist eğrilerindeki cevaplar incelendiğinde en düşük R_{ct} değeri 15 döngü sayısında kaplama sonucu elde edilmiştir. Bu nedenle 15 döngü sayısı, AuNP elektrobiriktirilmesi için optimum döngü sayısı olarak seçilmiştir.

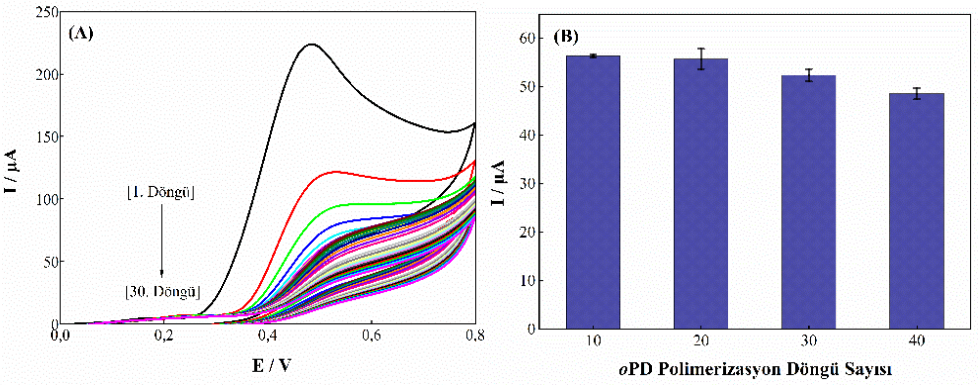


Şekil 5.7 GO/SPE yüzeyi üzerine (a) 10, (b) 15, (c) 20, (d) 25, (e) 30 döngü sayılarında elektrobiriktirilmiş AuNP ile elde edilen (A) CV, (B) DPV ve (C) Nyquist eğrileri (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl çözeltisinde)

5.4.3 *o*PD elektropolimerizasyon döngü sayısı optimizasyonu

MIP oluşumu sırasında kullanılan *o*PD'nin CV yöntemi ile polimerizasyonu **Şekil 5.8.A**.'da verilmiştir. Grafikte en yüksek pik akım değerine sahip eğri 1. döngüye, en düşük pik akım değerine sahip eğri 30. döngüye aittir. Her döngünün ardından polimerleşen *o*PD'nin (po*o*PD) yüzeyin yalıtkanlığını arttırdığı, dolayısıyla pik akımlarının azaldığı **Şekil 5.8.B**'de görülmektedir. *o*PD polimerizasyonu için döngü sayısını belirlemeye yönelik optimizasyon sırasında 10, 20, 30 ve 40 döngü sayılarının, pik akımları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Şekil incelendiğinde döngü sayısı arttıkça pik akım değerlerinin azaldığı görülmektedir. po*o*PD'nin yüksek döngü sayısı ile kaplanmasında elektrot yüzeyinde daha kalın bir yalıtkan tabakanın oluşturarak redoks probu türlerinin elektrot yüzeyine yaklaşmasını tamamen engelleyebileceği belirtilmiştir (Kor ve Zarei, 2016). Ayrıca, Oliveira vd. 2023 tarafından yapılan bir çalışmada da yüksek döngü sayılarında kaplamanın daha az erişilebilir moleküler baskılı bölgelerin

oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (Oliveira vd., 2023). Bu sonuçlardan yola çıkılarak, 30 döngü sayısı optimum olarak belirlenmiştir (J. Wang vd., 2017).

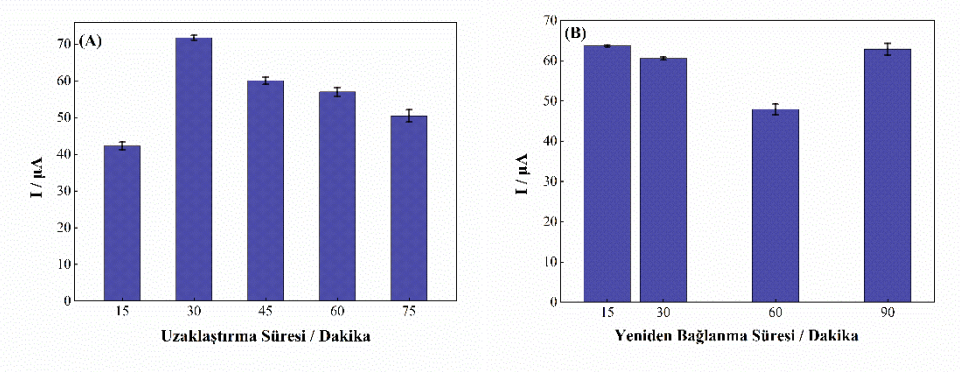


Şekil 5.8 (A) Modifiye elektrot üzerine 50 mVs^{-1} tarama hızında, (0 V)-(+0,8 V) potansiyel aralığında, 30 döngü sayısında yapılan *o*PD elektropolimerzasyonunun CV eğrileri, (B) Farklı elektropolimerizasyon döngü sayılarının DPV'den elde edilen redoks pik akımı değerlerine etkisi (5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisinde)

5.4.4 Uzaklaştırma ve yeniden bağlanma süre optimizasyonu

Diğer bir optimizasyon parametresi, *o*PD polimerizasyonunun ardından yapılacak uzaklaştırma aşamasında, SDS:AA uzaklaştırma çözeltisinin yüzey ile etkileşim süresidir. Uzaklaştırma çözeltisi, MIP oluşumuna kadar eşlenik olarak hazırlanmış elektrotlara 15, 30, 45, 60 ve 75 dakika boyunca maruz bırakılmıştır. **Şekil 5.9.A**'da görüldüğü gibi en yüksek pik akımı 30 dakika yıkama sonucunda elde edilmiştir. Bu da MIP-Apt biyosensöründe en yüksek düzeyde spesifik şablon boşluk oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir.

Sensör üretiminin tamamlanmasından sonraki aşamada 100 pM Lyz'nin yüzeye yeniden bağlanması için gereken optimum süre belirlenmiştir. Bunun için **Şekil 5.9.B**'de görüldüğü gibi 15, 30, 60 ve 90 dakika süren yeniden bağlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir. 60 dakika süren Lyz etkileşimi sonucunda en düşük pik akım değeri görülmüş, bu veri ile Lyz'nin en yüksek verimle yüzeydeki boşluklara yerleşerek Apt[Lyz] kompleksinin oluştuğunu göstermiştir.



Şekil 5.9 (A) SDS:AA ile uzaklaştırma aşamasının süre optimizasyonu. (B) Uzaklaştırma aşamasından sonra 100 pM Lyz'nin yeniden bağlanma süresinin optimizasyonu

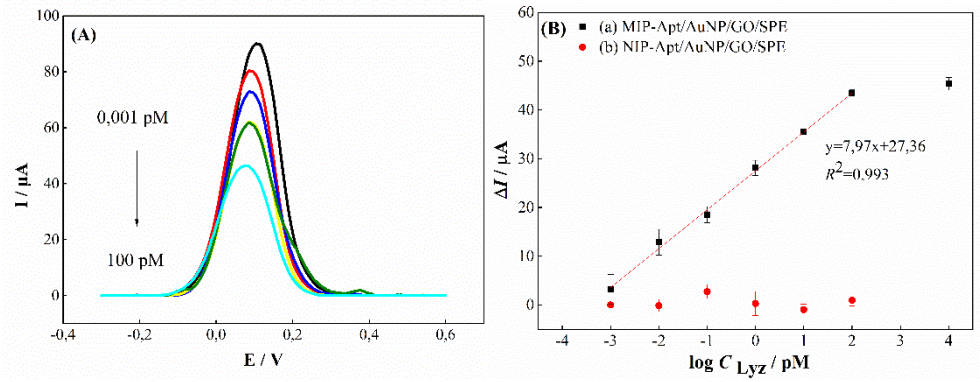
Çizelge 5.1'de, uzaklaştırma aşaması ve yeniden bağlanma aşamasında yapılan süre optimizasyonları sonuçlarından elde edilen pik akımı değerleri karşılaşırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 5.1 Uzaklaştırma ve yeniden bağlanma aşamalarında yapılan süre optimizasyonu ile elde edilen pik akımlar (µA)

Deneysel Aşama	Etkileşim Süresi	Akım Değeri (µA)
SDS:AA ile Uzaklaştırma	15 dakika	42,27
	30 dakika	**71,74**
	45 dakika	60,04
	60 dakika	56,98
	75 dakika	50,44
100 pM Lyz ile Yeniden Bağlanma	15 dakika	63,71
	30 dakika	60,54
	60 dakika	**47,90**
	90 dakika	62,87

5.5 Lizozimin Elektrokimyasal Tayini ve Kalibrasyon Çalışması

Hazırlanan MIP-Apt temelli biyosensörün 0,001-10000 pM derişim aralığında Lyz'i algılama perfomansı incelenmiştir. Yapılan elektrokimyasal ölçümler DPV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (**Şekil 5.10.A**). Hazırlanan biyosensörün Lyz'i tayin ettiği doğrusal aralık 0,001-100 pM'dır. MIP oluşumunun ardından elde edilen pik akım değeri ile uzaklaştırma çözeltisi kullanımından sonra elde edilen pik akım değerinin farkı alınarak ΔI (µA) değeri hesaplanmıştır. Bu hesaplama, sensörde elde edilen spesifik şablon boşluklarının nicel olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Sensör platformunun belirtilen aralıklarda 7 farklı derişim noktasında ölçümleri yapılmış ve **Şekil 5.10.B**'de yer alan, ΔI değerine karşı logaritmik Lyz derişimi değerleri ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Sensörün 0,001-100 pM aralığındaki doğrusallığı, $\Delta I = -7{,}97 \log C_{Lyz} + 27{,}36$ (R^2=0,993) regresyon denklemi ile gösterilmiştir. Regresyon denklemi kullanılarak biyosensörün LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. LOD değeri 0,00367 pM, LOQ değeri 0,012 pM'dır. Lyz tayini yapan literatürler incelendiğinde, elde edilen LOD değerleri Beiki vd. 2023 çalışmasında 4,26 fM, Liang vd., 2019'da 1,58 x 10^{-3} µg/mL, Song ve Chen, 2021'de 0,5 nM ve Zhang vd., 2020'de 1,1 pM olarak belirlenmiştir (Beiki vd., 2023; Liang vd., 2019; Song ve Chen, 2021; Zhang vd., 2020). Bu çalışmada ise geliştirilen MIP-Apt temelli biyosensörün 0,00367 pM LOD değeri, sensörün duyarlılığının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

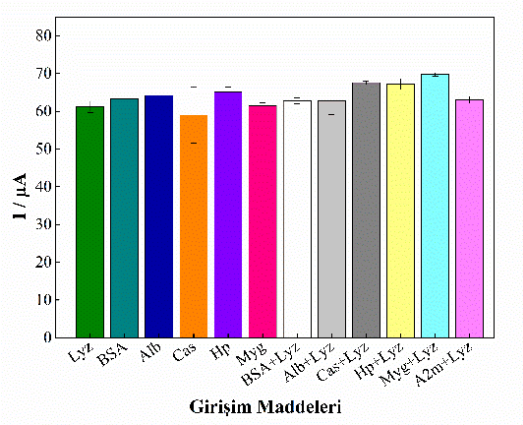


Şekil 5.10 (A) 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içinde Lyz'nin 0,001-100 pM derişim aralığında DPV eğrileri. (B) log C_{Lyz} - pik akım farkı (ΔI) kalibrasyon grafiği (a: MIP sensörü, b:NIP sensörü)

5.6 MIP-Apt Temelli Sensörün Seçicilik Çalışmaları

Lyz tayini yapılması amaçlanan MIP-Apt temelli biyosensör yüzeyinin üretiminin tamamlanmasının ardından, sensörün seçicilik özelliği araştırılmıştır. Seçicilik araştırması boyunca BSA, Alb, Cas, Hp, Myg ve A2m olmak üzere 6 farklı protein yapılı biyomolekülden yararlanılmıştır. Yapılan ölçümler A2m dışındaki tüm biyomoleküller için hem Lyz'li hem de Lyz'siz ortamda gerçekleştirilmiştir. Girişim yapabilecek biyomolekül çözeltilerinin her biri 100 pM derişime sahip olacak şekilde hazırlanmış ve Lyz içermeyen ortamda MIP-Apt temelli biyosensör ile etkileştirilerek DPV cevapları incelenmiştir. Ardından 100 pM derişime sahip girişim maddeleri ile 1 pM derişime sahip Lyz çözeltisinden (1:1) alınarak karışım çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım çözeltileri kullanılarak Lyz varlığında MIP-Apt temelli sensörün DPV'den elde edilen cevapları incelenmiştir (**Şekil 5.11**). Bu sonuçlardan her bir girişime neden olan madde için % girişim değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$[(I_{Girişim+Lyz} - I_{Lyz})/I_{Lyz}]x100$$



Şekil 5.11 MIP-Apt temelli sensörün BSA, Alb, Hp, Cas, Myg ve A2m ile yapılan seçicilik çalışmalarının DPV yöntemi kullanılarak yapılan ölçümlerine ait pik akım değerleri

100 pM derişime sahip girişim maddelerinin % girişim değerlerinin %5,52 BSA, %4,76 Alb, %1,6 Cas, %7,18 Hp ve -%2,37 Myg olduğu görülmektedir. 1 pM Lyz ve 100 pM

girişim çözeltilerinden 1:1 alınarak elde edilmiş karışım çözeltiler için ise % girişim değerleri; %2,51 BSA+Lyz, -%3,68 Alb+Lyz, %11,7 Cas+Lyz, %6,74 Hp+Lyz, %13,15 Myg+Lyz, %3,03 A2m+Lyz olarak belirlenmiştir. Bu değerler **Çizelge 5.2**'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

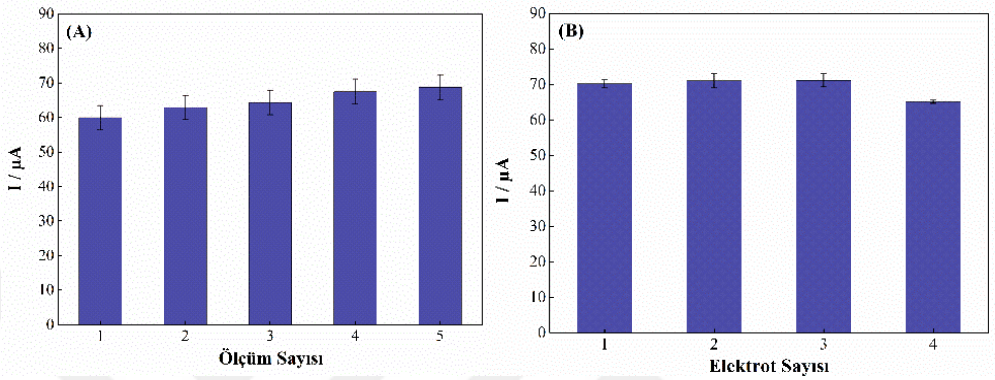
Çizelge 5.2 MIP-Apt temelli biyosensöre ait seçicilik çalışmasından elde edilen % girişim değerleri

Girişim Çözeltisi	**%Girişim**
100 pM BSA	5,52
100 pM Alb	4,76
100 pM Cas	1,6
100 pM Hp	7,18
100 pM Myg	-2,37
1 pM Lyz + 100 pM BSA	2,51
1 pM Lyz + 100 pM Alb	-3,68
1 pM Lyz + 100 pM Cas	11,7
1 pM Lyz + 100 pM Hp	6,74
1 pM Lyz + 100 pM Myg	13,15
1 pM Lyz + 100 pM A2m	3,03

5.7 MIP-Apt Temelli Biyosensörden Elde Edilen Sonuçların Tekrarlanabilirliği ve Biyosensörün Tekrar Üretilebilirliğinin İncelenmesi

Geliştirilen MIP-Apt temelli biyosensörden alınan cevapların tekrarlanabilirliği ve biyosensörün tekrar üretilebilirliği incelenmiştir. Bu parametrelerin belirlenmesinde kullanılan tüm elektrotlar 0,001 pM Lyz ile yeniden bağlanma işlemine tabi tutulmuştur. Ölçümlerin tamamı DPV yöntemi kullanılarak 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi içinde yapılmıştır. Biyosensörden elde edilen sonuçların tekrarlanabilme yeteneğinin incelenmesi için bir elektrot ile art arda 5 ölçüm alınmıştır. Ölçümlerden elde edilen pik akımı değerleri sırasıyla 59,89 µA, 62,83 µA, 64,30 µA, 67,37 µA ve 68,75 µA'dir (**Şekil 5.12.A**). Sonuçların tekrarlanabilirlik sonuçlarının %BSS değeri %5,48 olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrar üretilebilme yeteneğine ait sonuçlar, eşit

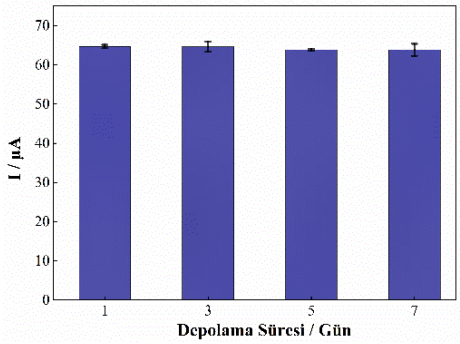
şartlarda hazırlanmış 4 farklı elektrodun ölçümleri alınarak incelenmiştir. Bu elektrotlardan elde edilen pik akım değerleri sırasıyla 70,13 µA, 70,95 µA, 71,06 µA ve 65,04 µA'dir (**Şekil 5.12.A**). Tekrar üretilebilirlik sonuçlarının %BSS değeri %4,14 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar sensörün iyi tekrarlanabilirlik ve iyi tekrar üretilebilirlik özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.12 Hazırlanan MIP-Apt temelli sensörün (A) tekrarlanabilirlik (n=5), (B) tekrar üretilebilirlik (n=4) çalışması

5.8 MIP-Apt Temelli Sensörün Depolama Kararlılığı Çalışması

Geliştirilen MIP-Apt/AuNP/GO/SPE sensörünün depolama kararlılığı incelenmiştir. +4 ºC'de saklanan elektrot ile redoks probunun DPV cevapları sırasıyla 1., 3., 5. ve 7. günlerde ölçülmüştür. MIP-Apt temelli sensörün kararlılığını 7. günde %98,69 oranında koruduğu görülmüştür (**Şekil 5.13)**. 17. Günde yeniden alınan ölçümde ise ilk cevabın %97,27'sini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.13 Hazırlanan MIP-Apt temelli sensörün depolama günlerine karşı ortalama pik akım değerleri (*n*=3)

Beiki ve arkadaşları tarafından 2023 yılında yapılan Apt ve MIP temelli sensör çalışmasında Lyz tayini yapılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada 3 farklı elektrot hazırlanarak depolama kararlılığı 7., 14., ve 21. günlerde analiz edilmiştir. Sensörün gösterdiği depolama kararlılığı 7. gün %97,35, 14. Gün %93,81, 21. Gün %90,52'dir (Beiki vd., 2023).

2019 yılında Liang ve arkadaşları tarafından Lyz tayini için yapılmış MIP temelli sensör tasarımında sensör iki hafta boyunca depo edilmiş ve sürecin sonunda sensörün elektrokimyasal cevabı karşılaştırılmıştır. Sensörün iki haftada kararlılığını %93,0 oranında koruduğu gözlenmiştir (Liang vd., 2019). Literatürde Lyz tayini için geliştirilen sensörler incelendiğinde, bu tez kapsamında hazırlanan MIP-Apt hibrit sensörünün oldukça iyi bir depolama kararlılığına sahip olduğu söylenebilir.

5.9 Gerçek Gıda Numunelerindeki Lizozimin MIP-Apt Temelli Sensör ile Analiz Edilmesi

Lyz tayini için geliştirilen MIP-Apt temelli sensörün gerçek numunelerde potansiyel uygulamalarını değerlendirmek için % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bu aşamada gerçek örnek olarak yerel marketten alınmış Belair marka kırmızı şarap, Jucy marka vişne suyu ve Netto marka karışık meyve suyu kullanılmıştır. Bu örneklere belirli miktarlarda Lyz çözeltileri standart ekleme yöntemi ile eklenmiş ve geliştirilen MIP-Apt temelli sensör kullanılarak ölçümler alınmıştır. Gerçek örneklerden elde edilen % geri kazanım değerlerinin 98,4-105,4 aralığında olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda %5'in altında BSS elde edilmiştir (Zhao vd., 2020). Gerçek numuneler kullanılarak yapılan analiz sonuçları **Çizelge 5.2**'de verilmiştir.

Çizelge 5.3 Geliştirilen MIP-Apt temelli sensörün gerçek numuneler ile hazırlanmış geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Numune	**Eklenen miktar (pM)**	**Bulunan miktar (pM)**	**Geri kazanım (%)**	**%BSS**
Kırmızı şarap	1,0	0,984±1,541	98,4	2,400
Vişne suyu	1,0	1,044±0,512	104,4	0,738
Karışık meyve suyu	1,0	1,054±0,428	105,4	0,618

Zhao ve arkadaşları tarafından 2020 yılında bildirilmiş bir çalışmada Lyz tayini için elektrokimyasal bir aptasensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada üç çeşit kırmızı şarap ile % geri kazanım hesaplaması yapılmıştır. Geri kazanım değerleri 91,3-109,0 aralığındadır. Çalışmada elde edilen %BSS değerleri %5'in altındadır (Zhao vd., 2020).

Rezaei ve arkadaşlarının 2018 yılında Lyz tayini için geliştirdikleri sensörün gerçek numuneler üzerindeki performansları değerlendirilmiştir. Ön işlem uygulanmadan seyreltilen şarap örneğine farklı derişimlerde Lyz eklenmiştir. 1, 3 ve 5 nM Lyz eklenen şarap numunelerinden elde edilen % geri kazanım değerleri 94,0-96,2 aralığındadır. Elde edilen %BSS değerleri ≤%5'tir. Geliştirilen yöntemin gerçek numuneler ile yapılan analizlerde verimli sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Rezaei vd., 2018).

Literatüre ek olarak çalışılan vişne suyu ve karışık meyve suyu numunelerinde Lyz analizi bu tez çalışmasında ilk kez yapılmış ve tatmin edici % geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Literatürde sıkça yer verilmiş kırmızı şarap örneğinde ise yukarıda belirtilen çalışmalarda da görüldüğü gibi Zhao vd. 2020 ile benzer % geri kazanım değeri elde edilmiştir. Bunun yanı sıra Razei vd. 2018'de belirtilen aralıktan daha yüksek geri kazanım değeri elde edilmiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen MIP-Apt sensörünün gerçek numunelere uygulanabilirliği kanıtlamaktadır. Karışık matriks yapılara sahip gerçek numunelerde ön işlem yapılmadan yüksek doğrulukta Lyz tespiti yapılabilmesi geliştirilen sensörün yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip olduğunun da bir göstergesidir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında gıda alerjeni olan Lyz'nin hassas ve seçici tayini için GO ve AuNP'ler ile modifiye edilmiş MIP-Apt temelli elektrokimyasal bir sensör geliştirilmiştir (MIP-Apt/AuNP/GO/SPE). Sensör üretimi sırasında gerçekleştirilen uygulamalar, deneysel olarak optimize edilmiştir. MIP-Apt temelli sensörün LOD, LOQ ve doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. Sensörün seçicilik çalışmaları BSA, Alb, Hp, Myg, A2m, Cas ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluğu, çeşitli meyve suyu ve kırmızı şarap örneği kullanılarak test edilmiştir. Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve depolama kararlığı belirlenmiştir.

SPE yüzeyinin üzerine yüzey alanının arttırılması için GO modifikasyonu ve ardından iletkenliğinin ve elektron transfer hızının arttırılması için AuNP elektrobiriktirmesi gerçekleştirilmiştir. Modifikasyonu yapılan GO'in derişimi ve AuNP'lerin biriktirme döngü sayısı deneysel olarak optimize edilmiştir. Modifiye edilen yüzey üzerine Apt[Lyz] immobilize edilmiştir. İmmobilize olmuş kompleks etrafına, *o*PD monomerinin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiş ve optimum döngü sayısı 30 olarak belirlenmiştir. p*o*PD kaplı yüzey uzaklaştırma çözeltisi (SDS:AA) ile muamele edilmiş ve polimer tabakasına gömülmüş Apt[Lyz] yüzeyden uzaklaştırılarak şablon boşluklar oluşturulmuştur. Şablon boşlukların elde edildiği MIP-Apt biyosensörüne Lyz yeniden bağlanmıştır. Optimum uzaklaştırma ve yeniden bağlanma süreleri sırasıyla 30 ve 60 dakika olarak belirlenmiştir. Biyosensörde Lyz için oluşturulmuş şablon boşlukların etkinliğini doğrulamak için, aynı deneysel aşamaların uygulanması ile elde edilen ancak Lyz içermeyen NIP sensörü hazırlanmıştır. NIP biyosensöründen alınan cevaplar farklı Lyz derişimleri ile analiz edilmiş ve MIP biyosensörünün cevapları ile karşılaştırılmıştır. NIP ve MIP biyosensörlerinin yüzey karşılaştırmalarının yapılabilmesi için AFM yöntemi kullanılarak yüzey karakterizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş yüzeyler ise SEM ve XPS yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Yapılan modifikasyonların elektrokimyasal karakterizasyonları ve deneysel koşulların belirlenmesi için CV, DPV ve EIS yöntemlerinden yararlanılmıştır. Yapılan elektrokimyasal analizlerin tamamında 5 mM $Fe(CN)_6^{3-4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisi kullanılmıştır.

Sensörün doğrusal çalışma aralığı 0,001-100 pM, LOD değeri 3,67 fM, LOQ değeri ise 12 fM olarak belirlenmiştir. Belirtilen sonuçlar literatür ile karşılaştığında, geliştirilen MIP-Apt temelli elektrokimyasal sensörün oldukça hassas tayin yapabildiği sonucuna varılmıştır. BSA, Alb, Cas, Hp, Myg ve A2m kullanılarak sensörün seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Seçicilik çalışmaları süresince bu maddelerin Lyz'li ve Lyz'siz ortamda ayrı ayrı %girişim değerleri incelenmiştir. Sonuç olarak sensöre girişim etkisi yapabilecek maddelerin girişim yapabilme etkisinin düşük olduğu ve Lyz tayinini önemli ölçüde etkilemediği kanısına varılmıştır.

MIP-Apt temelli sensör için tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve depolama kararlılığı parametreleri araştırılarak sensörün kararlılığı ile ilgili bulgular ortaya koyulmuştur. Tekrarlanabilirlik özelliğinin belirlenmesi sırasında hazırlanan bir MIP-Apt/AuNP/GO/SPE biyosensörü ile art arda 5 ölçüm alınmıştır. Sonuçların %BSS değeri 5,48 olarak belirlenmiştir. Tekrar üretilebilirlik sonuçları için eşit şartlarda hazırlanmış 4 farklı elektrot ile yapılan ölçümlerden yararlanılmıştır. Tekrar üretilebilirlik sonuçlarının %BSS değeri 4,14 olarak belirlenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi ile hazırlanan MIP-Apt hibrit biyosensörün iyi tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir özellikte olduğu görülmüştür. Depolama kararlılığının belirlenmesi için sensör hazırlanmış ve +4 °C'de 7 gün boyunca depo edilmiştir. Bu süreçte aralıklarla redoks probu kullanılarak elektrokimyasal ölçümler alınmıştır. 7. günün sonunda yapılan ölçümde elektrot ömrünün %98 oranında korunduğu sonucuna varılmıştır**. Çizelge 6.1**.'de, Lyz tayini için geliştirilen çeşitli sensör platformlarına ait LOD değerleri, doğrusal çalışma aralıkları ve yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 6.1 Farklı elektrokimyasal sensörlerde Lyz algılamanın analitik performanslarının karşılaştırılması

Elektrot	**Yöntem**	**Doğrusal Çalışma Aralığı**	**LOD**	**Gerçek Numune Uygulamaları**	**Kaynak**
MIP-aptamer/MWCNTs-N-CQDs- kitosan /GCE	DPV	1 fM-100 nM	4,26 fM	İnsan kan serumu ve idrarı	(Beiki vd., 2023)
$CuFe_2O_4$-MIP/GCE	CV, EIS, DPV	0,5-0,8 µg/mL	1,58 x 10^{-3}	Biyolojik örnekler	(Liang vd., 2019)
PF/GO/SPE	EIS	5 nM-80 µM	1 nM	Şarap	(Alam vd., 2021)
NTH-aptamer kimera- aptasensör	SWV	0,01-1000 nM	17,9 pM	Kırmızı şarap	(Zhao vd., 2020)
dsDNA-EB-CNPE	DPV	10 pM-1 µM	2 pM	İdrar	(Chen vd., 2019)
GCE/rGO-MWCNT/CS/ CQD	DPV, EIS	20 fM-10 nM, 10 fM-100 nM	3,7 fM, 1,9 fM	Yumurta akı, serum, idrar ve şarap	(Rezaei vd., 2018)
MIP1: Skopoletin-lizozim/SCE MIP2: Skopoletin/lizozim /gluteraldehit/ 4-ATP/SCE	CV, EIS	2,2 – 13,1 mg/mL	MIP 1: 62 nM, MIP 2: 141 nM	Tükürük	(Di Giulio vd., 2021)
DNM-dsDNA/MWCNTs/ GCE	DPV	1-500 nM	0,5 nM	-	(Song & Chen, 2021)
Lya/VS_2 QDs-Bi_2S_3/FTO	PEC	3,5 pM–70 nM	1,1 pM	Serum, yumurta akı	(Zhang vd., 2020)
MIP-Apt/AuNP/GO/SPE	DPV	0,001-100 pM	3,67 fM	Kırmızı şarap, vişne suyu ve karışık meyve suyu	Bu çalışma

Kısaltmalar**:** Adenozin trifosfat (ATP), Bizmut sülfür (Bi_2S_3), Camsı karbon elektrot (GCE), Çoklu duvarlı karbon nanotüpler (MWCNTs), Daunomisin (DNM), Diferansyel puls voltametrisi (DPV), Doymuş kalomel elektrot (SCE), Dönüşümlü voltametri (CV), Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), Etidyum bromür (EB), Flor katkılı kalay oksit (FTO), Fotoelektrokimyasal (PEC), Karbon nanofiber (CNF), Karbon nanotüp baskılı elektrot (CNPE), Kare dalga voltametrisi (SWV), Lizozim hedefli aptamer (Lya), Moleküler baskılı polimer (MIP), Nanotetrahedron (NTH), Azot katkılı karbon kuantum noktaları (N-CQDs), Perde baskılı Elektrot (SPE), Protofibril (PF), Vanadyum disülfür kuantum noktaları (VS_2 QDs)

Bu tez çalışmasında geliştirilen biyosensörle Song ve Chen, 2021, Di Giulio vd., 2021, Alan vd., 2021, Zhao vd., 2021, Chen vd., 2019 çalışmalarına göre çok daha düşük bir LOD elde edilmiştir. Aynı zamanda Beiki vd., 2023 çalışmasında olduğu gibi benzer bir tekniğe göre daha düşük bir LOD değeri elde edilmiştir. Bu da, geliştirilen sensörün literatürde var olan çalışmalardan daha etkili olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bir gıda alerjeni olan Lyz'in gıdalarda tespitine yönelik gerçek numune çalışmalarında ilk kez vişne suyu ve karışık meyve suyu örnekleri kullanılmıştır. Karışık matriks yapılara sahip gerçek numunelerde yüksek doğrulukta Lyz tespiti yapılabilmesi geliştirilen sensörün yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip olduğunun da bir göstergesidir. Sonuç olarak, elde edilen MIP-Apt temelli sensörün hassas, seçici, iyi tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir özellikte olduğu görülmektedir. Lyz tayini için geliştirilen bu sensör, geleneksel yöntemlere göre halk sağlığını tehdit eden alerjenlerin kolay, pratik ve hassas tayininin yapılabilmesi için oldukça avantajlı bir alternatiftir. Apt ve MIP teknolojilerinin avantajlarının kombinasyonu sayesinde elde edilen bu sensör, gelecek dönemler için umut vadetmektedir.

KAYNAKLAR

Abrori, S. A., Septiani, N. L. W., Hakim, F. N., Maulana, A., Suyatman, Nugraha, Anshori, I., ve Yuliarto, B. (2021). Non-Enzymatic Electrochemical Detection for Uric Acid Based on a Glassy Carbon Electrode Modified with MOF-71. IEEE Sensors Journal, 21(1), 170–177. https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.3014298

Alam, I., Lertanantawong, B., Prongmanee, W., Lertvanithphol, T., Horprathum, M., Sutthibutpong, T., ve Asanithi, P. (2021). Investigating lysozyme amyloid fibrillization by electrochemical impedance spectroscopy for application in lysozyme sensor. Journal of Electroanalytical Chemistry, 901(October), 115799. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115799

Ali, G. K., ve Omer, K. M. (2022). Molecular imprinted polymer combined with aptamer (MIP-aptamer) as a hybrid dual recognition element for bio(chemical) sensing applications.Review.Talanta,236,122878. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122878

Aydoğdu, G., Zeybek, D. K., Zeybek, B., ve Pekyardımcı, Ş. (2013). Electrochemical sensing of NADH on NiO nanoparticles-modified carbon paste electrode and fabrication of ethanol dehydrogenase-based biosensor. Journal of Applied Electrochemistry, 43(5), 523–531. https://doi.org/10.1007/s10800-013-0536-3

Aydoğdu Tığ, G., ve Pekyardımcı, Ş. (2020). An electrochemical sandwich-type aptasensor for determination of lipocalin-2 based on graphene oxide/polymer composite and gold nanoparticles. Talanta, 210, 120666. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120666

Bai, X., Huang, X., Zhang, X., Hua, Z., Wang, C., Qin, Q., ve Zhang, Q. (2014). TiO2-graphene nanoparticle based electrochemical sensor for the bimodal-response detection of 4-chlorophenol. RSC Advances, 4(26), 13461–13468. https://doi.org/10.1039/c3ra48065h

Bai, Y., Zhao, R., Feng, F., ve He, X. (2017). Determination of Lysozyme by Thiol-Terminated Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance. Analytical Letters, 50(4), 682–689. https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1190737

Bankole, O. E., Verma, D. K., Chávez González, M. L., Ceferino, J. G., Sandoval-Cortés, J., ve Aguilar, C. N. (2022). Recent trends and technical advancements in biosensors and their emerging applications in food and bioscience. Food Bioscience, 47. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101695

Beiki, T., Najafpour-Darzi, G., Mohammadi, M., Shakeri, M., ve Boukherroub, R. (2023). Fabrication of a novel electrochemical biosensor based on a molecular imprinted polymer-aptamer hybrid receptor for lysozyme determination. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 415(5), 899–911. https://doi.org/10.1007/s00216-022-04487-5

Blaschke, V. M., Tran, T. U., Naneh, M., Zagon, J., ve Winkel, M. (2023). An improved duplex real-time PCR method for the systematic detection of commercially relevant crustaceans in food. Food Control, 146, 109517. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109517

Canovas, R., Daems, E., R. Langey, A., ve Karolien De Wael. (2023). Are aptamer-based biosensing approaches a good choice for female fertility monitoring? A comprehensive review. Biosensors and Bioelectronics 220.

Cavazza, A., Mattarozzi, M., Franzoni, A., ve Careri, M. (2022). A spotlight on analytical prospects in food allergens: From emerging allergens and novel foods to bioplastics and plant-based sustainable food contact materials. Food Chemistry, 388(April), 132951. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132951

Chan, C. M., ve Weng, L. T. (2016). Surface characterization of polymer blends by XPS and ToF-SIMS. Materials, 9(8). https://doi.org/10.3390/ma9080655

Chandra, P., Noh, H. B., Won, M. S., ve Shim, Y. B. (2011). Detection of daunomycin using phosphatidylserine and aptamer co-immobilized on Au nanoparticles deposited conducting polymer. Biosensors and Bioelectronics, 26(11), 4442–4449. https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.060

Chen, Z., Xu, Q., Tang, G., Liu, S., Xu, S., ve Zhang, X. (2019). A facile electrochemical aptasensor for lysozyme detection based on target-induced turn-off of photosensitization. Biosensors and Bioelectronics, 126(September 2018), 412–417. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.074

Dhanapala, P., De Silva, C., Doran, T., ve Suphioglu, C. (2015). Cracking the egg: An insight into egg hypersensitivity. Molecular Immunology, 66(2), 375–383. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.016

Di Giulio, T., Mazzotta, E., ve Malitesta, C. (2021). Molecularly imprinted polyscopoletin for the electrochemical detection of the chronic disease marker lysozyme. Biosensors, 11(1). https://doi.org/10.3390/bios11010003

Doostmohammadi, A., Youssef, K., Akhtarian, S., Tabesh, E., Kraft, G., Brar, S. K., ve Rezai, P. (2022). Molecularly imprinted polymer (MIP) based core-shell microspheres for bacteria isolation. Polymer, 251, 124917. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.124917

El-Sharif, H. F., Turner, N. W., Reddy, S. M., ve Sullivan, M. V. (2022). Application of thymine-based nucleobase-modified acrylamide as a functional co-monomer in electropolymerised thin-film molecularly imprinted polymer (MIP) for selective protein (haemoglobin) binding. Talanta, 240. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123158

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., ve Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner’s Guide to Cyclic Voltammetry.

Journal of Chemical Education, 95(2), 197–206. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361

Elrahi, B., Mehanna, Z., Haidar, S., Serhan, M., ve Hassan, H. F. (2023). Food allergies and allergens in Lebanon: Characterization and perceptions toward labeling. World Allergy Organization Journal, 16(2), 100743. https://doi.org/10.1016/j.waojou.2023.100743

ERKMEN, C., TIĞ, G. A., ve USLU, B. (2022). First label-free impedimetric aptasensor based on Au NPs/TiO2 NPs for the determination of leptin. Sensors and Actuators B: Chemical, 358. https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131420

Esser, M., Rohde, G., ve Rehtanz, C. (2022). Electrochemical Impedance Spectroscopy Setup based on Standard Measurement Equipment. Journal of Power Sources, 544, 231869. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2022.231869

Fan, L., Zhao, G., Shi, H., Liu, M., ve Li, Z. (2013). A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid. BiosensorsandBioelectronics,43(1),12–18. https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.033

Farré, M., ve Barceló, D. (2012). Introduction to the analysis and risk of nanomaterials in environmental and food samples. Içinde Comprehensive Analytical Chemistry (C. 59). https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56328-6.00001-3

Filippova, T. A., Masamrekh, R. A., Shumyantseva, V. V., Latsis, I. A., Farafonova, T. E., Ilina, I. Y., Kanashenko, S. L., Moshkovskii, S. A., ve Kuzikov, A. V. (2023). Electrochemical biosensor for trypsin activity assay based on cleavage of immobilized tyrosine-containing peptide. Talanta, 257, 124341. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124341

Griesche, C., ve Baeumner, A. J. (2020). Biosensors to support sustainable agriculture and food safety. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 128(2020), 115906. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115906

Grumezescu, A. M., ve Andronescu, E. (2017). Nanostructures for oral medicine. Içinde Nanostructures for Oral Medicine. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8/00029-8

Hartati, Y. W., Irkham, I., Zulqaidah, S., Syafira, R. S., Kurnia, I., Noviyanti, A. R., ve Topkaya, S. N. (2022). Recent advances in hydroxyapatite-based electrochemical biosensors: Applications and future perspectives. Sensing and Bio-Sensing Research, 38, 100542. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100542

Hiesgen, R., ve Friedrich, K. A. (2011). Atomic force microscopy. PEM Fuel Cell Diagnostic Tools, 395–421. https://doi.org/10.4011/shikizai.93.321

Hosu, O., Selvolini, G., ve Marrazza, G. (2018). Recent advances of immunosensors for detecting food allergens. Current Opinion in Electrochemistry, 10, 149–156.

https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.05.022

Hua, Z., Yu, T., Liu, D., ve Xianyu, Y. (2021). Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection. Biosensors and Bioelectronics, 179, 113076. https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113076

Huang, Y., Ye, D., Yang, J., Zhu, W., Li, L., ve Ding, Y. (2023). Analytica Chimica Acta Dual recognition elements for selective determination of progesterone based on molecularly imprinted electrochemical aptasensor. 1264. https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341288

Jolly, P., Tamboli, V., Harniman, R. L., Estrela, P., Allender, C. J., ve Bowen, J. L. (2016). Aptamer-MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen. Biosensors and Bioelectronics, 75, 188–195. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.043

Kadara, R. O., Jenkinson, N., ve Banks, C. E. (2009). Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. Sensors and Actuators, B: Chemical, 138(2), 556–562. https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.044

Kaferstein, F., ve Abdussalam, M. (1999). Policy and Practice. 77(4), 347–351.

Kamboj, S., Gupta, N., Bandral, J. D., ve Gandotra, G. (2020). Food safety and hygiene : A review Food safety and hygiene : A review. https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2f.8794

Karakiliç, M., Suna, S., Tamer, C. E., ve Çopur, Ö. U. (2014). Gıda Alerjisi Reaksiyonları. 82, 73–82.

Karimian, N., Vagin, M., Zavar, M. H. A., Chamsaz, M., Turner, A. P. F., ve Tiwari, A. (2013). An ultrasensitive molecularly-imprinted human cardiac troponin sensor. BiosensorsandBioelectronics,50,492–498. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.013

Khedri, M., Ramezani, M., Rafatpanah, H., ve Abnous, K. (2018). Detection of food-born allergens with aptamer-based biosensors. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 103, 126–136. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.001

King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabaras, D., Fox, E. M., ve Hill, J. P. (2017). Trends in Food Science & Technology Food safety for food security : Relationship between global megatrends and developments in food safety. 68, 160–175. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.014

Kor, K., ve Zarei, K. (2016). Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. Talanta, 146, 181–187. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.042

Krishna, D. N. G., ve Philip, J. (2022). Review on surface-characterization applications of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): Recent developments and challenges.

Applied Surface Science Advances, 12, 100332. https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2022.100332

Laschuk, N. O., Easton, E. B., ve Zenkina, O. V. (2021). Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry. RSC Advances, 11(45), 27925–27936. https://doi.org/10.1039/d1ra03785d

Liang, A., Tang, B., Hou, H. P., Sun, L., ve Luo, A. Q. (2019). A novel CuFe2O4 nanospheres molecularly imprinted polymers modified electrochemical sensor for lysozyme determination. Journal of Electroanalytical Chemistry, 853(5), 113465. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113465

Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., ve Mulchandani, A. (2021). Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. Sensors, 21(19). https://doi.org/10.3390/s21196578

Mahmoud, A. M., Alkahtani, S. A., Alyami, B. A., ve El-Wekil, M. M. (2020). Dual-recognition molecularly imprinted aptasensor based on gold nanoparticles decorated carboxylated carbon nanotubes for highly selective and sensitive determination of histamine in different matrices. Analytica Chimica Acta, 1133, 58–65. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.001

Maruyama, N. (2021). Components of plant-derived food allergens: Structure, diagnostics, and immunotherapy. Allergology International, 70(3), 291–302. https://doi.org/10.1016/j.alit.2021.05.001

Mazumder, M., Ahmed, R., Wajahat Ali, A., ve Lee, S. J. (2018). SEM and ESEM techniques used for analysis of asphalt binder and mixture: A state of the art review. Construction and Building Materials, 186, 313–329. https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.07.126

Mazzotta, E., Rella, S., Turco, A., ve Malitesta, C. (2015). XPS in development of chemical sensors. RSC Advances, 5(101), 83164–83186. https://doi.org/10.1039/c5ra14139g

Mohamed, H. M. (2016). Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 82, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.010

Mulalapele, L. T., ve Xi, J. (2021a). Detection and inactivation of allergens in soybeans: A brief review of recent research advances. Grain and Oil Science and Technology, 4(4), 191–200. https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.11.001

Mulalapele, L. T., ve Xi, J. (2021b). Detection and inactivation of allergens in soybeans: A brief review of recent research advances. Grain & Oil Science and Technology, 4(4), 191–200. https://doi.org/10.1016/j.gaost.2021.11.001

Nechache, A., Cassir, M., ve Ringuedé, A. (2014). Solid oxide electrolysis cell analysis

by means of electrochemical impedance spectroscopy: A review. Journal of Power Sources, 258, 164–181. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2014.01.110

Neethirajan, S., Weng, X., Tah, A., Cordero, J. O., ve Ragavan, K. V. (2018). Nano-biosensor platforms for detecting food allergens – New trends. Sensing and Bio-Sensing Research, 18, 13–30. https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2018.02.005

Negahdary, M., Akira Ameku, W., Gomes Santos, B., dos Santos Lima, I., Gomes de Oliveira, T., Carvalho França, M., ve Angnes, L. (2023). Recent electrochemical sensors and biosensors for toxic agents based on screen-printed electrodes equipped with nanomaterials. Microchemical Journal, 185, 108281. https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108281

Okugawa, I. (2014). Enchanced Properties of Carbon Based Coatings. Içinde University of Tsukuba. http://www.ghbook.ir/index.php?name=های رسانه و گفرهن-ویـن&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chkhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component

Oliveira, A. E. F., Pereira, A. C., ve Ferreira, L. F. (2023). Disposable electropolymerized molecularly imprinted electrochemical sensor for determination of breast cancer biomarker CA 15-3 in human serum samples. Talanta, 252, 123819. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123819

Parnianchi, F., Kashanian, S., Nazari, M., Santoro, C., Bollella, P., ve Varmira, K. (2021). Highly selective and sensitive molecularly imprinting electrochemical sensing platform for bilirubin detection in saliva. Microchemical Journal, 168, 106367. https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106367

Pi, X., Wan, Y., Yang, Y., Li, R., Wu, X., Xie, M., Li, X., ve Fu, G. (2019). Research progress in peanut allergens and their allergenicity reduction. Trends in Food Science & Technology, 93, 212–220.

Rad, A. O., ve Azadbakht, A. (2019). An aptamer embedded in a molecularly imprinted polymer for impedimetric determination of tetracycline. Microchimica Acta, 186(2). https://doi.org/10.1007/s00604-018-3123-9

Rapini, R., ve Marrazza, G. (2017). Electrochemical aptasensors for contaminants detection in food and environment: Recent advances. Içinde Bioelectrochemistry (C. 118, ss. 47–61). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.004

Rezaei, B., Jamei, H. R., ve Ensafi, A. A. (2018). An ultrasensitive and selective electrochemical aptasensor based on rGO-MWCNTs/Chitosan/carbon quantum dot for the detection of lysozyme. Biosensors and Bioelectronics, 115, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.05.012

Ross, G. M. S., Bremer, M. G. E. G., ve Nielen, M. W. F. (2018). Consumer-friendly food allergen detection: moving towards smartphone-based immunoassays. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410(22), 5353–5371.

https://doi.org/10.1007/s00216-018-0989-7

Roushani, M., Farokhi, S., ve Rahmati, Z. (2022). Development of a dual-recognition strategy for the aflatoxin B1 detection based on a hybrid of aptamer-MIP using a Cu2O NCs/GCE. Microchemical Journal, 178, 107328. https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107328

Roushani, M., Ghanbarzadeh, M., ve Shahdost-Fard, F. (2021). Fabrication of an electrochemical biodevice for ractopamine detection/molecular impri under a strategy of a double recognition of the aptamernting polymer. Bioelectrochemistry, 138, 107722. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107722

Roushani, M., Rahmati, Z., Hoseini, S. J., ve Hashemi Fath, R. (2019). Impedimetric ultrasensitive detection of chloramphenicol based on aptamer MIP using a glassy carbon electrode modified by 3-ampy-RGO and silver nanoparticle. Colloids and SurfacesB:Biointerfaces,183,110451.https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110451

Sadeghi, E., Gholami, M. M., Hamzeh, M., Alavi, S. M. M., ve Saif, M. (2023). A systematic overview of power electronics interfaced electrochemical impedance spectroscopy for energy storage systems. Journal of Energy Storage, 62, 106850. https://doi.org/10.1016/j.est.2023.106850

Sanchez-Martinez, M. L., ve Aguilar-Caballos, M. P., Gomez-Hens, A. (2004). Homogeneous stopped-flow fluorimmunoassay for gliadin determination in food samples. Analytica Chimica Acta, 523, 35–41.

Sarabaegi, M., ve Roushani, M. (2021). Rapid and sensitive determination of Pseudomonas aeruginosa by using a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles and aptamer-imprinted polydopamine. Microchemical Journal, 168, 106388. https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106388

Sathe, S. K., Liu, C., ve Zaffran, V. D. (2016). Food Allergy. Annual Review of Food Science and Technology, 7, 191–220. https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033308

Sefah, K., Phillips, J. A., Xiong, X., Meng, L., Van Simaeys, D., Chen, H., Martin, J., ve Tan, W. (2009). Nucleic acid aptamers for biosensors and bio-analytical applications. Analyst, 134(9), 1765–1775. https://doi.org/10.1039/b905609m

Sena-Torralba, A., Pallás-Tamarit, Y., Morais, S., ve Maquieira, Á. (2020). Recent advances and challenges in food-borne allergen detection. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 132. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116050

Sharma, S., Mehtab, S., ve Zaidi, M. G. (2020). Voltammetry : An Electrochemical Analytical Method. Voltammetry, 127–140.

Sheng, K., Jiang, H., Fang, Y., Wang, L., ve Jiang, D. (2022). Emerging electrochemical

biosensing approaches for detection of allergen in food samples: A review. Trends in Food Science and Technology, 121, 93–104. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.033

Shin, J. H., Reddy, Y. V. M., Park, T. J., ve Park, J. P. (2022). Recent advances in analytical strategies and microsystems for food allergen detection. Food Chemistry, 371(April 2021). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131120

Sicherer, S. H., ve Sampson, H. A. (2010). Food allergy. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125, S116–S125. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028

Singh, P. (2022). Electrochemical biosensors: Biomonitoring of food adulterants, allergens, and pathogens.Electrochemical Biosensors. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90632-6.00001-7

Song, K., ve Chen, W. (2021). An electrochemical sensor for high sensitive determination of lysozyme based on the aptamer competition approach. Open Chemistry, 19(1), 299–306. https://doi.org/10.1515/chem-2021-0026

Su, K. W., Yan, D. C., Ou, L. S., Lin, L. L., Wu, C. Y., Huang, S. J., Yao, T. C., Yeh, K. W., ve Huang, J. L. (2023). Rising prevalence of food allergies in Taiwan: An epidemiological study. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, https://doi.org/10.1016/j.jmii.2023.04.008

Subramanian, K. S., Janavi, G. J., Marimuthu, S., Kannan, M., Raja, K., Haripriya, S., ve Jeya Sundara Sharmila, D. (2018). Scanning Electron Microscopy: Principle, Components and Applications. Textbook on Fundamentals And Applications of Nanotechnology, 91–90.

Tagami, K., Nara, J., Ohno, T., ve Usami, M. (2022). First-principles study of absolute XPS binding energy with PAW planewave pseudopotential method: Application to tungsten disulfides. Japanese Journal of Applied Physics, 61(2). https://doi.org/10.35848/1347-4065/ac4464

Tamboli, V. K., Bhalla, N., Jolly, P., Bowen, C. R., Taylor, J. T., Bowen, J. L., Allender, C. J., ve Estrela, P. (2016). Hybrid synthetic receptors on MOSFET devices for detection of prostate specific antigen in human plasma. Analytical Chemistry, 88(23), 11486–11490. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02619

Tığ, G. A., ve Pekyardımcı, Ş. (2020). Talanta An electrochemical sandwich-type aptasensor for determination of lipocalin- 2 based on graphene oxide / polymer composite and gold nanoparticles. Talanta, 210, 120666. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120666

Vasilescu, A., Polonschii, C., Titoiu, A. M., Mishra, R., Peteu, S., ve Marty, J. L. (2020). Bioassays and biosensors for food analysis. Içinde Commercial Biosensors and Their Applications: Clinical, Food, and Beyond. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818592-6.00009-8

Vasilescu, A., Wang, Q., Li, M., Boukherroub, R., ve Szunerits, S. (2016). Aptamer-based electrochemical sensing of lysozyme. Chemosensors, 4(2), 1–20. https://doi.org/10.3390/chemosensors4020010

Wan, J., ve Han, G. (2023). A Facile Sensor for Detection of Lysozyme in Egg White Based on AuNPs and Ferrocene Dicarboxylic Acid. Chemosensors, 11(4). https://doi.org/10.3390/chemosensors11040209

Wang, J., Wang, M., Guan, J., Wang, C., ve Wang, G. (2017). Construction of a non-enzymatic sensor based on the poly(o-phenylenediamine)/Ag-NPs composites for detecting glucose in blood. Materials Science and Engineering C, 71, 844–851. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.080

Wang, P., Xie, L., Joseph, E. A., Li, J., Su, X., ve Zhou, H. (2019). Metal − Organic Frameworks for Food Safety. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00257

Weaver, S., Mohammadi, M. H., ve Nakatsuka, N. (2023). Biosensors and Bioelectronics Aptamer-functionalized capacitive biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 224, 115014. https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.115014

Wei, X., Xu, X., Qi, W., Wu, Y., ve Wang, L. (2017). Molecularly imprinted polymer/graphene oxide modified glassy carbon electrode for selective detection of sulfanilamide. Progress in Natural Science: Materials International, 27(3), 374–379. https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2017.05.001

Xian, L., Zhang, X., ve Li, X. (2022). Voltammetric determination of electronic structure of quantum dots. Current Opinion in Electrochemistry, 34, 101022. https://doi.org/10.1016/j.coelec.2022.101022

Ye, Y., Guo, H., ve Sun, X. (2019). Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. Biosensors and Bioelectronics, 126, 389–404. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.039

You, M., Yang, S., An, Y., Zhang, F., ve He, P. (2020). A novel electrochemical biosensor with molecularly imprinted polymers and aptamer-based sandwich assay for determinin.amyloid-βoligomer.862. ttps://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114017

Zhang, J., Shang, M., Gao, Y., Yan, J., ve Song, W. (2020). High-performance VS2 QDs-based type II heterostructured photoanode for ultrasensitive aptasensing of lysozyme. Sensors and Actuators, B: Chemical, 304, 127411. https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127411

Zhao, L., Huang, Y., Qi, X., Yan, X., Wang, S., ve Liang, X. (2020). Nanotetrahedron-assisted electrochemical aptasensor with cooperatively-folding aptamer chimera for sensitive and selective detection of lysozyme in red wines. Analytica Chimica Acta, 1095, 172–178. https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.017

Zhou, J., Qi, Q., Wang, C., Qian, Y., Liu, G., Wang, Y., ve Fu, L. (2019). Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. Biosensors and Bioelectronics, 142, 111449. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111449

Zhu, L., Hu, Z., Shen, Y., ve Wang, Y. (2023). Preparation and application of lysozyme molecularly imprinted surface plasmon resonance biosensors. Microchemical Journal, 190, 108665. https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108665

Zouaoui, F., Bourouina-Bacha, S., Bourouina, M., Alcacer, A., Bausells, J., Martin, M., Bessueille, F., Minot, S., Jaffrezic-Renault, N., Zine, N., ve Errachid, A. (2021). Theoretical study and analytical performance of a lysozyme impedimetric microsensor based on a molecularly imprinted chitosan film. Sensors and Actuators, B: Chemical, 339, 129903. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129903