

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BİYOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN DİRENÇ SENSÖRLERİ

Yunus ALTUNGEYİK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sedat AĞAN

2014
KIRIKKALE

Fizik Anabilim Dalında Yunus ALTUNGEYİK tarafından hazırlanan BİYOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN DİRENÇ SENSÖRLERİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Saffet NEZİR
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Sedat AĞAN
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Erdem YAŞAR _____
Üye (Danışman) : Prof. Dr. Sedat AĞAN _____
Üye : Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN _____

.././2014

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

BİYOLOJİK UYGULAMALAR İÇİN DİRENÇ SENSÖRLERİ

ALTUNGEYİK, Yunus

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Sedat AĞAN

2014, sayfa 63

Bu tez çalışmasında biyolojik uygulamalar için direnç sensörleri üzerinde çalışılmıştır. Sensörler Termal kaplama cihazı ve PECVD yöntemi ile üretilmiştir. Çalışma prensibi, biyolojik numunenin sensör üzerine eklenmesi ile oluşan direnç değişimini tesbit etmektir. Dikey kapasitör sensörler tasarlanmış olup, metal kaplama için Altın ve Krom malzemeler kullanılmıştır. Metal plakaların arasına ise dielektrik malzeme olarak SiO_2 ve Al_2O_3 malzemeleri kullanılmıştır. Nano boşluklu kapasitif nano biyosensörlerin fabrikasyonu yapılmış olup düşük frekans değerlerinde ve yüksek frekans değerlerinde sensörler test edilmiştir. Üretilen nano-biyosensörler tekrarlanabilirlik, kararlılık ve güvenilirlik testlerinden geçmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, dönüştürücüler, termal kaplama cihazı, ALD ve PECVD yöntemi, fotolitografi, Islak aşındırma.

ABSTRACT

RESISTIVE SENSORS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS

ALTUNGEYİK, Yunus

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Physics, Ph. G. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sedat AĞAN

2014, pages 63

This thesis is about on resistance sensors for biological applications. Sensors have been produced by PECVD method via thermal coating device. Working principle is to locate resistance change on biologic sample if it is added to sensors. Vertical capacitive sensors have been designed, Gold and chrome materials have been used for metal plating. SiO_2 and Al_2O_3 have been used for dielectric material between the metal plate. The fabrication of biosensors are made and sensors have been tested at low and high frequency. Nano-biosensors which were produced has been passed the test of repeatability, stability and reliability.

Key Words: Biosensor, Converting, the Thermal Coating Device, ALD and PECVD Method, Photolithography, Wet Etching.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca başından sonuna kadar emeği geçen ve beni bu konuda yönlendiren saygı değer hocam ve danıőmanım, Sayın Prof. Dr. Sedat AĞAN' a tüm katkılarından ve hiç eksiltmediği desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Deney imkânlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine sunan Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezine ve tez çalıőmam boyunca yanımda olan bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım Uzman İsmail BİLİCAN, Uzman Ümit ERDEM ve Arő. Gör. Mustafa Tahsin GÜLER' e teőekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması esnasında maddi manevi hiçbir yardımı esirgemeyen aileme teőekkürü bir borbilirim.

Ayrıca, hem öncesinde hemde yoğun tez sürecinde ve devamında sürekliliğini koruyacak olan, birlikte kurduğumuz FİRE TEAM üyelerine teőekkürlerimi sunarım.

Bu alıőma TÜBİTAK tarafından desteklenen “ Ultra Hassas Biyosensör Uygulamaları İçin Nanoaralıklı Kapasitif Sönsörlerin Dizaynı, Fabrikasyonu Ve Karakteristiği” başlıklı 112M944 no' lu proje kapsamında gerçekleőtirildiđinden TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörlerin Genel Yapısı	2
1.2. Biyosensörlerin Çalışma Prensibi	3
1.3. Biyoreseptör Molekülleri	4
1.3.1. Enzimler	5
1.3.2. Antikorlar	6
1.3.3. Reseptör Proteinler	7
1.3.4. Aptamerler	7
1.3.5. Mikroorganizmalar	8
1.3.6. Diğer Adaylar	8
1.4. Çalışma Prensiblerine Göre Sensörler	10
1.4.1. Biyoaffinite Esaslı Biyosensörler	10
1.4.2. Biyokatalitik Esaslı Biyosensörler	11
1.4.3. Biyokatalitik Esaslı Biyosensörler	11
1.4.4. Transmembran Esaslı Biyosensörler	11
1.5. İletim Ve Ölçüm Sistemine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması	11
1.6. Çeviriciler	12
1.6.1. Piezoelektrik Dönüştürücüler	12
1.6.2. İletkensele Dönüştürücüler	12
1.6.3. Elektrik Kapasitans Dönüştürücüleri	14
1.6.4. Termoelektrik Dönüştürücüler	14

1.6.5. Geleneksel Dönüştürücüler	14
1.6.6. Fet Tipi Dönüştürücüler	15
1.7. Biyosensörlerin Kullanım Durumuna Göre Sınıflandırılması	15
1.7.1. Tek Kullanımlık Biyosensörler	15
1.7.2. Ara Kullanımlık Biyosensörler.....	15
1.7.3. Sürekli Kullanımlık Sensörler	16
1.8. İdeal Bir Biyosensörde Aranılan Nitelikler.....	16
1.9. Uygulama Alanları.....	18
1.9.1. Biyosensörlerin Tıp Alanında Kullanımı	20
1.9.2. Çevre Koruma Ve Kontrolünde Biyosensörler	21
1.9.3. Askeri Alanda Biyosensörle	21
1.9.4. Gıda Sektöründe Biyosensörler	21
1.9.5. Biyosensörlerin Biyolojik Savaş Ajanlarının (BSA) Tespitinde Kullanılması	23
1.10. BSA'ların Tesbitinde Zorluklar.....	23
1.11. Biyosensörün Tasarlama Aşamaları.....	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
2.1. Uygulama Alanları.....	26
2.2. Plazma İle Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar Depolama Sistemi (PECVD) ..	27
2.3. Fotolitografi (Şekil Aktarımı).....	29
2.4. Nanoaralık Temelli Kapasitif Biyosensörler.....	31
2.5. Sensör Tasarımı	33
2.6. Reseptör Yakalanması	35
2.7. Biyosensör Uygulamaları İçin Empedans Spektroskopisi.....	35
2.8. Biyosensörlerle İlgili Yapılan Çalışmalar ” Graphene Based Biosensors For Detection Of Bacteria And Their Metabolic Activities “	36
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	42
3.1. Sensör Tasarımı	42
3.2. Altlık Ve Yüzey Hazırlığı.....	43
3.3. Alt Elektrodun Büyütülmesi	44
3.4. Dielektrik Katmanların Büyütülmesi.....	45
3.5. Üst Elektrodun Desenlendirilmesi	46
3.6. Üst Elektrodun Kaplanması Ve Kaldırma İşlemi (Lift-Off).....	47

3.7. Nano Aralık Oluşturma.....	48
3.8. Ölçüm Sistemi.....	49
4. SONUÇ VE TARTIşMA.....	56
KAYNAKLAR	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Sayfa

1.1. Biyosensörün Yapısı	3
1.2. Biyosensörü Oluşturan Yapılar.....	3
1.3. Biyosensörlerde Biyoreseptör Ve Dönüştürücü Olarak Kullanılan Yapılar...	4
1.4. Biyoreseptör Teknolojisinde Kullanılan Biyoaktif Materyal Hiyerarşisinde Enzimlerin Yeri.....	6
1.5. Antikorun Görünümü.....	7
1.6. Biyosensörün Yüzeyine Bakteri Eklenmesinden Önce Ve Sonra İletkenlikteki Değişim.....	13
1.7. Güvenilir Bir Biyosensörün Tekrarlanabilirlik Ve Kararlılık Ölçümünü.....	17
1.8. Cevap Zamanı Ve Tolerans Bandı.....	17
1.9. Biyosensör Üretiminin Şematik Gösterimi.....	19
2.1. Isısal Buhar Biriktirme Sistemi (UNAM-Vaksis PVD Vapor – 3S)	26
2.2. Plazma İle Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar Depolama (PECVD) Sistemi.....	28
2.3. PECVD Sistemi (UNAM-CVD)	29
2.4. Fotolitografi İle Hazırlanan Örneğin Transferi.....	30
2.5. İzotropik Ve Anizotropik Aşındırma.....	31
2.6. Yatay Nano Aralıklı Aygıtlar A Ve B Literatürdeki Bazı Yatay Aygıtlar...	32
2.7. Dikey Nano Aralıklı Aygıtlar.....	32
2.8. Tasarlanan Sensörün Görünümü Ve Çalışma Prensibi.....	34
2.9. Biyosensörlerin Devre Elemanları İle Gösterimi.....	34
2.10. Voltaj-Akım Sinyali Grafiği.....	36
2.11. E.Coli Ve Glukoz Algılanması İçin Grafin Temelli NANOelektronik Biyosensör	36

2.12. Grafın Film Tabakasının Raman Sonucu Ve Grafın Filmin Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Resmi.....	38
2.13. Ethanol, Anti E.Coli Ve Tween 20' Nin Sisteme Eklenmesi İle Değişen Ids/Vg Grafiği.....	38
2.14. Farklı pH değerleri ile çözeltilerindeki grafın-FET' in I/V grafiği.....	39
2.15. E. coli' nin grafın üzerine eklenmesi ile gerçek zamanlı ölçüm.....	39
2.16. Farklı konsantrasyonlardaki E.coli ve P.aeruginosa karşılaştırılması.....	40
2.17. Farklı pH değerlerinde elde edilen eş zamanlı verilerin akım-zaman grafiği.....	41
3.1. Tasarlanan Sensörün Temsili Görünümü.....	43
3.2. Lift-Off Yönteminin Uygulandığı Tezgah.....	44
3.3. Isısal Buharlaştırma Yöntemi İle Alt Elektrodun Büyütülmesi Aşaması...	45
3.4. Dielektrik Katmanların Büyütülmesi Aşaması.....	46
3.5. Isısal Buharlaştırma Yöntemi İle Üst Elektrodun Kaplanma Şekli.....	47
3.6. Kaldırma İşlemi Ve Sonrasında Sensörün Şekli.....	48
3.7. Islak Aşındırma İşlemi Ve Sonrasında Sensörün Şekli.....	48
3.8. UNAM Temiz Odada Bulunan Parametre Analizörü Ve Prob İstasyonu...	49
3.9. Vakum Haznesindeki Örneğin Görünümü.....	49
3.10. LCR Metre Cihazı, Yaptığımız Prob İstasyonu.....	50
3.11. Sensörün SPA Ve LCR İle Alınan Ölçümlerin Karşılaştırılması.....	51
3.12. DI Su Kullanarak SPA Ve LCR' Den Alınan Ölçümlerin Karşılaştırılması.....	51
3.13. Parametre Analizörü Kullanarak Farklı Günlerde Alınan Ölçüm Sonuçları.....	52
3.14. Biyosensörün Uzun Zaman Aralığında Ölçüm Testi.....	52
3.15. Yüksek Voltaj Ve Düşük Voltaj Kullanımında Gürültü Düzeyi.....	53
3.16. Farklı Solusyonların İletkenliğe Etkisini Gösteren Direnç/Frekans Grafiği.....	54
3.17. Düşük Frekans Aralığında İletkenliğin Frekansa Göre Değişimi.....	55
3.18. Yüksek Frekans Aralığında İletkenliğin Frekansa Göre Değişim.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

1.1. Biyobileşen Ve Sinyal İletici Sistemlerde Kullanılan En Önemli Yapılar	8
1.2. Biyosensörlerin Literatürde Geçen Günümüzdeki Durumları	9
1.3. Biyosensörlerde Kullanılan Kanakların Avantaj Ve Dezavantajları	10
1.4. Bazı Gıdalar Ve İçerisindeki Bilişenler İçin Biyosensör Uygulamaları.....	22
1.5. Bazı Bakteri Ve Virüslerin Yayılım Yolları, Kuluçka Süreleri Ve Semptomları.....	24
1.6. Bazı Metallere Ait Referans Faktörleri.....	27

SİMGELER DİZİNİ

I	Akım
Φ	Faz farkı
ϵ_r	Dielektrik sabiti
ϵ_0	Boşluğun dielektrik sabiti
C_p	Paralel Kapasitans
C_s	Seri Kapasitans
R	Direnç
E	Elektriksel Alan
Å	Angstrom

KISALTMALAR DİZİNİ

HF	Hidroflorik Asit
ALD	Atomik Katman Biriktirme
PVD	Termal Buhar Biriktirme
PECVD	Plazma ile Güçlendirilmiş Buhar Biriktirme
DI	Saf su (Damıtılmış Su)
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
BSA	Biyolojik savaş ajanları
FET	Alan etkili transistör
RF	Radyo Frekans
ml	Mililitre
UV	Ultraviyole
Nm	Nanometre

Mm

Milimetre

μm

Mikrometre

kHz

Kilohertz

MHz

Megahertz

UNAM

Ulusal Nanoteknoloji Araştırma
Merkezi

1.GİRİŞ

Biyosensörlerin tarihi 50' li yıllarda L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat esnasında hastanın kanında bulunan O₂ miktarının ölçülmesiyle başlar. Bu önemli gelişmenin ardından 1962 yılında Clark ve Lyons Glukozoksidaz (GOD) enzimini O₂ elektrodu ile birleştirerek kan içerisinde bulunan glukoz düzeyini belirlediler. Böylece yeni bir analitik sistem açığa çıktı. Bu sistem bir biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) ve fiziksel sistemin tayin duyarlılığını birleştirmiş olup geniş kapsamlı bir uygulama olanağı bulmuştur.

Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözülmüş oksijen elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O₂ harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O₂ elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözülmüş O₂ ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O₂ olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensör'adı verilir [1]. Bu materyallerin geliştirilmesi 1960'lı yıllarda başlamıştır. Tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasaya sürülen Yellow Spirngs Instrument (YSI)'dir. Yaklaşık elli yıllık bir süreçte hızlı bir gelişim gösteren üretim çalışmaları günümüzde yeni bir bilim dalı haline gelmiş ve artık "Biyomalzeme Bilimi" olarak adlandırılmaktadır [2]. Biyomalzemeler; tıp, biyoloji, kimya, doku mühendisliği, bilgisayar ve malzeme bilimlerinin de ortak bir paydası olarak değerlendirilmektedir. Biyomalzemeler biliminin, son yıllarda adından sıkça söz ettiren ve pek çok farklı alanlarda yaygın kullanımı bulunan bir alt dalı da "Biyosensörler"dir [1,3]. Bütün canlı varlıklar yaşamlarını sürdürebilmeleri için kendilerine uygun ortam ve şartlarda bulunmak isterler. Dolayısı ile yaşamlarını devam ettirebilmeleri için bulunduğu ortamdaki değişimleri hızlı bir şekilde algılayıp adapte olmaya çalışırlar. Canlılar bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleriyle bir araya getirilmesi ile biyosensörler oluşturulmuştur. Biyosensörler teknolojinin gelişmesi ile çok hızlı bir gelişim göstermiştir ve International Union of Pure and

Applied Chemistry tarafından oluşturulan Biyosensörleri Sınıflandırma ve Adlandırma Komisyonu 1996 yılında hazırlayıp yayınladığı biyosensör tanımı biyomikrochiplerin gelişimi nanoteknolojinin gelişmesi ile geçerliliğini yitirmiştir. Biyosensörler; sıklıkla biyolojik analizler için kullanılan özel sensördür ve "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal veya elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmaktadır [4].

Günümüz teknolojisi ile üretilmiş cihazlarda insanların beklentileri sürekli daha küçük, daha ucuz materyalle üretim, uzun kullanım ömrü ve düzgün çalışması olmuştur. Sensörler; Termal, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler ve biyosensörler olarak sınıflara ayrılırlar. Teknolojinin hızlı bir biçimde ilerlemesi sensörlerin algılama hassasiyetini arttırmaktadır ve biyolojik moleküllerin yüksek duyarlılığa karşılık verme potansiyelinin keşfedilmesi, biyosensör teknolojilerinin hızla gelişmesine olanak sağlamaktadır. Teknolojinin hızlı bir şekilde gelişmesi ve değişim göstermesi sayesinde biyosensörlerin kavram ve tanımlarında önemli adımlar atılmaktadır. Biyosensörler; tıp, eczacılık, gıda güvenliği, çevre kirliliği ve askeri uygulamalar gibi birçok farklı alanda kullanılmak üzere farklı özelliklere sahip biyosensörler geliştirilmiştir. Biyosensörler genel olarak, biyolojik yapıdaki analitleri algılayan sensörler veya reseptör birimi biyomoleküler yapıda olan sensörlerdir. Klasik tahlil analizinin uzun sürmesine karşın biyosensörler daha kısa sürede analiz yapabilmektedirler. Nano-biyosensörler; uygulanması kolay, ekonomik, hızlı analiz yapabilme ve boyutlarının küçük olması nedeniyle taşınması kolaydır.

1.1. Biyosensörlerin Genel Yapısı

Biyosensörler reseptör ve dönüştürücü olmak üzere iki temel yapıdan oluşur. Eğer bir reseptör (biyolojik) biyomoleküler bir yapıya sahip ise bu yapıya biyoreseptör adı verilir. Biyoreseptörler analiti fark edebilen biyomoleküllerdir. Reseptöre bağlanan molekül ligand diye adlandırılır. Biyolojik veya biyolojik olmayan örneklerde analizi yapılacak olan madde veya materyale Analit denir. Biyosensörün dönüştürücü kısmı ise biyoreseptörün analiti algıladığı esnada ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyali elektrik sinyallerine dönüştüren yapıdır. Şekil 1’ de bir

biyosensörün temel yapısı görülmektedir. Reseptör hedef analite özgü olduğu için anahtar-kilit uyumu gerçekleşir. Bir biyosensörün genel yapısı temsili olarak Şekil 1.1' de gösterilmiştir.



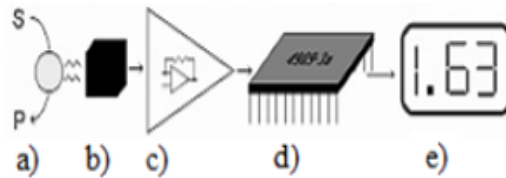
Şekil 1.1. Biyosensörün yapısı

Biyosensörlerin yüksek spesifiklik, çözeltiler içerisinde geniş bir yoğunlaşma aralığında ölçüm yapabilir. Fakat biyosensörler organik bir yapı kısımlarına sahip oldukları için pH, iyon şiddeti, sıcaklık gibi dış ortam faktörlerinden etkilenmesi biyosensörün ömrünü kısaltmaktadır.

1.2. Biyosensörlerin Çalışma Prensibi

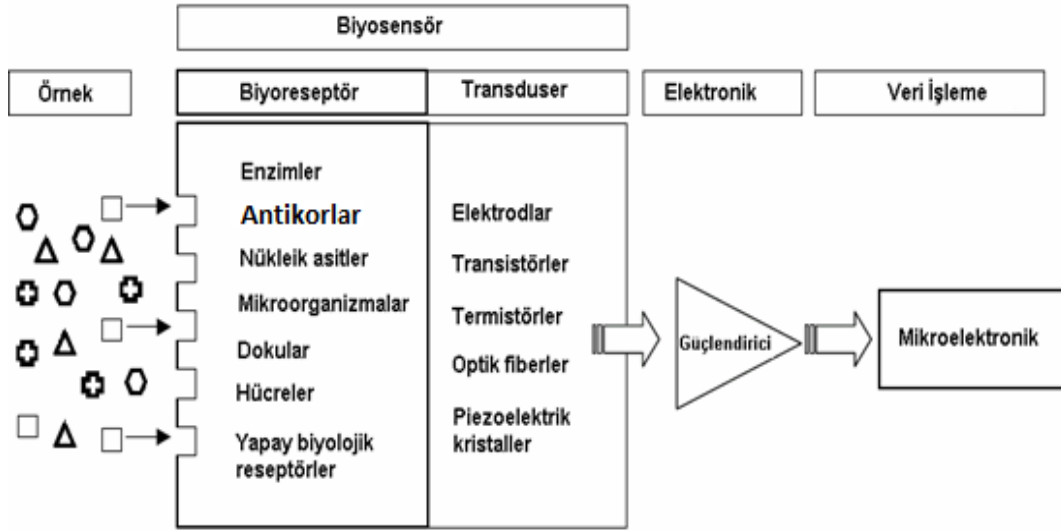
Bir biyosensör üç temel kısımdan oluşmaktadır. Bu temel bileşenler Şekil 1.2' de gösterilmiştir.

- 1) Seçici tanıma özelliğine sahip biyomolekül (Şekil 1.1.c' de a)
- 2) Çevirici (Şekil 1.1' de b)
- 3) Elektronik devre elemanları (Şekil 1.1. c' de c, d ve e)



Şekil 1.2. Biyosensörü oluşturan yapılar [5]

Şekil 1.3’ de biyoreseptör olarak kullanılan yapılar ve dönüştürücü olarak kullanılan yapılar gösterilmiştir. Bu yapılar oluşturulan biyosensöre özgü avantaj ve dezavantajlar sağlamaktadır.



Şekil 1.3. Biyoreseptör olarak kullanılan yapılar ve dönüştürücü olarak kullanılan yapılar [6]

1.3. Biyoreseptör Molekülleri

Biyosensörlerin gelişmesinde teknoloji ve bilim anahtar rol oynayan temel faktörlerdir. Biyosensör üzerindeki biyomolekül tabaka analiz edilecek madde (analit) ile seçici olarak etkileşime giren ve oldukça hassas biyolojik bir yapıdır. Biyoreseptör molekülleri olarak, biyolojik molekülleri (antikor, enzim, protein, nükleik asitler gibi) ya da canlı biyolojik sistemler (hücre, doku ve mikroorganizmalar) gibi yapılar kullanılabilir. Biyoreseptör olarak kullanılacak moleküllerin en önemli özelliği, tespit edilmesi istenen hedef moleküle karşı yüksek afinite ve özgünlük göstermeleridir [4].

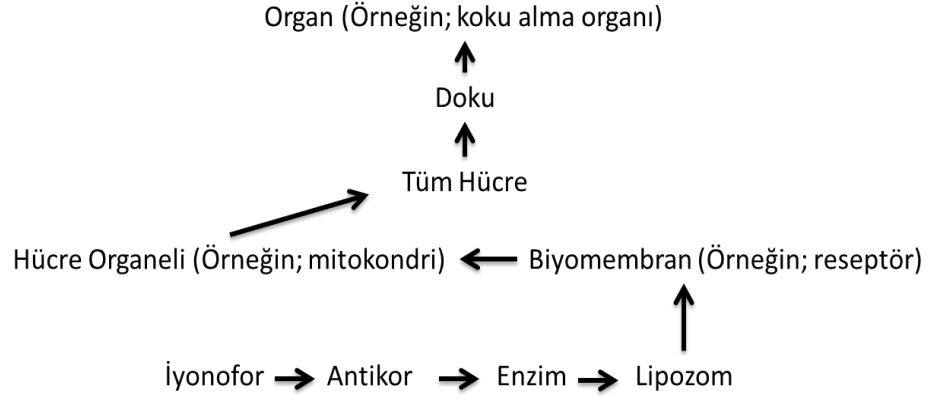
Aşağıda gösterilen yapılar biyoreseptör olarak en çok tercih edilen biyolojik kaynaklardır. Bu yapılar;

- a- Enzimler
- b- Antikorlar
- c- Reseptör Proteinler
- d- Aptamerler
- e- Mikroorganizmalar
- f- Diğer adaylar

1.3.1.Enzimler

Biyoreseptör molekülleri içerisinde en çok tercih edilen yapılardan birisi enzimlerdir. Neredeyse tüm enzimler protein yapıdadır. Enzim tepkimelerinde, tepkimeye giren moleküllere substrat denir. Bir canlı hücredeki tepkimelerin neredeyse tamamı yeterince hızlı olabilmek için enzimlere gereksinim duymaktadır. Enzimler, bulunduğu ortamdaki kimyasallar içerisinde yalnızca kendilerine özgü olan substratı seçerler. Tüm diğer reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da ortamın sıcaklığı, pH ve ortam şartları önemlidir. Enzimler bir tepkimenin aktivasyon enerjisini (E_a veya ΔG^\ddagger) azaltarak çalışır ve böylece tepkime hızını çarpıcı şekilde artırır. Çoğu enzim tepkimesi, ona karşılık gelen ve katalizlenmeyen tepkimeden milyonlarca kere daha hızlıdır. Diğer katalizörler gibi enzimler de katalizledikleri tepkime sonucunda tükenmez ve bu tepkimelerin dengesini değiştirmez. Ancak, diğer çoğu katalizörden farklı olarak enzimler çok daha özgüdür (spesifiktir). Enzimlerin 4000'den fazla biyokimyasal tepkimeyi katalizlediği bilinmektedir [7].

Enzimler genelde hangi tepkimeleri katalizledikleri ve bu tepkimelerdeki substratlara özgüdürler. Enzim ve substratlarının birbirini tamamlayıcı şekil, yük ve hidrofilik/hidrofobik özellikleri bu özgüllüğü meydana getirir. Enzimler ayrıca stereoizomerik, yönsel ve kimyasal özgüllük de gösterebilirler [8]. Şekil 1.4' de biyoaktif materyal hiyerarşisinde enzimlerin yeri gösterilmiştir.

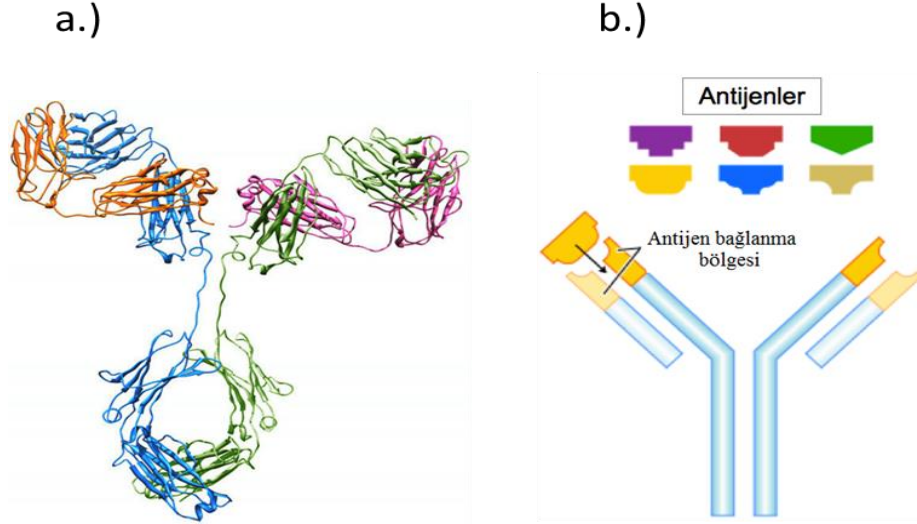


Şekil.1.4. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal hiyerarşisinde enzimlerin yeri [10]

Enzimler hangi tepkimeyi katalizledikleri ve bu tepkimeye hangi substratın girdiğine çok büyük bir özgüllük gösterirler. 1894'te Emil Fischer bunun nedeninin, enzim ve substratının birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekilleri olmasından dolayı olduğunu öne sürmüştür [9]. Bu fikir "anahtar kilit" modeli olarak bilinmektedir. Bu model enzim özgüllüğünü açıklayabilir ama geçiş halinin enzim tarafından stabilizasyonunu açıklamaz. "Anahtar ve kilit" modeli artık yetersiz sayılmaktadır, "indüklenmiş uyum" modeli halen en yaygın kabul gören enzim-substrat-koenzim şeklindedir.

1.3.2. Antikorlar

Antikorlar bir glikoproteindir. Şekil 1.5' de görüldüğü gibi Y şeklinde olup iki adet antijen tanıma bölgesi bulunur. Antijenler vücuda girdiğinde bağışıklık sistemini uyarırlar ve sadece o antijene uygun olan antikorun üretimine başlanır. Antikorları birbirinden ayıran temel fark antijen tanıma bölgeleridir. Her antikor kendine özgün olan antijeni tanır ve ona geçici olarak bağlanır. Şekil 1.5' de bir antikorun görünümü, temsili yapısı ve antijen bağlanma bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 1.5. a.) Bir Antikorun görünümü, b.) Antikorun temsili yapısı ve antijen bağlanma bölgeleri [11]

1.3.3. Reseptör Proteinler

Reseptör proteinler, biyolojik bileşikler için yüksek ve özgün olarak bağlanma özelliğine sahiptirler. Bu özellikler sayesinde biyoreseptör olarak biyosensör teknolojisinde kullanılmaktadırlar.

1.3.4. Aptamerler

Aptamerler, spesifik hedef moleküllerine bağlanabilen peptid molekülleri veya oligonükleik asitlerdir. Aptamerler genelde rastgele düzenlenmiş geniş havuzlardaki dizilerden oluşurlar. Aptamerler ayrıca mRNA'nın yapısında bulunur. Aptamerler temel araştırmalar ve klinik amaçlar için makromoleküler ilaçlar olarak kullanılabilir. Aptamerler, laboratuvarında düzenlenmiş birer nükleik asit çeşididir ve SELEX (İngilizce: systematic evolution of ligands by exponential enrichment) yöntemiyle oluşturulurlar.

1.3.5. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmaların birçok çeşidi bulunur. Bu alan içerisinde, bakteriler, mantarları, mikroskobik bitkileri, planarya ve Amoeba gibi mikro hayvanları içine almaktadır. Bazen virüslerde mikro organizmaların içerisinde dahil edilsede, virüsler canlı olarak kabul edilmemektedir [12]. Mikroorganizmaların büyük kısmı tek hücreli olsada, bu hepsine genellenemez çünkü bazı çok hücreli organizmalar mikroskobik yapılarda iken bazılarıda makroskobiktir.

1.3.6. Diğer Adaylar

Dünya üzerinde, biyosensörlerde kullanılan yapılardan biyoreseptör olarak kullanılabilen bir çok biyolojik materyal bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; hücreler, bakteriler, organeller, membran tabakaları yer almaktadır. Herhangi bir biyolojik yapının biyoreseptör amaçlı kullanımı için tek koşul, materyalin istenilen analiti doğru bir şekilde tanıma kapasitesine sahip olmasıdır [13]. Çizelge 1.2’ de Uygun algılayıcı-çevirici bileşenleri ve literatürde geçen günümüzdeki durumları gösterilmiştir [14]. Günümüzde biyosensörler; biyobileşen ve sinyal iletilici sistem olarak pek çok farklı maddeyi ve sistemi içermektedir. Bunların en önemli olanları Çizelge 1.1’ de verilmiştir [15].

Çizelge 1.1. Biyobileşen ve sinyal iletilici sistemlerde kullanılan en önemli yapılar

Analit	Biyobileşen	Sinyal İletici Sistem
Metaller		Elektrokimyasal Esaslı
Enzim	Antikorlar	Yarı iletken Esaslı
Substrat	Doku kesitleri	Fotometri esaslı
İnhibitör	Mikroorganizmal	Fluometri esaslı
Antikor-Antijen	Nükleik asitler	Piezoelektrik
Nükleik asit	Lipidler	Kuartz kristal mikrobaleans
Mikroorganizmalar	Hücre organelleri	Mikroantileverlar

Çizelge 1.2. Biyosensörlerin literatürde geçen günümüzdeki durumları [12]

Çevirici	Algılayıcı					
	Enzimler	Mikroorganizmalar- organeller	Antikorlar	Doku kesiti	Nükleik asitler	Kimyasal algılayıcı
Elektrotlar						
a) Amperometrik	***	**	**	**	*	
b) Potansiyometrik	***	**	**	**	*	*
Transistörler	**		*			
Termistörler	*		*			
Fiber Optik	*		*			
Piezo elektrik kristaller	*		*		*	

* Araştırma aşaması

** Araştırma ve prototip geliştirme aşaması

*** Araştırma ve ticari ürün aşaması

Farklı uygulamalar için farklı tiplerde biyosensörler üretilmektedir. Üretilen farklı tip biyosensörlerin herbirine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Çizelge 1.3’ de bir biyosensörde kullanılan enzim, doku kesitleri, mikroorganizmalar kullanmanın avantajları ve dezavantajları verilmiştir.

Çizelge 1.3. Biyosensörlerde kullanılan kanakların avantaj ve dezavantajları

KAYNAK	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Saf Enzimler	<ul style="list-style-type: none">• Daha spesifiktir• Difüzyon sorunu yoktur• Daha kısa sürede analiz• Kullanım miktarı azdır	<ul style="list-style-type: none">• Pahalıdır• Kararlılığı düşük• İmmobilizasyon sorunu• Kullanım süresi kısa
Doku Kesitleri	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek kararlılık• Yüksek aktivite• Düşük maliyet• Kullanım kolaylığı	<ul style="list-style-type: none">• Difüzyon sorunu yoktur• Daha uzun analiz süresi• Mikroorganizma üremesine açık
Mikroorganizmalar	<ul style="list-style-type: none">• Dayanıklılık yüksek• Hazırlama kolaylığı• Yüksek kararlılık	<ul style="list-style-type: none">• Difüzyon sorunu vardır• Daha uzun analiz süresi

1.4. Çalışma Prensiplerine Göre Sensörler

Biyosensörleri çalışma prensiplerine göre dört grupta incelemek mümkündür.

Bunlar;

- a) Biyoaffinite Esaslı Biyosensörler
- b) Biyokatalitik Esaslı Biyosensörler
- c) İmmobilize Hücre esaslı Biyosensörler
- d) Transmembran Esaslı Biyosensörler

1.4.1. Biyoaffinite Esaslı Biyosensörler

Antijenlerin, Hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar. Biyoaffinite Esaslı Biyosensörlerde; Antikorlar, Hormon Almaçları, DNA, Lektin vb. gibi yapılar kullanılmaktadır.

1.4.2. Biyokatalitik Esaslı Biyosensörler

Bu tip biyosensörde iletici sistem üzerinde enzim immobilizasyonu ile enzimin substratı, inhibitörü, aktivatörü veya koenzimi olan çeşitli kimyasal maddelerin tayininde önem arz etmektedir.

1.4.3. İmmobilize Hücre Esaslı Biyosensörler

İletici sistem üzerinde hücrelerin immobilizasyonu ile o hücreler tarafından metabolize edilen çeşitli maddelerin tayininde bu tür biyosensörler tercih edilmektedir.

1.4.4. Transmembran Esaslı Biyosensörler

Çeşitli moleküllere spesifik reseptör veya farklı membran proteinlerini içeren hücre membranlarının iletici sistem üzerinde immobilizasyonu ile söz konusu moleküllerin seçimli bir şekilde tayinlerinde tercih edilmektedirler.

1.5. İletim ve Ölçüm Sistemine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır [16].

- a. Elektrokimyasal esaslı (Amperometri, Potansiyometri)
- b. Optik esaslı (Fotometri, Flüorometri, Biyoluminesans)
- c. Piezoelektrik esaslı (Kvartz kristal mikrobals, Mikrokantileverlar)
- d. Kalorimetri esaslı (Termistörler)

1.6. Çeviriciler

Biyosensörlerin biyolojik tanıma kısmının bulunduğu yani “tanıyıcı tabaka” ve ikinci kısımda ise “Çevirici (Transducer)” yapısından oluşur. Dönüştürücüler, algılayıcıların biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyonun özelliğine uygun olan dönüştürücüler tercih edilir. Bunlar;

- a-Piezoelektrik dönüştürücüler
- b-İletkensele dönüştürücüler
- c-Elektrik kapasitans dönüştürücüler
- d-Termoelektrik dönüştürücüler
- e-Geleneksel Dönüştürücüler
- f- FET Tipi Dönüştürücüler

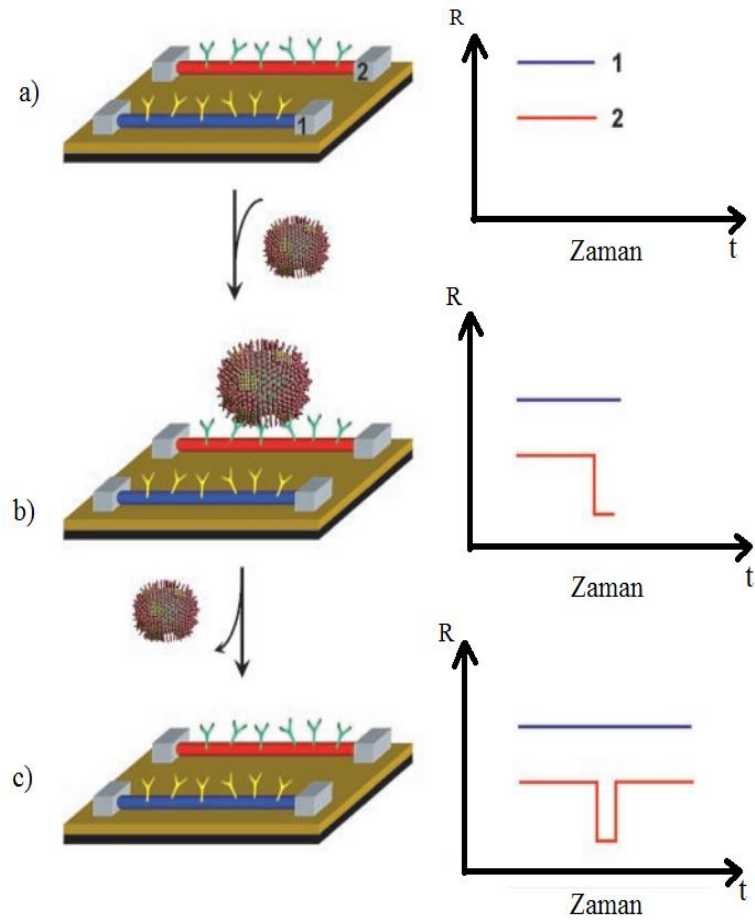
1.6.1. Piezoelektrik Dönüştürücüler

Piezoelektrik algılama sensör yüzeyinde bulunan biyoreseptör ile sensör üzerine enjekte edilen analitin reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan kütle artışına bağlı olarak kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesi temeline dayanır [17]. Basitçe ifade edecek olursak; Piezoelektrik malzemeler üzerine uygulanan mekanik zorlamaya gerilim üreterek tepki verir ve bu olay tersinir özellik gösterir. Piezoelektrik dönüştürücüler virüslerin tayininde kullanılabilir. Ayrıca kalbe destek cihazlarında, titreşim ölçerler için ivme algılayıcılarında, gürültü kontrolünde, basınç algılamasını gibi alanlarda kullanılmaktadır [18].

1.6.2. İletkensele Dönüştürücüler

Amperometrik ölçüm sabit gerilim altında bulunan elektrokimyasal hücreden geçen akım yoğunluğunun ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Burada referans elektrod ve ölçüm elektrodu şeklinde iki elektrod kullanılmaktadır. Yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonu ölçüm elektrodu tarafından gerçekleştirilir. Elektroliz süresince, analitin yapısına göre ölçüm elektrodu anot ya da katot olarak davranabilmektedir [17]. Bir solusyonun iletkenliğindeki değişim bu solusyon

içerisindeki reaksiyonun hızını belirlemede kullanılabilir. Oluşan iyonların yaptığı hareket sonucu iletkenlikteki değişimleri baz alan bu teknik bir çok enzim ile ilgili reaksiyon hızlarının ölçülmesinde kullanılmaktadır. Aşağıda gösterilen örnek Şekil 1.6’ da, sistem üzerinde birbirine paralel iki biyosensör bulunmaktadır. Hedef analite özgün antikor ikinci sensörde bulunmaktadır. Bir numaralı sensör referans olup, iki numaralı sensörde oluşan bağlanma sonucu iletkenlikte bir değişme meydana gelir. Dönüştürücü iletkenlikteki değişimi algılar ve referansın iletkenliği ile karşılaştırılıp dijital uyarı haline dönüştürülür [19].



Şekil 1.6. Biyosensörün yüzeyine bakteri eklenmesinden önce ve sonra iletkenlikteki değişim gösterilmiştir (R: direnç) [19]

1.6.3. Elektrik Kapasitans Dönüştürücüleri

Elektrik ile yüklenen cisimler sığa barındırır ve Sığa bir cismin yük depo etme yeteneğidir. Kapasitans ölçüm metodu kullanılarak oluşan bir dönüştürücüdür. Örneğin; Nanobiyosensör üzerindeki antikorlar hedef analit ile etkileşime girerler. Ortamın dielektrik sabitinde öncekine oranla değişme meydana gelir ve bu değişim dijitalize edilerek yorumlanır.

1.6.4. Termoelektrik Dönüştürücüler

Biyosensör üzerine enjekte edilen analit ile biyoreseptör arasında oluşan reaksiyon sonucu sistemin entalpisi değişir. Bu değişimin ölçülmesi ile termometrik algılama gerçekleşir. Sıcaklığın ölçülmesi amacı ile optik, mekanik veya elektriksel metodlar kullanılabilir. Sistemde oluşacak olan sıcaklık değişimi ile doğrusal olarak elektrik sinyali üretilebilir. Termal sensörlerin oluşturulmasında elektriksel yöntem en etkili yöntem olarak kabul edilir [17].

1.6.5. Geleneksel Dönüştürücüler

Geleneksel dönüştürücüler üçe ayrılırlar. Bunlar; amperometre, potansiyometre ve fiber optik kablo kullanan fotometredir. Biyotanıma reaksiyonları genelde kimyasal ürünler üretir ve bu ürünler elektrokimyasal metotlarla tesbit etmek mümkündür. H_2O_2 (veya reaktif O_2) bir çift elektrod vasıtası ile ölçülebilir. Önce referans elektrodun karşısında olan elektroda (Ag/AgCl veya Kalomel) uygun bir voltaj uygulanır. Bu durumda hedef moleküller olan H_2O_2 veya O_2 elektrotta yüksetkenir ve ardından bir akım oluşur ve oluşan bu akım amperometre ile algılanır. Potansiyometre ise bir membranın iki tarafındaki H^+ farkına bakarak çalışır. Fotometre ise oluşan ışığı sinyal olarak algılar. Fiber optik kablolar oluşan bu ışığı yönlendirmede kullanılırlar [20].

1.6.6. FET Tipi Dönüştürücüler

İyon konsantrasyonlarındaki değişimi algılayabilen FET' ler oldukça kullanışlıdır [13].

1.7. Biyosensörlerin Kullanım Durumuna Göre Sınıflandırılması

Biyosensörler kullanım şekillerine göre: Tek kullanımlık, ara kullanımlık ve sürekli kullanımlık olmak üzere 3 kategoriye ayrılır.

1.7.1. Tek Kullanımlık Biyosensörler:

Elektrokimyasal veya optik hücre içerisinde bir seçici eleman ve dönüştürücü bulunur. Numune çözütüsü ile reseptör arasında reaksiyon başladıktan birkaç saniye sonra kronoamperometrik olarak ölçüm işlemi gerçekleşmektedir. Bu tip biyosensörlerin dezavantajları maliyeti yüksektir, doğrulukları ve kararlılıkları düşüktür, kolay kalibre edilemezler. Genellikle kandaki glukoz miktarının ölçülmesinde kullanılırlar [21].

1.7.2. Ara Kullanımlık Biyosensörler:

Genellikle akış olan ortamlarda kullanılırlar. Bu sensörlerin ölçüm sonuçları yüksek doğruluk ve kesinlik sağlar. Düşük konsantrasyonlarda bile hassasiyetleri oldukça yüksektir. Ayrıca kullanım ömürleri yüksek olan bu tip biyosensörlerin maliyetleri ise düşüktür. Fakat portatif olmayan ara kullanımlık biyosensörler laboratuvar ortamına bağımlıdır. Bu tip sensörlerin yonga üzerinde laboratuvar (Lab on a chip) uygulamalarında kullanılması üzerinde çalışılmaktadır [21].

1.7.3. Sürekli Kullanımlık Sensörler:

Yapıları basittir ve maliyetleri düşüktür. Bu tip sensörler çoğunlukla canlı dokulardaki uygulamalar için kullanılan yöntemler arasında en az etkin olan sensör çeşididir. Algılama yetenekleri oldukça düşük olmaları, çoğu durumda doğruluk ve kesinlikleri kontrol edilememektedir, verdikleri cevaplar ise tam olarak anlaşılammaktadır [21].

1.8. İdeal Bir Biyosensörde Aranılan Nitelikler

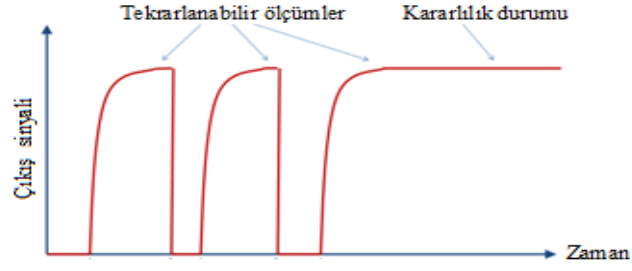
İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken parametreler aşağıda verilmiştir [22].

1) Seçicilik: İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken en önemli parametrelerden birisidir. Eğer yeterli oranda seçici değilse, bu eksikliğin giderilmesi uzun süren ek işlemler gerektirir.

2) Kullanım Ömrü: Biyosensörlerin kullanım ömürlerini belirleyen en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Ayrıca, çevirici aktivitesindeki azalmalar biyosensörün kalibrasyon sıklığını, stabilitesini, tekrarlanabilirliğini ve diğer özelliklerindeki etkilemektedir.

3) Kalibrasyon Gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün kalibrasyona gerek duymaması veya en az düzeyde kalibrasyona gereksinmesi istenir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

4) Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde yaklaşık olarak aynı sonuçları okunması gerekir. Şekil 1.7’ de tekrarlanabilirlik örneği gösterilmiştir. Ayrıca sensörler için yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi oldukça önemlidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensör uygulamaları da o denli iyi olur.

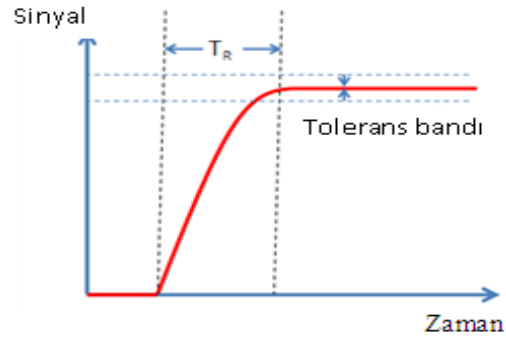


Şekil 1.7. Güvenilir bir biyosensörün tekrarlanabilirlik ve kararlılık ölçümünü [4,22]

5) **Stabilite:** Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

6) **Yüksek Duyarlılık:** Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin (örneğin antikorlar) yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özellikleri arasındadır.

7) **Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı:** Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir. Şekil 1.8' de cevap zamanı ve tolerans bandı aralığı gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Cevap zamanı ve tolerans bandı [4,22]

8) Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

9) Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

10) Hızlı Geriye Dönme Zamanı: Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilâvesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilâve edilebilecektir.

11) Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

12) Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

1.9. Uygulama Alanları

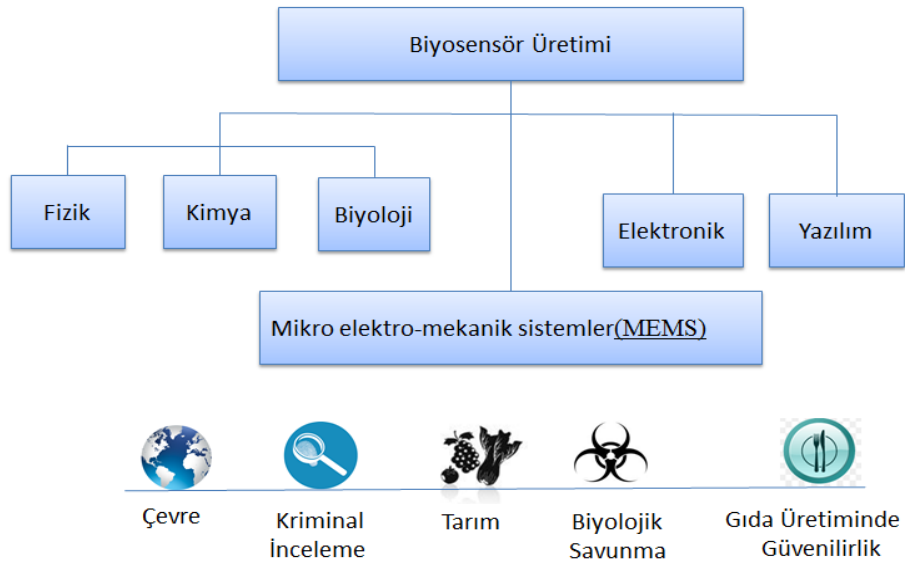
Biyosensörlerin hazırlaması, üretimi ve teknolojileri ayrıca biyosensörlerin uygulama alanları gündelik hayatın her alanında, özellikle medikal tanı, gıda, çevre analizleri, tarımsal ürünlerin kontrolü amacı ile yoğun kullanımı günden güne artmaktadır [23].

Biyosensörlerde reaksiyonların spesifikliğinin yüksek olmasından dolayı, tıp alanında kullanılmaya çok elverişlidir.

Biyosensörler;

- a. Biyomedikal alan
- b. Proses kontrolü
 - i. Biyoreaktör kontrolü
 - ii. Gıda üretim ve analizi
- c. Tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik
- d. Bakteriyel ve viral tanı
- e. Endüstriyel atık su kontrolü
- f. Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- g. Maden ve işletmelerinde toksik gaz analizleri
- h. Askeri uygulamalar gibi alanlarda kullanılırlar.

Bu değerler 2000 yılından bu yana 10 kat büyüme göstermiştir ve hızla büyümeye devam etmektedir. Tanımlanan gen-ilaç ilişkileri ise 1990'da yok denecek kadar az iken 2007'de 510'a çıkmıştır. (TEPAV Şubat 2012) Bugüne kadar 180'den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir [24].



Şekil 1.9. Biyosensör üretiminin şematik gösterimi

1.9.1. Biyosensörlerin Tıp Alanında Kullanımı

Tıp alanında en çok tercih edilen biyosensör çeşidi enzim sensörleridir. Enzim sensörleri, ölçümlerindeki yüksek duyarlılık, uygulama ve kurulumdaki kolaylık ve ticari uygun transduser çeşitlerinin bolluğu yer almaktadır. Son yarım asırda yaygınlaşan diyabet hastalığını teşhis etmekte kullanılan glikoz oksidazlı enzim sensörü en fazla ilgiyi çeken biyosensördür [25].

Günümüz teknolojisi ile elde edilmiş biyosensörler, çok az miktar kanda ve idrar içerisinde bulunan glikoz tayinini çok hızlı bir şekilde gerçekleştirmektedirler. Tıp alanında kullanım söz konusu olduğunda biyoyumumluluk çok önemli bir parametredir. Vücut içi kullanımda enzim içeren membran üzerinde fibrin birikimi ve platelet oluşumu gibi tehlikeler meydana gelebilir veya vücut dokularında iltihaplanmalar olabilir [26]. Bu gibi sorunların önüne geçmek için biyosensörün dokularla temas edecek yüzeyleri özel malzemelerle kaplanır. Diğer tıbbi biyosensörlere örnek verecek olursak üre ve kreatinin elektrotları, kolesterol elektrotları, asetilkolin elektrotlarıdır. Bu sensörler sayesinde önemli hastalıkların teşhisi sağlanabilir. Örneğin üre seviyesi böbrek işlevini takip etmekte, kolesterol seviyesinin gözetimde tutulması arteriyosklerozlarının engellenmesinde, asetilkolin elektrotu kas yorulmalarının değerlendirilmesinde kullanılırlar [27].

Tıp alanında kullanılan biyosensörlerde mikrobiyal sensörler kullanılmaz. Bunun nedeni mikroorganizmalar için kültür ortamı olma özelliğini taşıyan biyolojik sıvılarla çalışılmasıdır. Biyokütlenin büyümesi, hücrelerin sızması ve örnek ortamının kontamine olmasıyla birlikte, biyokatalitik matriksi deforme eder. Ayrıca mikrobiyal sensörler çok sayıda enzim içerirler ve pek çok medikal analiz için yeterince uygun değildirler.

İmmünolojik reaksiyonların özgüllüğünün yüksek olmasından dolayı, immünolojik biyosensörler tıpta kullanılmaya elverişlidir. Bu sensörler ilaç etken madde ölçümünde yaygın olarak kullanılırlar. Örneğin teofilin sensörü, hamilelik testi için HCG hormonu sensörü, kanser teşhisi için alfa-fetoprotein sensörü, hepatit B için yüzey antijen sensörü, tıpta kullanılan immünolojik sensörlerdir [28]. Protezlere yerleştirilen biyosensörler sayesinde, protez yüzeyinde üreyen bakterilerin türleri tespit edilir ve protez içinde bulunan antibakteriyel maddeler salgılanıp ve enfeksiyon engellenir [26].

1.9.2. Çevre Koruma Ve Kontrolünde Biyosensörler

Biyosensörler özellikle şehirlerde çevre kalitesi, atmosfer ve su kirliliğinin düzenli olarak kontrol edilebilmesine olanak tanımaktadır. Su kirliliği hem endüstriyel hem de ev artıklarından kaynaklanmaktadır. Biyosensörler sudaki organik kirliliklerin ölçülmesi ve toksit maddelerin tayin edilmesinde kullanılmaktadırlar.

1.9.3. Askeri Alanda Biyosensörler

En tehlikeli kitle imha silahlarından biri de biyolojik silahlardır. Biyolojik saldırılara karşı yapılabilecek en etkili önlem tehlikeyi önceden belirleyip gerekli önlemleri en hızlı şekilde alınmasını sağlamaktır. Biyosensörler, bu görevi en iyi şekilde yerine getirirler. Biyosensörler güvenilir, yanlış ve negatif sonuç vermekten uzak, özgün, hassas, kolay kullanılabilir ve hızlı bir şekilde sonuç verirler. Bu katagoride ilk ticari biyosensör BioVeris, Response Biomedical Corporation ve QTL tarafından piyasaya sürülmüştür.

1.9.4. Gıda Sektöründe Biyosensörler

Gıda sektöründe uygulanan analizler kalite ve güvenlik amacına yönelik olarak gerçekleştirilmektedir. Kaliteden amaç, bazı fiziksel özellikler ve kimyasal bileşenlerin miktarlarının belirlenmesi, güvenlikten amaç ise zararlı mikroorganizmaları veya onların toksinlerini ve diğer allerjen ve toksik bileşenlerin miktarlarını hızlı bir şekilde saptamaktır. Ayrıca gıdalara dışarıdan eklenen ve belirli bir amaca yönelik olan veya olmayan maddelerin tespiti de ayrıca çok önemlidir [29]. Gıda sektöründe biyosensörlerin kullanılması, işlenmiş ve çiğ gıdalarda kontaminasyonu belirlemede, fermentasyon sürecinin çevrimiçi olarak hızlı bir şekilde kontrol edilmesine imkân tanır.

Biyosensörler maliyetlerinin az olması nedeniyle çevrimiçi ölçüm sistemleri oluşturularak HACCP (Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) sistemlerinde

kontrol mekanizması olarak kullanılabilir. Çizelge 1.4’ de üretilen bazı gıda ürünlerinin içerisindeki bileşenler için biyosensör uygulamaları gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. Bazı gıdalar ve içerisindeki bileşenler için biyosensör uygulamaları (Çizelgede A: Amperometrik, P: Potansiyometrik) [30]

Analit	Uygulama	Biyokomponent	Dönüştürücü	Tespit aralığı
Glikoz	meyve suları ve süt	Glikoz oksidaz	A	50–500 mM
Glikoz ve Laktoz	Süt	Glikoz oksidaz, mutarotaz	A	4,44 g/100g (laktoz)
Fruktoz	Bal, süt, meyve suyu ve şarap	D-fruktoz dehidrogenaz	A	50×10^{-6} - 10^{-3} mol/L
Nişasta	Buğday unu örnekleri	Amilolitik oksidaz ve glikoz oksidaz	A	5×10^{-6} - 10×10^{-4} mol/L
L-aminoasitler	Sentetik örnekler	L amino asit oksidaz ve horşeradiş perpsidaz	A	
L-malat	Şarap, meyve suları ve cider	L-malat dehidrogenaz ve salsilat hidrosilaz	A	0,01 – 1,2 mol/L
Askorbik asit	Meyve suları	Askorbat oksidaz	A	5×10^{-3} – $1,2 \times 10^{-3}$ M

1.9.5. Biyosensörlerin Biyolojik Savaş Ajanların (BSA) Tespitinde Kullanılması

Biyolojik savaş ajanları (BSA) 11 Eylül saldırıları sonrası toplum içerisinde en korkulan saldırı türü olmaya başlamıştır. 1995’de Tokyo’da şarbon saldırısından sonra, 11 Eylül saldırılarında da yine şarbonlu mektuplar ortaya çıkmıştır. Bu yüzden bu tür saldırıların önüne geçebilmek için dikkatler BSA üzerine yönelmiştir [31]. Terörist saldırıların yanında, 17 farklı ülkeden biyosilah üretimiyle alakalı projelerin yürütülmekte olduğu tahmin edilmektedir. Hastalık Kontrolü ve Engellenmesi Merkezi (ing: Center for Disease Control and Prevention (CDC)) tarafından yapılan bir araştırmaya göre bir teröristin ABD şehirlerinden birine kasıtlı bırakacağı şarbonun verebileceği ekonomik zararın maliyeti 477,8 milyon–26,2 milyar \$/100 bin kişi olarak hesaplanmıştır [32]

BSA’lar çeşitli sınıflara ayrılır. Bunlar;

- a) Etkilerine Göre (öldürücü etkili BSA’lar ve şiddetli hasta yapan BSA’lar),
- b) Taksonomilerine göre,
- c) Salınım Şekillerine Göre (Aerosoller, vektörlerle, su veya yiyeceklerle taşınanlar),
- d) Sebep Oldukları Klinik Sendromlara Göre (sistemik hastalık ajanları) [32].

1.10. BSA’ların Tesbitinde Zorluklar

Biyolojik saldırılarda en büyük problem, biyolojik saldırılar ile olağan hastalık belirtileri arasındaki farkın belirlenmesidir. Biyolojik savaş ajanları (BSA) diye algılanan ve esasında olağan bir enfeksiyonel hastalığın mevsimsel artması da olabilir veya daha az zararsız ajanların sebep olduğu rahatsızlıklar da olabilir. Bu soruların cevaplanmasında moleküler tekniklere oldukça büyük iş düşmektedir. “Tedavi İçin Tesbit (TİT)” ve “Koruma İçin Tesbit (KİT)” diye iki tür cihaz kullanılmaktadır. TİT’de amaç kişinin BSA’ya maruz kaldığı birkaç saat içinde BSA’nın tesbiti iken, KİT BSA’nın ortama bırakılmasından birkaç dakika içinde (hastalık bulaşmaya başlamadan) tesbitini hedefler. TİT’ler genelde hastane laboratuvarlarında kullanılan analitik cihazlar iken, KİT’ler sensör (biyosensör) türü cihazlardır [32,34]. Çizelge 1.5’ de Bazı bakteri türleri ve virüs türlerinin yayılma yolları, kuluçka süreleri ve kişi üzerinde ortaya çıkan belirtiler verilmiştir.

Çizelge 1.5. Bazı bakteri ve virüslerin yayılım yolları, kuluçka süreleri ve semptomları [32]

Doğrudan bireyden bireye bulaşan hastalıklar			
Bakteriler	Yayılım yolu	Kuluçka süresi ve öldürücülük	Semptomlar
Kolera	Su ve gıda kontaminasyonu	Saatler – tedavi olunmazsa %25'lere varan ölüm riski	Sulu ishal, kusma, Bacakta kramplar.
Tifo	Su ve gıda kontaminasyonu	3 günle 8 hafta arasında, orta derecede ölümcül	Zayıflama, ağrı ve ateş
Çiçek	Direk temas, vücut sıvısı	1–17 gün. Yüksek ölüm oranı	Yüksek ateş, kansızlık, ödem, kaslarda ağrı, baş ağrısı
Ebola,marburg	Muhtemel hayvan taşıyıcılar	2–21 gün. Yüksek ölüm oranı.	Yüksek ateş, aşırı halsizlik, kansızlık, noktalı kanama, baş ağrısı, kaslarda ağrı
Bireyden bireye bulaşma yok veya kısmi bulaşma sözkonusu ise			
Şarbon	Sporla, aerosoller, gıda	1–5 gün. Yüksek ölüm	Ateş, halsizlik, şok. 36 saat içerisinde ölüm olabilir.
Aflotoksin	Aerosoller, kontamine gıda ve sular	Değişik sürelerde alınan doza ve yonteme göre ölüm oranı değişir.	Ateş, nefes darlığı, öksürük, karaciğer hasarları, kanser, ölü doğum

1.11. Biyosensörün Tasarlama Aşamaları

Biyosensörlerin geliştirilmesi için çalışan kişilerin fizik, biyoloji, biyokimya, elektronik, elektrokimya, immobilizasyon konuları hakkında bilgisi olması gerekir. Bir biyosensörün çalışma prensibine kabaca maddeler halinde inceleyecek olursak;

- 1) Yapılacak biyosensör çalışmasına ilk olarak algılanacak analitin belirlenmesi ile başlanır.
- 2) Daha sonra hedef analite uygun bir biyoreseptör seçimi yapılır.
- 3) Biyoreseptöre uygun immobilizasyon yöntemi seçilir.
- 4) Hedef analit ile reseptör arasında oluşan etkileşimi algılayan uygun bir dönüştürücü sistem seçimi yapılır.
- 5) Oluşturulacak Biyosensörün ölçüm aralığının geniş olması, tekrarlanabilir olması, ölçümde oluşan parazitlerin en aza indirilmesi ve seçici olmasına dikkat edilir.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Isısal Buharlaştırma (PVD) Sistemi

Birden çok metal kaplama yöntemi bulunmaktadır. Isısal buharlaştırma yöntemi (PVD) bunlardan biridir ve en çok tercih edilen metal kaplama yöntemidir. Fiziksel buhar biriktirme cihazının resimleri Şekil 2.1’ de gösterilmiştir. Fiziksel buhar biriktirme yönteminde, katı bir metalin rezistif olarak ısıtılması ile buharlaştırılarak, serin bir yüzey üzerinde biriktirilmesiyle oluşur. Kaplama esnasında kaplanacak maddenin eşit dağılması için altlık sabit ve belirlenen uygun hızda döndürülür. Metal buharlaştıktan sonra yüzeye yapışana kadar ortamdaki gaz molekülleriyle çarpışmalara uğrar, istenmeyen bu çarpışmalar nedeniyle kaplama tam olarak gerçekleşmez. 20°C’de hava için ortalama serbest yol, sırasıyla 10^{-4} ve 10^{-6} Torr basınçlarda 45 ve 4500 cm’dir. Bu yüzden vakum odasındaki kaynak ile altlık arasındaki 10–50 cm mesafe boyunca metal buharının düz bir şekilde giderek yüzeye yapışabilmesi için 10^{-5} Torr’ dan daha düşük bir basınçta çalışmak gerekmektedir.



Şekil 2.1. Isısal buhar biriktirme sistemi (UNAM-Vaksis PVD Vapor – 3S)

İyi bir kaplama elde etmek için en önemli şartlardan biri vakumdur. Kaplanan metalin kalınlığını ölçmek için kaplama bölgesine bir kalınlık dedektörü yerleştirilmiştir ve cihazın dış kısmında kalınlık monitörü bulunmaktadır. Kaplanan kalınlığın izlenmesi için kullanılan kristal dedektör ile altlık arasında yatay mesafe olduğu için bu iki yüzeyde biriktirilen metal miktarlarının oranı belirlenmelidir. Bu oran “Referans faktörü (Tooling factor)” olarak adlandırılır. Çizelge 1.6’ da bazı metallere ait referans faktörleri verilmiştir [35,36].

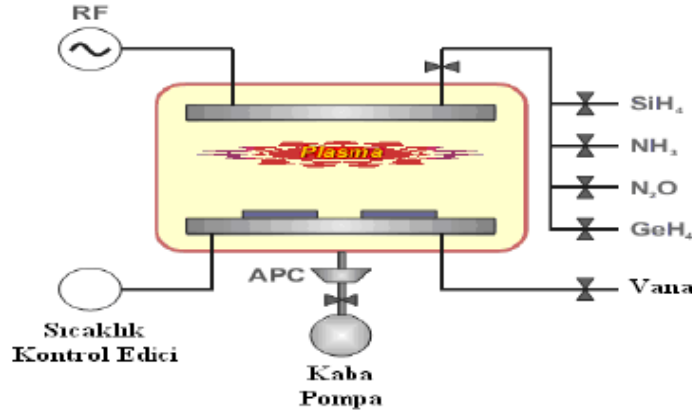
Çizelge 1.6. Bazı metallere ait referans faktörleri [37]

Metal	Yoğunluk (g/cm³)	Akustik empedans	Referans faktörü	Akım
Au	19.30	23.17	1.55	54.0
In	7.30	10.49	1.30	34.0
Cr	7.20	28.95	1.55	50.0

2.2. Plazma ile Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar Depolama Sistemi (PECVD)

İnce film üretmek için çeşitli tekniklerden yararlanılmaktadır. Çok daha ince film üretmek için farklı tekniklerden kullanılır. Isısal buhar biriktirme (PVD) ve kimyasal buhar biriktirme (CVD) yöntemleri bu tekniklerden birkaçıdır. Bu teknikler arasında en sık kullanılan CVD yöntemidir. CVD tekniğın plazma destekli çeşidi olan plazma-destekli kimyasal buhar biriktirme (PECVD) ve Radyo frekansı (RF) yöntemleri üzerinde en çok tercih edilen kaplama yöntemidir. Bu tekniklerin diğer yöntemlere göre en önemli avantajı kaplanacak malzemeyi yüksek sıcaklığa çıkarmadan kaplamaya olanak sağlamasıdır. CVD tekniğinde büyütme sıcaklığı 700–900 °C arasında değişirken PECVD tekniği ile sıcaklık 150 – 350 °C arasında çalışma imkânı sağlar. Yüksek büyütme sıcaklıkları altında IC uygulamalarda bazı malzemeler arasında oluşabilecek difüzyonlar ve benzer sorunlar oluşmaktadır ve bu sorun PECVD tekniği ile düşük sıcaklık kullanılarak oluşabilecek büyütme hatalarını en aza indirgenmesi sağlanmış olur. Plazma biriktirme sistemi; içerisinde plazmanın elde edildiği reaktör, birbirine paralel disk şeklinde iki elektrot, gazların bileşenlerine

ayrılması için radyo frekanslı gerilim uygulayan RF jeneratörü, reaktöre kontrollü bir şekilde gaz akışını sağlayan iğne vana, akış ölçer ve düzenleyicilerin olduğu gaz girişleri ile çıkışlarının mekanik vakum pompalarının bulunduğu bir sistemden oluşmaktadır. Paralel iki elektrot arasında doğru akım (DC) uygulanarak elektrik alanın katkısıyla elektrotlar arasında bir kaç pF değerinde bir kapasitans oluşur ve RF sinyali uygulanır. Gönderilen gazlar anot-katot arasında plazmanın sadece bu iki elektrot arasında oluşması sağlanır. Bu plazma oluşması istenilen kaplamanın cinsine göre ortamda bulunan SiH_4 , GeH_4 , N_2O gibi gerekli bulunan gazları bileşenlerine ayırır ve altlık üzerinde ince bir film tabakası halinde oluşturulmasına olanak sağlar. Başlangıç aşamasında bu kullanılan teknikte tabakalar arasında uygulanan elektrik alan ortamda içerisinde bulunan gazların kinetik enerjilerinin artmasına ve bu sayede gaz ortamından ayrılan bazı gaz moleküllerin iyonize olmasına sebep olur ve dolayısı ile iyonize olmuş moleküllerin birbirleri arasında etkileşimi sonucu reaksiyon başlatılır. İşlem devam ederken ortamda içerisinde yeni elektronlar üretilmesi devam eder ve bu oluşum plazmanın oluşumunu sağlar [38].



Şekil 2.2. Plazma ile güçlendirilmiş kimyasal buhar depolama (PECVD) sistemi [38]

1970 'lerden sonra, RF yardımı ile plazma oluşturma sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemin kullanılması ile yüksek teknoloji gereksinimi duyulan özellikle büyük boyutlu elektronik devrelerde, ince film üretimi ve inceltme yöntemlerinde bu yöntemden yararlanılmaktadır. RF, diğer plazma türlerinden büyük

boyutlarda uygulanabilir olması sebebiyle önemlidir [38]. Şekil 2.3' te PECVD sistemi gözükmektedir. Reaksiyonu Silan gazı için gösterelim [38];



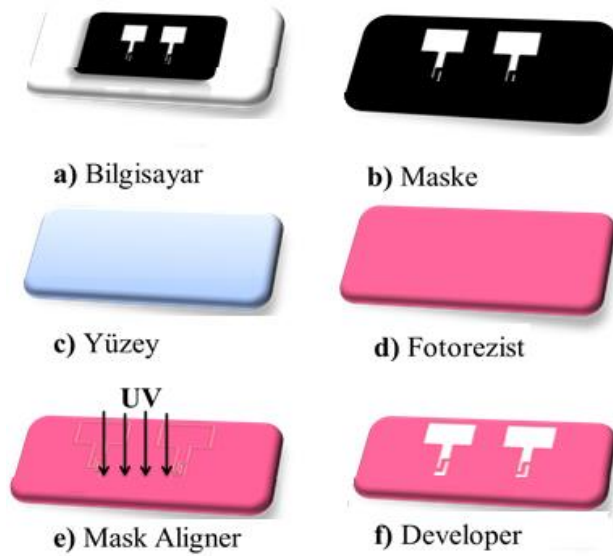
Şekil 2.3. PECVD sistemi (UNAM-CVD)

2.3. Fotolitografi (Şekil aktarımı)

Litografi, basitçe söylemek gerekirse ışıkla yazma işlemi olarak tanımlanabilir. Teknolojideki ve yarıiletken endüstrisinin gelişmesi sayesinde litografinin kullanım alanları ve kabiliyetlerinde önemli gelişmeler olmuştur. Litografi ışıkla yapıldığı gibi bir elektron demetini yönlendirerek maskesiz olarak veya başka yöntemler kullanılarakda yapılabilir ancak, alternatif sistemlerin kurulum

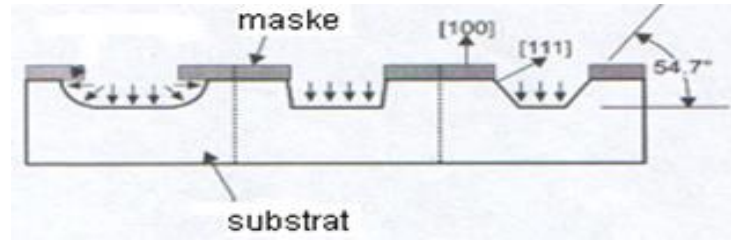
işletim maliyetleri yüksek olması ve uygulama alanları sınırlı olmasından dolayı genellikle araştırma amaçlı olarak kullanılırlar. Üretim süreçlerinde çoğunlukla fotolitografi kullanılır. Fotolitografi de en çok tercih edilen yöntem UV-litografidir. UV ışık bir maske üzerinden, bu dalga boyundaki ışığa duyarlı ve wafer üzerine serilmiş olan fotoreziste iletilir. Maskenin şekli, rezistin özellikleri ve devamında kimyasal süreçler sonunda arzu edilen mikro veya nano şekil yarı iletken üzerine transfer edilmiş olmaktadır [39].

Fotolitografi yapılmak istenen bir kalıbın materyal üzerine aktarılmasında kullanılan bir işlemdir. Bilgisayar programı (CAD) kullanarak çizilen örnek (şekil 2.4.a) Şekil 2.4.b’ de görülen maske üzerine aktarılır. Bu Maske cam levhadan yapılmıştır ve yüzeyinde, istenilen şekli taşıyan ışıkla opak bir materyal bulunur. Maske hazırlandıktan sonra substrat (şekil 2.4.c), ışığa duyarlı organik bir polimerle kaplandığı zaman şekil aktarılması ile işleme başlanır (şekil 2.4.d). Substrat ile maske birleştirilir. UV ışık maske içinden ışığa duyarlı organik polimer üzerine gönderildiğinde, (şekil 2.4.e) maskenin şeffaf kısımları altındaki ışığa duyarlı polimer çözünerek çözelti haline geçer. Bu kabartma pozitif fotorezist olarak bilinir. (negatif fotorezist te şekil ters yönde oluşmaktadır). Levha ile maske ayrılarak çözelti ortamdan uzaklaştırılır (şekil 2.4.f). Şekil aktarılmasında uygulanan diğer bir yöntem ise “Soft litografi” dir [40,41].



Şekil 2.4. Fotolitografi ile hazırlanan örneğin transferi

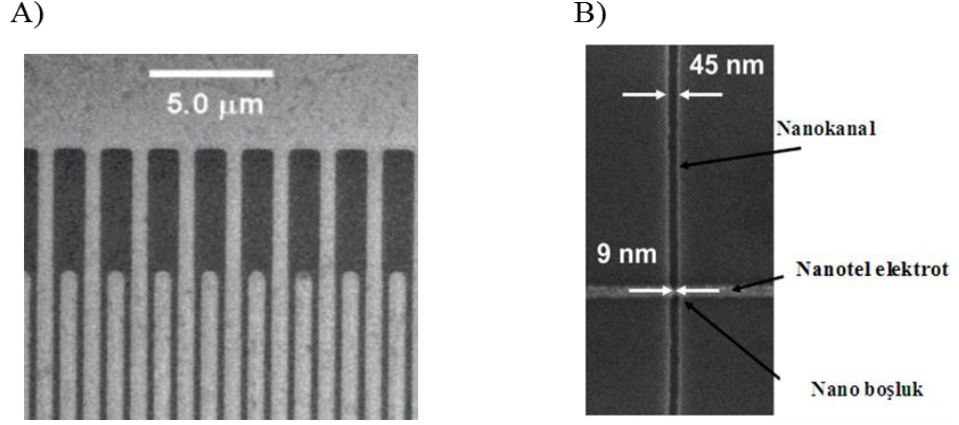
İşlem, yaş (sıvı kimyasal maddelerle) veya kuru (gaz fazındaki kimyasal maddelerle) olmak üzere ikiye ayrılır. Heriki yöntem de izotropik veya anizotropik işleme gerçekleştirilir. Şekil oyma izotropik işlem ile eşit olarak tüm yönlerde gerçekleştirilirken (Şekil 2.5 sol), anizotropik işleme sadece tek yönde gerçekleşmektedir (Şekil 2.5 orta ve sağ). Etching malzemesi olarak silikon (hem yaş hem kuru yöntem uygulanabilir), cam (akışkanalları yapmak için genellikle yaş yöntem uygulanır) ve plastikler kullanılmaktadır [31].



Şekil 2.5. İzotropik (sol) ve anizotropik (orta ve sağ) aşındırma [31]

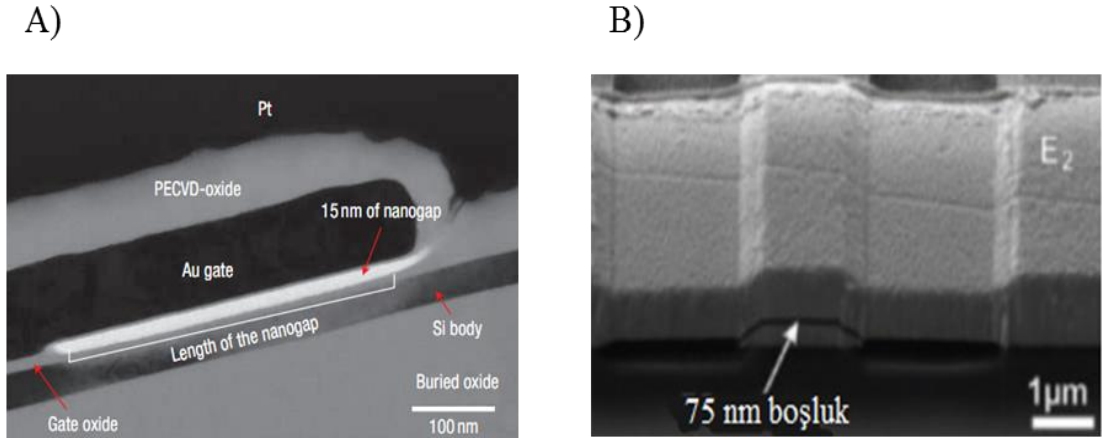
2.4. Nanoaralık Temelli Kapasitif Biyosensörler

Nano aralık, sağladığı minimum örnek hacmi ve düzgün elektrik alan sayesinde çok az miktardaki hedef moleküllerini hassas bir şekilde algılama yeteneğine sahiptir. Çeşitli üretim tekniklerine dayalı olarak çok sayıda aygıt, nano aralık literatüründe de rapor edilmiştir [42]. Bu aygıtlar yatay veya dikey nano aralıklı aygıtlar olarak kategorize edilebilir (Şekil 2.6' da a ve b).



Şekil 2.6. Yatay nano aralıklı aygıtlar a ve b literatürdeki bazı yatay aygıtlar [43,44]

Dikey nano aralıklı aygıtlar, dikey olarak tasarlanmış elektrotlar ile oluşturulmaktadır (Şekil 2.7.A). Bu tür sensörler genellikle elektrotlar arasında nanometre boyutunda yükseklik içerecek şekilde [45], daha sonra kısmen aşındırılacak olan katmanlar içerecek şekilde oluşturulmaktadır [46,47]. Bu tür aygıtların en önemli avantajı, düşük maliyetli oluşudur. Bu teknikler, düşük maliyetinin yanısıra iyi bir kalınlık, düzgün bir yapı, ve kontrol edilebilir bir fabrikasyon işlemi sunmaktadır.



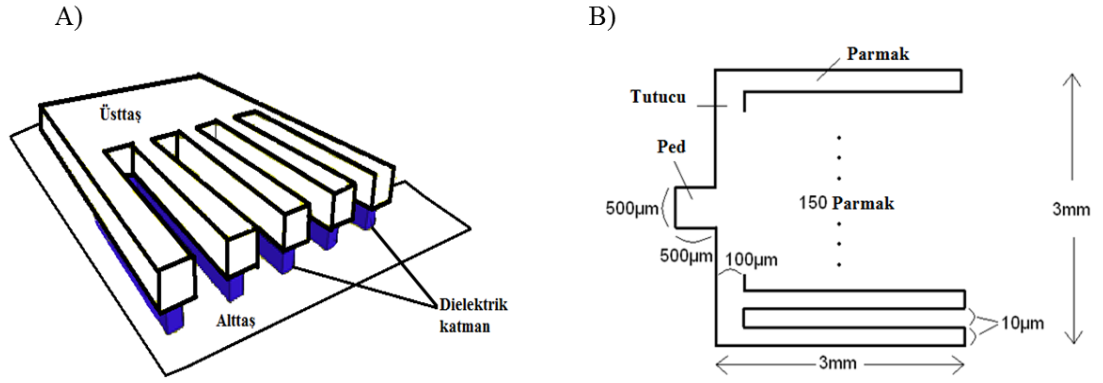
Şekil 2.7. Dikey nano aralıklı aygıtlar a ve b literatürdeki bazı dikey nano aralıklı aygıtlar [47,48]

Yatay aygıtlar, litografi veya kimyasal depolama gibi yöntemlerle üretilmektedirler fakat bu yapılar yüksek verim sağlayamazlar. Ama bakteri gibi mikron ölçeğindeki hedefleri algılanması için standart optik litografiden yararlanılabilir. İyonlar için relaksasyon frekansı saflaştırılmış su içerisinde 280 kHz civarındadır [49,50]. Bu durumda yüksek frekans parazitik etkileri ortaya çıkar ve yüksek maliyetli ölçüm araçları gerekmektedir.

Gölge buharlaştırma tekniği, çözünürlüğü arttırmak için örneği eğer, litografiyi kullanmaktadır [43]. Ancak yüksek verimli üretim için uygun değildir. Elektron demeti litografisi, nanoboyutta aralık oluşturmak için bir alternatif sunmaktadır, ancak yüksek fabrikasyon maliyeti ve aygıt başına uzun fabrikasyon süresi gibi dezavantajları da beraberinde getirmektedir [51]. Elektrokimyasal depolama yöntemi de nano aralık formasyonu sağlama olanağı sunmaktadır. Fakat iyi tanımlanmış desenler elde etmek zor olmaktadır [44].

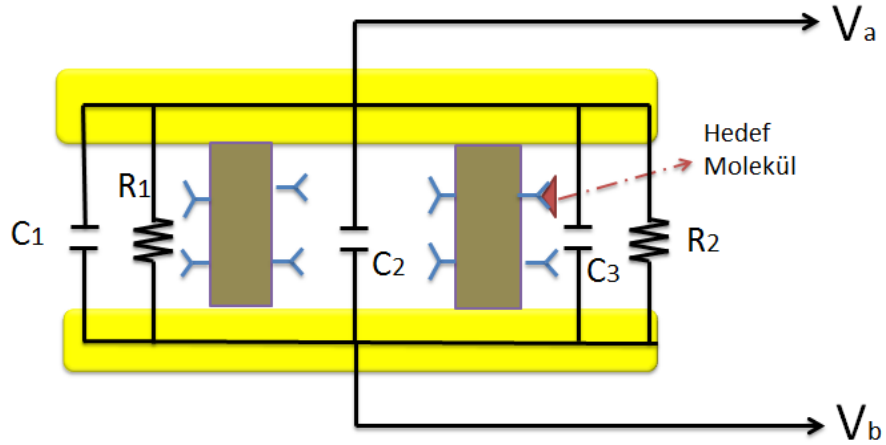
2.5. SENSÖR TASARIMI

Bu tez çalışmasında yapılan sensörün tasarımı, Şekil 2.7' de gösterilmiş olup çalışma prensibi, biyolojik numunenin sensör üzerine eklenmesi ile oluşan direnç değişimini tesbit etmektir. Algılanması istenen elemanlar, dielektrik malzemenin bulunduğu bölgeye yerleştirilmiştir. Buradaki dielektrik katman, iki elektrotu birbirinden ayırmak için ve algılanacak moleküller için tutucu görevini üstlenir. Ölçümler saflaştırılmış su içerisinde yapılmaktadır. Hedef moleküller dielektrik bölgeye ulaştığında suyun yerini alarak, aralıklı bölgenin dielektrik sabitini değiştirirler. Bu nedenle impedansa ve direnç' te değişikliğe neden olur. Saf su, yüksek debye uzunluğu sunmaktadır. Böylece nano boşluğun her yerinde düzgün bir elektrik alanı oluşturulmaktadır. Elektrotların boyutları nano elektrotlar arasındaki mesafeye nazaran çok büyük olduğu için saçak alan etkisi ihmal edilmiştir. Şekil 2.8.a' da tasarlanan sensörün parmak kısımlarının önden kesit şekli görülmektedir. Şekil 2.8.b' de tasarlanan sensörlerin boyutları görülmektedir [49].



Şekil 2.8. Tasarlanan sensörün görünümü ve çalışma prensibi. a) parmakların önden kesit görünümü, b) tasarlanan sensörlerin boyutlarının gösterimi [48]

Biyosensörün yapısı şekil 2.9’ da devre elemanları ile gösterilmiştir. Şekil 2.9’ da Nano aralıklı biyosensörün paralel kapasitörleri, (C_1 , C_2 ve C_3) ve direnç (R_1 ve R_2) ile modellenmesi gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Biyosensörlerin devre elemanları ile gösterimi

Şekil 2.9’ daki sensör modellenmesiyle ilgili iki tane eşitlik vardır.

$$C_p = C_1 // C_2 // C_3 = C_1 + C_2 + C_3 \quad (2.4)$$

$$R_p = R_1 // R_2 = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2} \quad (2.5)$$

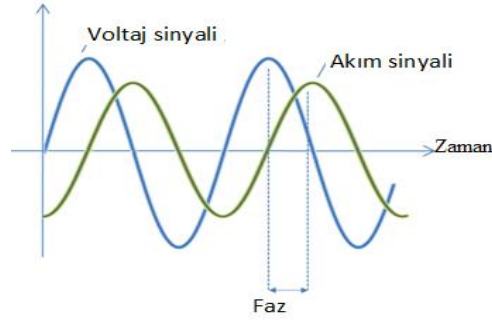
2.6. Reseptör Yakalanması

Antikorlar 1950' li yıllardan itibaren tanıda kullanılmaya başlanmış, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü kanıtlanmış biyoreseptör moleküllerdir. Antikorlar tüm bir mikroorganizmayı tanıyabilecekleri gibi onlara ait toksinleri, sporları, enzimleri hatta peptid parçalarını tanıyabilirler. Kullanım amaçlarına bağlı olarak, antikorların çeşitli şekillerde modifiye edilebilmeleri önemli avantajlarındadır. Biyoaktif bileşen ile iletici unsurun birleşiminde farklı immobilizasyon yöntemleri kullanılabilir. Temel iletici için fiziksel olarak jel içerisinde veya polimer bir matrikste tutuklanabilir.

2.7. Biyosensör Uygulamaları İçin Empedans Spektroskopisi

Empedans spektroskopisi, ilgilenilen sistemin karakterizasyonunda kullanılan elektriksel temelli bir tekniktir. Empedans spektroskopisinin pek çok yönden avantajları vardır. Bunlardan bazıları, özgünlük, düşük maliyet, düşük güç gereksinimi, boyutta küçüklük ve kolay adapte edilebilirliktir [27]. Fakat iyonik solüsyonlarda, empedans spektroskopisi, elektriksel çift katmanı adı verilen bir yük perdelemesi ile engellenir. Bu perdeleme empedans ölçümlerini etkilemektedir ve kapasitans artışına sebep olmaktadır. Bu perdelemenin önüne geçebilmek için nano aralıklı biyosensörler üretmek gerekmektedir.

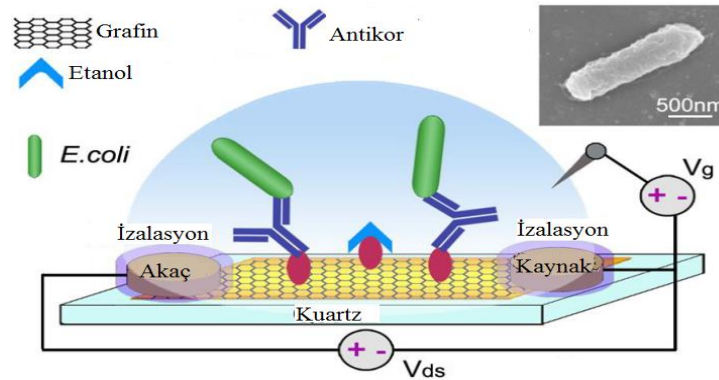
Empedans spektroskopisi, impedimetrik tepkilerle ilgilenir. Bu tepki, örneğin elektrik geçirgenliğine ve direncine bağlıdır. Şekil 2.10' da örneğe uygulanan voltaj ve akımın gösterimi, V ve I akım ve voltajın büyüklüğü, ϕ ise aradaki faz farkıdır. V ve I büyüklükleri ve aradaki faz farkı ölçülebilir.



Şekil 2.10. Voltaj-akım sinyali grafiği

2.8. Biyosensörlerle İlgili Yapılan Çalışma “Graphene Based Biosensors For Detection Of Bacteria And Their Metabolic Activities”

Huang ve arkadaşlarının (2011)’ de belirttiği üzere, Grafin’ in sahip olduğu olağan üstü elektriksel, fiziksel ve optiksel özellikleri sayesinde biyosensör uygulamaları ve çalışmaları için önemli bir potansiyele sahiptir. Bu çalışma içerisinde, Grafin temel üzerine oluşturulan bir biyosensörün E.Coli bakterisi için elektriksel olarak yüksek hassasiyet ve seçicilik ile algılandığını gösterilmiştir. Büyük ebatlı grafin film tabakası kimyasal buhar biriktirme (CVD) yöntemi ile büyütülmüştür. Şekil 2.11’ de grafin tabanlı bir biyosensörün tasarımı görülmektedir [53].



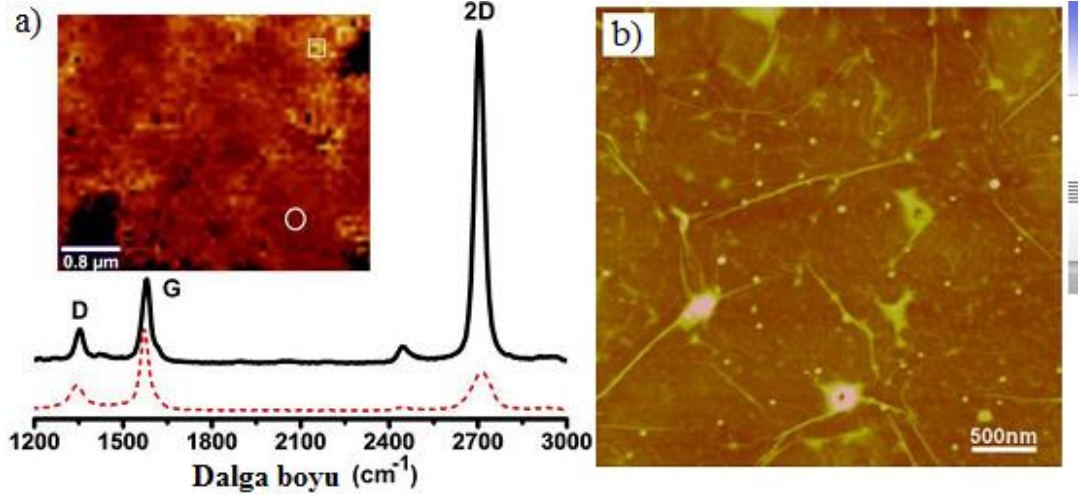
Şekil 2.11. E.coli ve glukoz algılanması için grafin temelli nanoelektronik biyosensör [53]

Grafın ile üretilmiş biyosensör ortam içerisinde bulunan diğer bakterilerin yüksek yoğunluğundan etkilenmemesine rağmen 10 cfu/mL kadar düşük bir konsantrasyona sahip E.coli bakterisini algılayarak iletkenlikteki değişim gözlenmiştir. Buna ek olarak; Bu biyosensör gerçek zamanlı olarak E.coli'nin metabolik faaliyetleri sonucu glukoz oranındaki farkı algılanmasında kullanıldı. Basit, hızlı, hassas ve etiketsiz özelliklerine sahip biyosensörler hastalık yapan bakterilerin algılanması ve fonksiyonel çalışmalar için veya bakteriyal ilaçların gözlenmesi için önemli bir platform ortamı sağlayabilir [53].

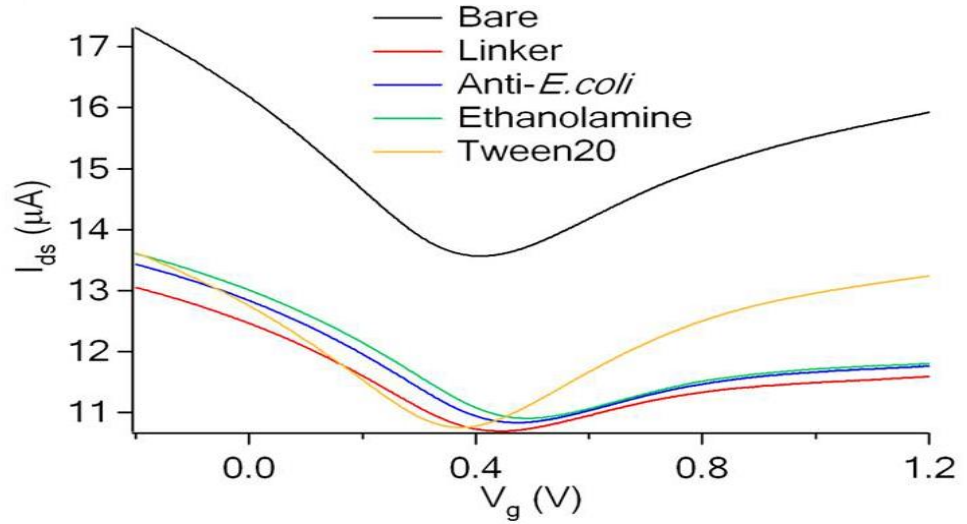
Kimyasal buhar biriktirme yöntemiyle bakır folyolar üzerinde büyük ölçekte grafın tabakaları büyütülmüştür. Bakır folyolar saf Ar (1000 sccm) ile 10 dk temizlendikten sonra fırına yerleştirildi. 900 °C fırın içerisinde etanol ile birlikte gaz karışımı (%20 H₂; 40 sccm), H₂ ve Ar gönderilerek kimyasal buhar biriktirme (CVD) de grafın tabakası büyütülmeye başlanır. Grafın büyütüldükten sonra H₂/Ar atmosferi içerisinde 30 dk soğutma işlemine bırakıldı. Bakır folyolar üzerine grafın filmin büyütülmesi klorobenzen içerisinde çözünmüş polimetil metakrilat (PMMA)'nın ince bir tabaka halinde spin işleminden geçirildikten sonra 180 °C' de bir dakika boyunca tavlannmıştır. PMMA/Grafın film ardından kimyasal temizleme yöntemi ile bakır folyodan ayrılmıştır. Daha sonra aseton ile PMMA çözülür. DI su ile örneğin durulama işlemi yapılır ve 20 dakika boyunca H₂/Ar atmosferinde grafın tavlannır. Son işlem olarak iki elektrod grafın film (2x4 mm²) üzerine yerleştirilir [53].

Elde edilen Grafın 2 saat oda sıcaklığında dimetil formadit (DFM) 5mM içerisinde moleküler bağ yapması sağlanır. Sonra 4°C' de gece boyunca Na₂CO₃/NaHCO₃ (pH 9,0) solusyonu içerisinde 50 ppm Anti E.coli ve K antikorları eklendi. Ardından sistem 0.1 M etanolamin (pH 9) ile 1 saat süresinde bağlayıcı moleküller ile diğer moleküller etkileşime girmemiştir. Grafın yüzeyinin morfolojisi Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Dimension 3100, veeco) ile tarandı. Raman spektroskopisinde 488nm dalga boylu lazer kullanılarak veriler elde edildi. Şekil 2.12' de bu veriler gösterilmiştir [53]. Deney boyunca yapılan ölçümler Agilent B1500A cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Grafın sensör 100mV' da sapma eğilimi göstermektedir. Kapı voltajı (V_g) grafenin üzerinde PBS solusyonu içerisinde Ag/AgCl elektrodlar kullanılarak uygulanmıştır [53]. Şekil 2.13' de Ethanol, Anti E.coli, Tween 20'nin sensör üzerine eklenmesi ile değişen iletkenlik miktarı

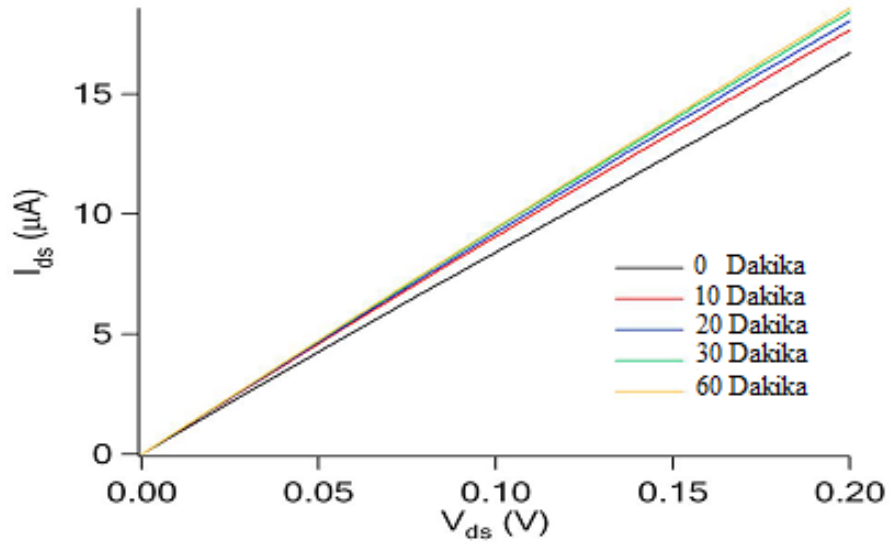
gösterilmiştir. Şekil 2.14' de Farklı pH değerlerine sahip çözeltiler 10, 20, 30 ve 60 dakika boyunca ölçüm alınıp akım/voltaj grafiği elde edilmiştir.



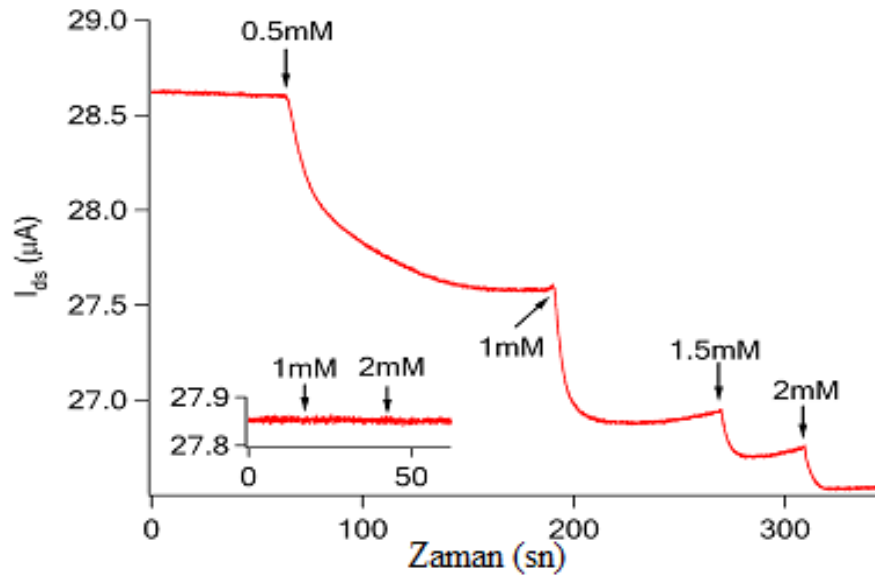
Şekil 2.12. a) Grafin film tabakasının Raman ve Spectrum sonucu. Ölçek = 0.8 µm.
b) Grafin filmin Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) resmi.[53]



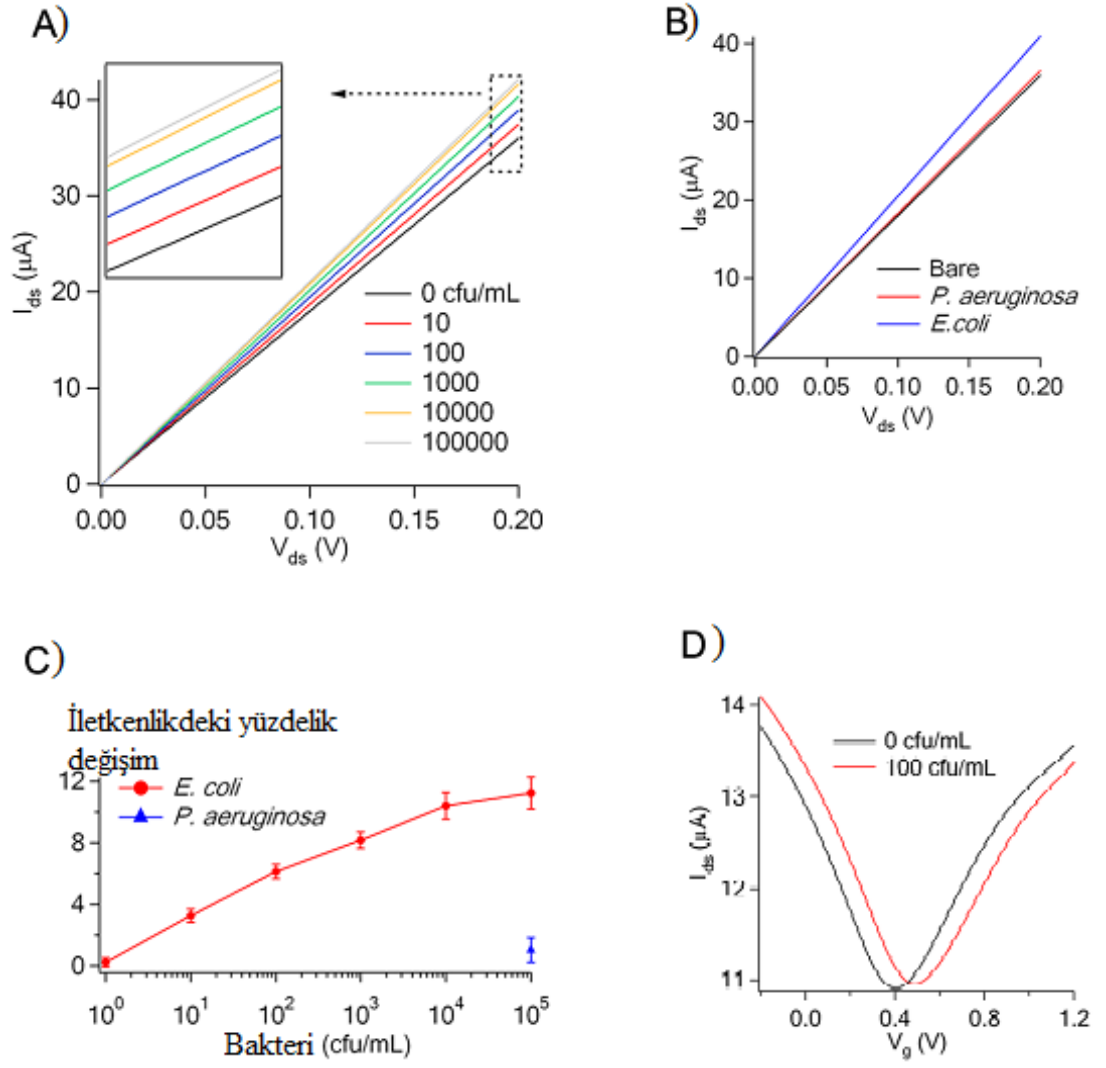
Şekil 2.13. Vds= 100mV'da Ethanol, Anti E.coli, Tween 20'nin sisteme eklenmesi ile değişen Ids/Vg grafiği [53]



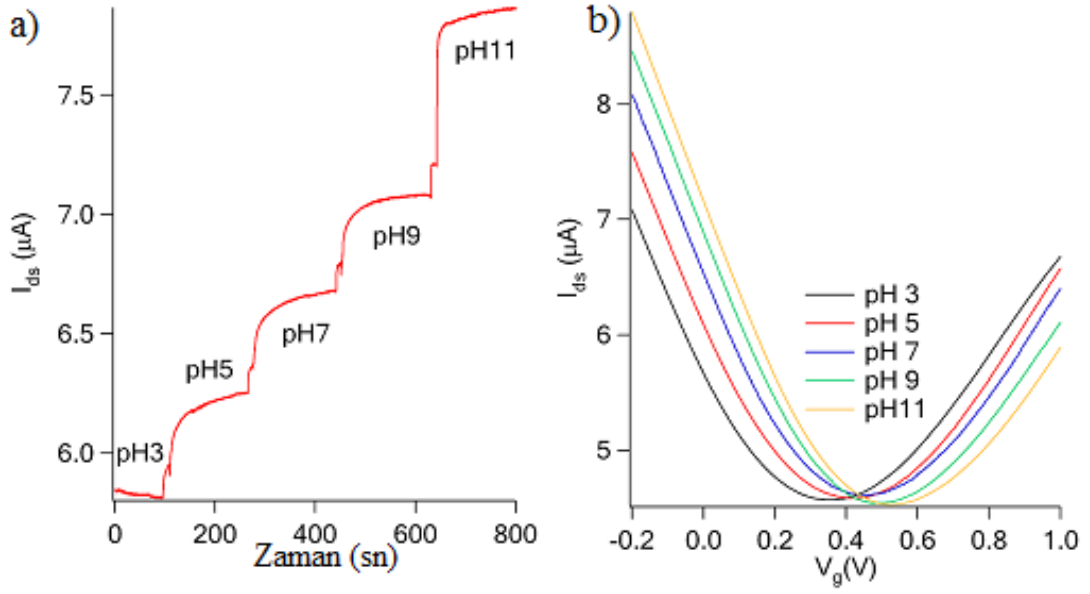
Şekil 2.14. Farklı pH değerleri (pH 3, 5, 7, 9 ve 11) ile tampon çözelti içerisindeki grafen-FET I/V grafiği. $V_{ds}=100\text{mV}$, $V_g=0\text{V}$. Burada elde edilen veriler üç cihazdan alınan verilerin ortalamasıdır ve hata sapması, standart sapmalar içerisinde [53]



Şekil 2.15. E.coli'nin grafen yüzeye tutuklanması ile gerçek zamanlı iletkenlik ölçümü [53]



Şekil 2.16. A) Farklı konsantrasyonlardaki *E. coli*' nin grafın üzerine eklenmesiyle elde edilen I_{ds}/V_{ds} grafiği ($V_g=0$). B) *E. coli* ile birlikte *P. aeruginosa* bakterilerinin grafın üzerine eklenmesi (100000 cfu/mL) ile elde edilen I_{ds}/V_{ds} grafiği. C) Farklı konsantrasyonlardaki *E. coli* ve *P. aeruginosa* tarafından iletkenlik değişimindeki yüzdelik oran. Deneylerdeki her bir veri altı cihazın ölçümünün ortalaması alınarak elde edilmiştir. D) Grafın-FET üzerine Antikor eklenmesinden önce ve *E. coli* (100 cfu/mL, $V_{ds}=100V$) eklenmesinden sonra akım voltaj grafiği [53]



Şekil 2.17. a) Çözeltiler farklı pH değerlerinde (pH 3,5,7,9 ve 11) uygulandığında elde edilen eş zamanlı verilerin akım-zaman grafiği $V_{ds}=100\text{mV}$, $V_g=0$ ve iletkendeki yüzdelik değişimi gösteren grafik. b) Farklı pH değerlerinde (pH 3, 5, 7, 9 ve 11) grafin sensörün transfer eğrileri gösterilmiştir. ($V_{ds}=100\text{mV}$, $V_g=0$ V) ilave: Her bir data için üç cihazdan alınan ölçümlerin ortalaması kullanılmıştır. Hata sapması standart sapma içerisinde [53]

E.coli bakterisinin algılanması için hızlı, etiketsiz, yüksek hassasiyet ve seçici özelliklere sahip grafin temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. Grafin sensör 10 cfu/mL gibi düşük konsantrasyonda algılama hassasiyetine sahiptir. İki boyutta grafin üzerine nanoelektronik biyosensörler, bakterilerin metabolik aktivitelerinin algılanmasını sağlar ve diğer fonksiyonel çalışmalarda kullanılmasını veya antibakteriyal ilaçların gözlenmesi için gerçek zamanda ölçüm yapabilmeyi mümkün kılmıştır [53].

3.ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. SENSÖR TASARIMI

TÜBİTAK 112M944 numaralı proje kapsamında yapılan çalışmamızda biyosensörün üretimini gerçekleştirmek için sırası ile Termal Buharlaştırma Sistemi, Plazma ile Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar depolama (PECVD) ve Fotolitografi yöntemi kullanılmıştır. Bu teknikler bölüm 2’de anlatılmıştır. Kısaca özetleyecek olursak;

i. Termal Buharlaştırma Sistemi:

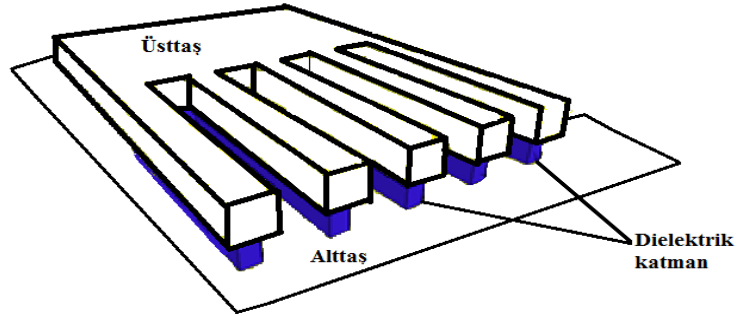
Metal kaplama yöntemleri arasında en çok tercih edilen yöntem Isısal buharlaştırma yöntemidir. Bu işlem katı bir metalin ısıtılması ile buharlaştırılarak, serin bir yüzey üzerinde biriktirilmesi işlemidir. Bu yöntemin dezavantajı yüzey üzerinde istenmeyen pürüzlülük oluşmasıdır. Altlık tabaka kaplama esnasında sabit hızda döndürülerek yüzey üzerine malzemenin eşit dağılımı sağlanabilmektedir. Tez çalışmasında metal kaplama işlemlerinin tamamında Vaksis PVD Vapor – 3S Isısal buharlaştırma sistemi ve kaplama cihazı kullanılmıştır.

ii. Plazma ile Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar depolama (PECVD):

Plazma biriktirme sistemi temelde, içerisinde plazmanın elde edildiği reaktör, birbirine paralel disk şeklinde iki elektrot, gazların bileşenlerine ayrılması için radyo frekanslı gerilim uygulayan RF jeneratörü, reaktöre kontrollü bir şekilde gaz akışını sağlayan iğne vana, akış ölçer ve düzenleyicilerin olduğu gaz girişleri ile çıkıştaki mekanik vakum pompasından oluşmaktadır. PECVD tekniğinin diğer yöntemlere göre en önemli özelliği kaplanacak malzemeyi yüksek sıcaklığa çıkarmadan kaplamaya olanak sağlar fakat film kalitesinde (homojenlik, yoğunluk) problemi ortaya çıkmaktadır.

iii. Fotolitografi:

Fotolitografi üretilecek kalıbın tasarımcı tarafından bir bilgisayar programı kullanarak materyal üzerine aktarılmasında kullanılan bir tekniktir. Bunun için bilgisayar programı ile çizilen örnek maske üzerine aktarılır. Maske hazırlandıktan sonra altlık, ışığa duyarlı organik bir polimerle kaplandığı zaman kalıp aktarılması başlar. Altlık ile maske birleştirilir. UV ışık maske içinden ışığa duyarlı organik polimer üzerine gönderildiğinde, maskenin şeffaf kısımları altındaki ışığa duyarlı polimer çözünerek çözelti haline geçer. Bu kabartma şekli pozitif fotorezist olarak bilinir. Bu yapıdan tasarlanan sensörün görünümü aşağıda Şekil 3.1’ de görülmektedir. Parmak şeklinde dizilmiş birçok biyosensör ile algılayıcı aygıt oluşturulur. Oluşturulan biyosensörün kapasitansın değişimi hesaplanır veya elektronik aletlerle ölçümü yapılır.



Şekil 3.1. Tasarlanan sensörün temsili görünümü

3.2. Altlık ve Yüzey Hazırlığı:

Fabrikasyonda altlık olarak, silikon, kuartz veya pyrex malzemelerinden birisi kullanılabilir. Bu proje çalışmamızda alt ve üst elektrotlar altın tabaka olarak büyütülmüştür. Altın seçilmesinin iki önemli nedeni vardır. Birincisi yüksek iletkenliğinden dolayı, ikincisi ise altının oksitlenme yapmamasıdır. Fabrikasyona başlamadan önce, yüzey temizliği büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple, aseton

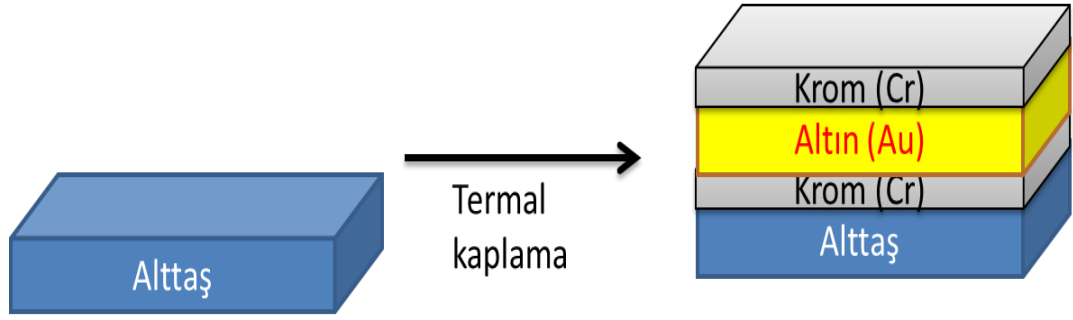
$((\text{CH}_3)_2\text{CO})$, metanol ve izopropil alkol $((\text{CH}_3)_2\text{CHOH})$ içerisinde silikon altlık 5 dakika ultrasonik titreşime tabi tutulur. Ardından damıtılmış (DI) su ile yüzeyin temizliği sağlanır. Islak olan silikon yüzey Azot gazı kullanılarak kurutulur. Bu temizleme işlemiyle silikon alttaş fabrikasyondan önce güvenilir hale gelir. Şekil 3.2’ de lift-off yöntemi ile alt yüzeyin hazırlandığı cihaz gösterilmiştir [54].



Şekil 3.2. Lift-off yönteminin uygulandığı tezgah

3.3. Alt Elektrodun Büyütülmesi

Alt elektrodun büyütülmesi için ısısal buharlaştırma (VAKSIS, PVD Vapor–3S Thermal) cihazı kullanılmıştır. Alt elektrodun büyütülmesinde malzeme olarak altın kullanıldı. Altın önceden de söylediğimiz gibi altının iletkenliği yüksektir ve altın havaya maruz kaldığı zaman oksitlenme yapmaz. Oksitlenme, kararlılık ve tekrarlanabilirlik gibi analiz sonuçlarını olumsuz yönde etkiler. Yüksek vakum altında 100 nm kalınlığında altın kaplanmıştır. Altının üst ve alt tabakalara iyi yapışması için altına ve üstüne 10 nm kalınlığında krom kaplanmıştır. Şekil 3.3’ de alt elektrodun büyütülme aşaması gösterilmiştir [54].



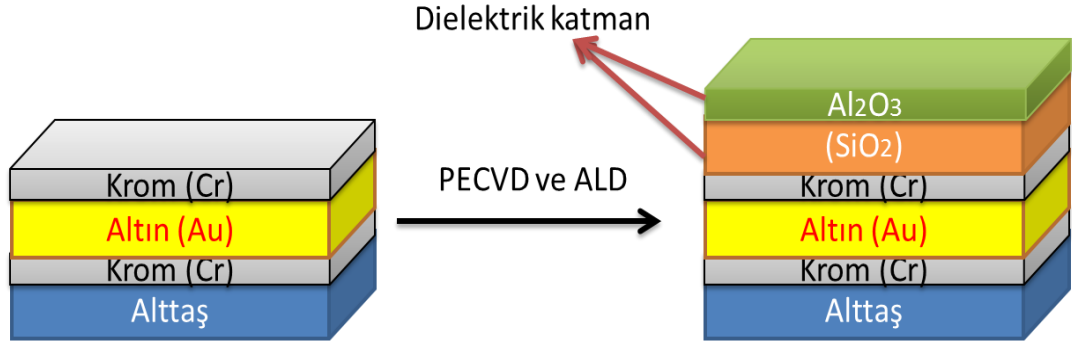
Şekil 3.3. Isısal buharlaştırma yöntemi ile alt elektrodun büyütülmesi aşaması

Buharlaşma hava molekülleriyle çarpıştığında altlığa ulaşmadan saçılmaya uğrayabileceği için, buharlaştırma ve kaplama işlemi yüksek vakum altında yapılmaktadır. (10^{-6} torr). Yüksek vakumda buharlaştırma öncesi ısısal buharlaştırma ile kaplama cihazının kazanında temizlik işlemleri yapılır. Kazan temizlendikten sonra kaplama malzemeleri altın ve krom, buharlaşma sürecinde bir kaç yüz santigrad dereceye kadar teknelere yerleştirildi. Arkasından vakum pompası çalıştırılarak, uygun vakum değerine ulaşması beklendi. Malzeme kaplama hızı $0,5 \text{ \AA} / \text{s}$ olarak ayarlandı ve kaplama başlatıldığında altlık belirli sabit bir rotasyonla döndürülerek, her yere eşit oranda kaplama yapılması sağlandı [54].

3.4. Dielektrik Katmanların Büyütülmesi

Sağlıklı ölçümler alabilmek için ve çalışan aygıt sayısının yüksek olması için dielektrik katmanın kaliteli olması gerekir ve sızıntı akımlarının oluşmaması istenir. Bu nedenle SiO_2 katmanının üzerine sızıntı akımlarını engellemesi amacıyla çok ince (21 nm) Al_2O_3 kaplaması yapılmıştır. SiO_2 , kimyasal plazma buhar biriktirme yöntemi (PECVD) tekniği ile kaplanmıştır. Bu kaplama için UNAM'da bulunan PECVD sistemi kullanılmıştır. Kaplama kalınlığı elipsometre (J. A. Woolam V-VASE) ile ölçülmüştür [54]. Kaplanan kalınlık orta kısım yaklaşık, 168 nm, kenar kısımlarda ise 340 nm olarak ölçülmüştür. Bu düzensizlik sebebiyle altlık üzerinde üretilen cihazların hepsinin aynı özellikte olması sağlanamamıştır. Ayrıca sızıntı

akımı gibi problemlerin çözülmesi için çok ince bir Al_2O_3 katmanı biriktirmeyi gerektirmektedir. Bu katman atomik katman biriktirme tekniği (ALD) ile büyütülmüştür. Şekil 3.4' de Al_2O_3 katmanı, ALD sistemi ile (Cambridge Nanotech, Savannah 100) $250^\circ C$ ' de büyütülmüştür.



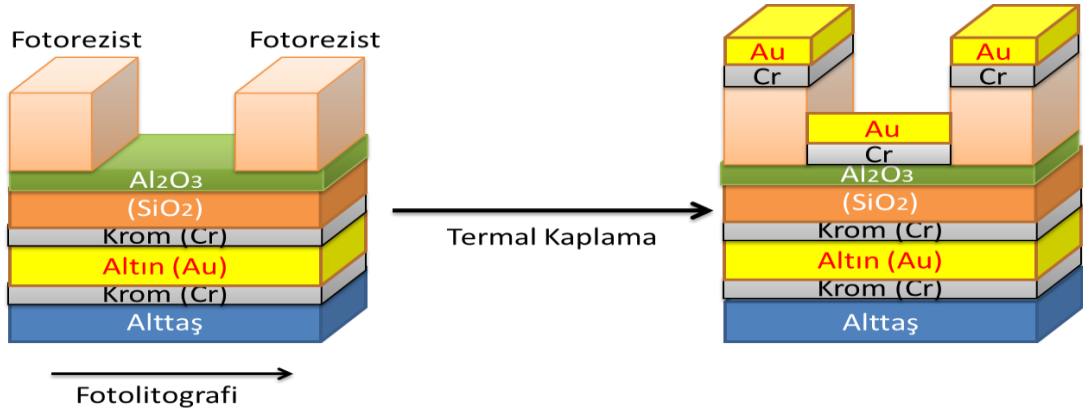
Şekil 3.4. Dielektrik katmanların büyütülmesi aşaması

3.5. Üst Elektrodun Desenlendirilmesi

Üst elektrodu kaplanmasına başlanmadan önce, istenen tasarımı aktarmak için fotolitografi işlemi gerekir. Fotorezist fotolitografi işleminin en önemli elemanıdır. Fotolitografi, $110^\circ C$ sıcak plaka üzerinde malzemenin 5 dk. bekletilerek, yüzeydeki nemlerden arındırılması işlemiyle başlar. Fotorezistin yüzeye iyi yapışmasını sağlamak için HMDS (heksametildisilazan) 40 saniye boyunca dakikada 5000 tur dönme hızıyla yüzey üzerine kaplanır. Fotorezist, 50 saniye boyunca dakikada 5000 tur dönme hızıyla $1,3\mu m$ kalınlığında kaplanmıştır. Bu işlem sonrasında malzeme developer'a maruz bırakılarak, istenmeyen bölgelerin çözeltiye karışması sağlanarak, istenen desenin altlık üzerinde kalması sağlanır. Burada developer içerisinde kalma süresi çok önemlidir uzun süre bekletildiğinde yüzeydeki ince parmaklar havada asılı kalmaktadır, kısa sürede ise desen tam olarak elde edilememektedir.

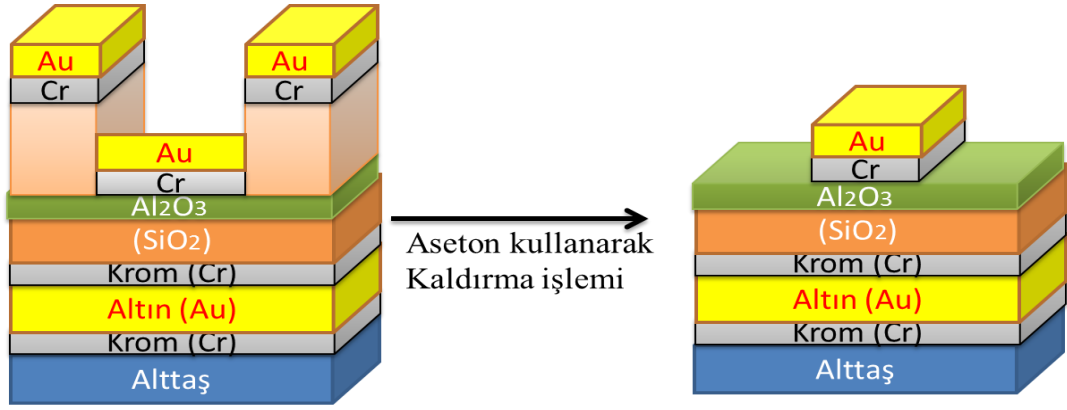
3.6. Üst elektrodun Kaplanması ve Kaldırma İşlemi (lift-off)

Üst elektrodun büyütülmesi ısısal buharlaştırma tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önce 10 nm krom ve ardından 120 nm altın büyütülerek kaplama işlemi sonlandırılmıştır. Şekil 3.5’ de Isısal buharlaştırma yöntemi kullanılarak üst elektrodun kaplanması gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Isısal buharlaştırma yöntemi ile üst elektrodun kaplanma şekli

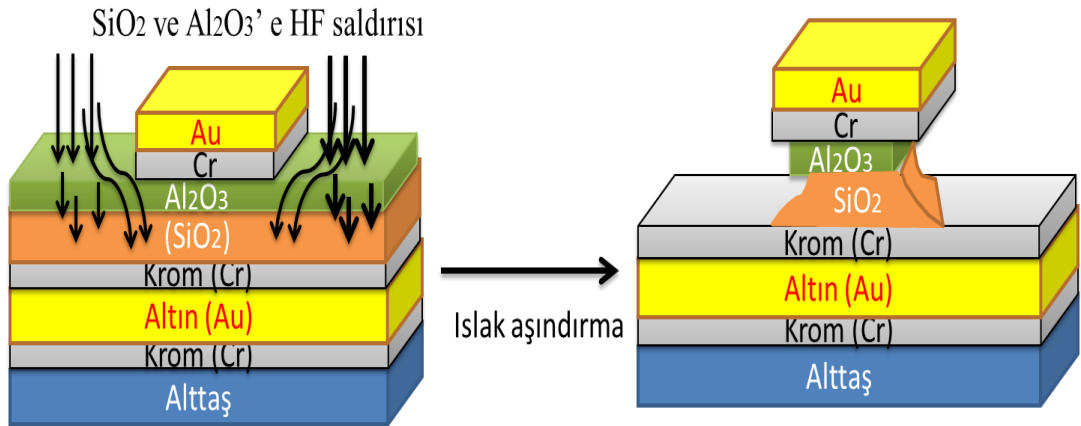
Buharlaştırma ile metal kaplamada istenmeyen kısımlardan kurtulmak için asetonun (CH₃)₂CO) içerisinde bekletilir. Bu işlem birkaç saat sürer. Asetonun kaldırma işleminin daha iyi yapabilmesi için kısa süreli ultrasonik titreşim kullanılabilir. Bu işlemden sonra desenli üst elektrot elde edilir. Şekil 3.6’ da termal kaplama sonrasında sensörün görünümü.



Şekil 3.6. Kaldırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli

3.7. Nano Aralık Oluşturma

Nano aralık oluşturmak için ıslak aşındırma uygulanmıştır. Bu süreçte 70:1 oranında seyreltilmiş Hidroflorik asit (HF) kullanılmıştır. HF altını aşındıramadığı için üst elektrot bir maske gibi davranır. Şekil 3.7’ de sensörün aşındırma süreci gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Islak aşındırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli

Islak aşındırma işleminde aşındırma süresi çok önemlidir. Aşındırma kısa süreler halinde yapılarak kapasitans ölçümleri ile yatay aşınma miktarı kontrol altında tutularak yapılmıştır.

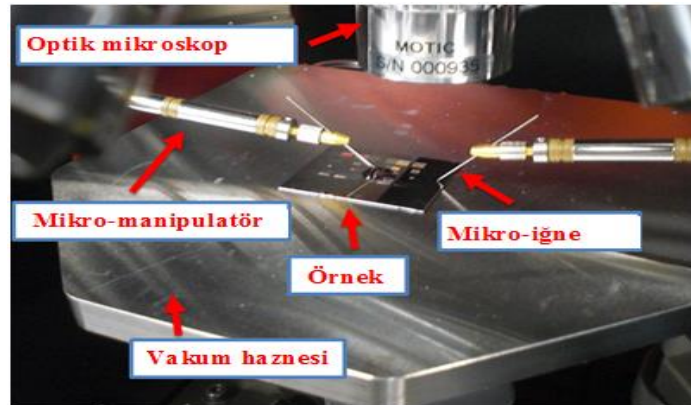
3.8. Ölçüm Sistemi

Üretilen biyosensörlerin direnç ölçümleri UNAM temiz odada yapılmıştır. Direnç ölçümleri için düşük frekanslı ve yüksek frekanslı ölçümler yapabilen bir parametre analizörü (Keithley 4200-SCS with 4200-CVU) ve prob istasyonu (Cascade PM-5) kullanılmıştır. Şekil 3.8’ de SPA (Semiconductor parameter analyzer) cihazı görülmektedir.



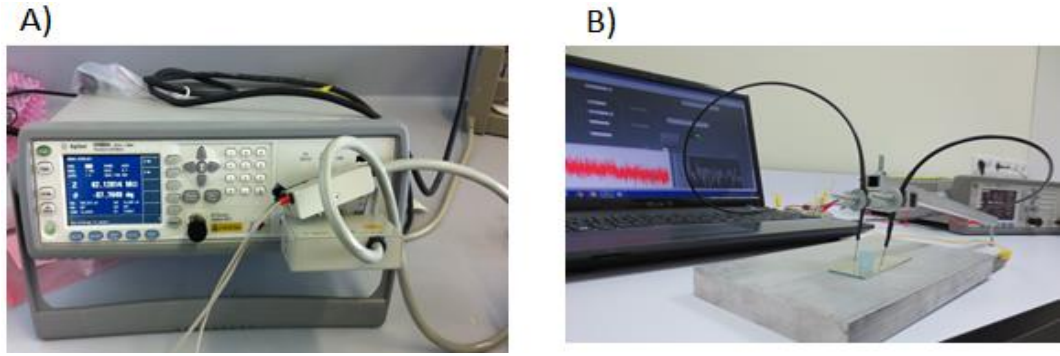
Şekil 3.8. UNAM temiz odada bulunan parametre analizörü ve prob istasyonu

Üretilen nanosensör, prob istasyonunun vakum haznesine yerleştirildi, mikro iğne uçları yardımıyla üst ve alt elektrotlardan bağlantı alındı (Şekil 3.9).



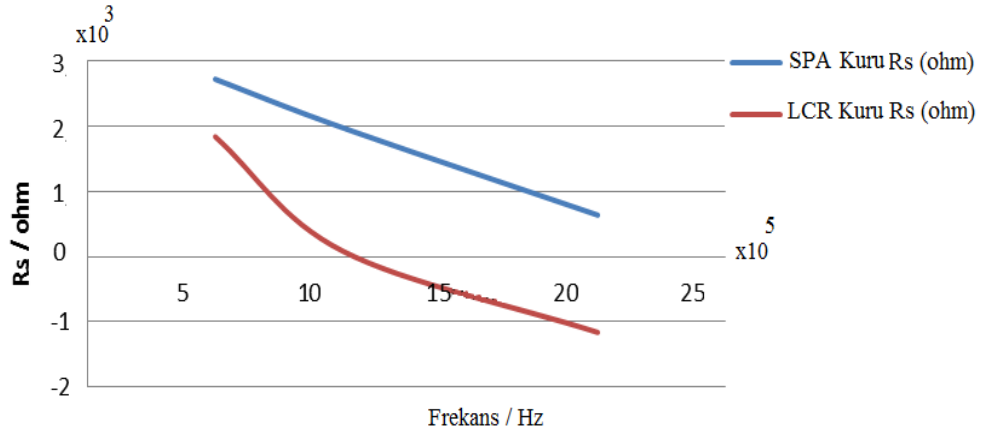
Şekil 3.9. Vakum haznesindeki örneğin mikro-iğneler kullanarak elektriksel ölçümler için bağlantı alınmış durumundaki görünümü

Kendi deney istasyonumuzu, cihazların yaymış olduğu elektromanyetik dalgaların ölçümlerimizi etkilememesi için RG174 koaksiyel kablo ve BRC uç kullanarak kurduk. Şekil 3.9' da kurduğumuz prob istasyonu görölmektedir. Kurduğumuz prob istasyonunda LCR metre kullanılmıştır. LCR metre (RLC metre), alıcı olarak görev yapan direnç, bobin ve kondansatörün; direnç, endüktans ve kapasite değerlerini ölçen ölçü aletleridir. Güvenlik kriterlerine sahiptir ve doğruluk payı çok yüksektir.

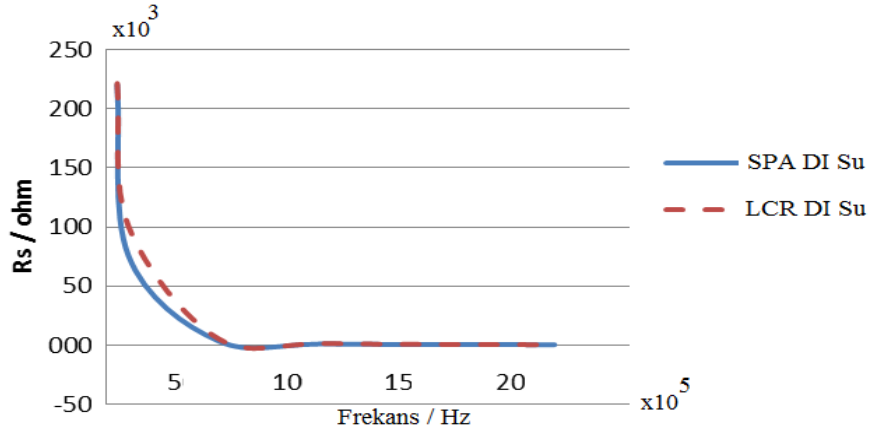


Şekil 3.10. a) LCR metre cihazı, b) Yaptığımız prob istasyonu

Üretilen sensörler ile deneylere başlamadan önce parametre analizörü ve prob istasyonu ile kendi imkânlarımızla kurduğumuz prob istasyonunda LCR metre kullanarak alınan verileri karşılaştırdık. SPA ve LCR ile alınan ölçüm sonuçları Şekil 3.11 ve Şekil 3.12' de gösterilmiştir. Sensörler üzerine örnek eklenmeden kuru halde ölçüm yaptığımızda SPA ve LCR'den alınan direnç değerlerinin uyuşmadığı görölmüştür. DI su ile yapılan ölçümlerde ise SPA ve LCR metre cihazlarından alınan değerler yaklaşık olarak birbirine eşittir (Şekil 3.12).

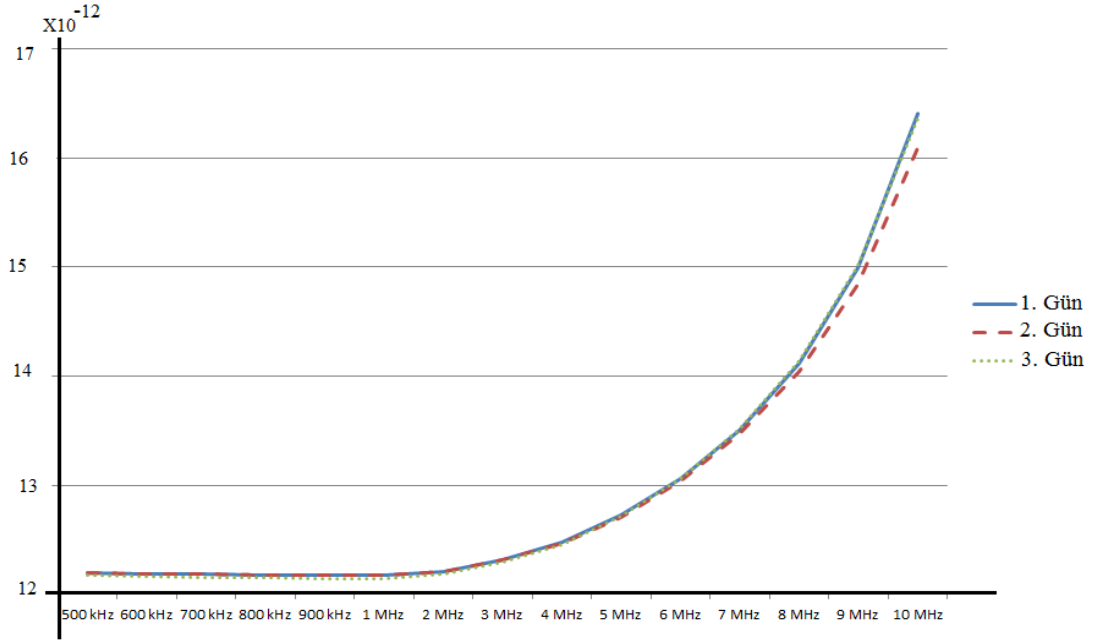


Şekil 3.11. Sensörün SPA ve LCR ile alınan ölçümlerin karşılaştırılması



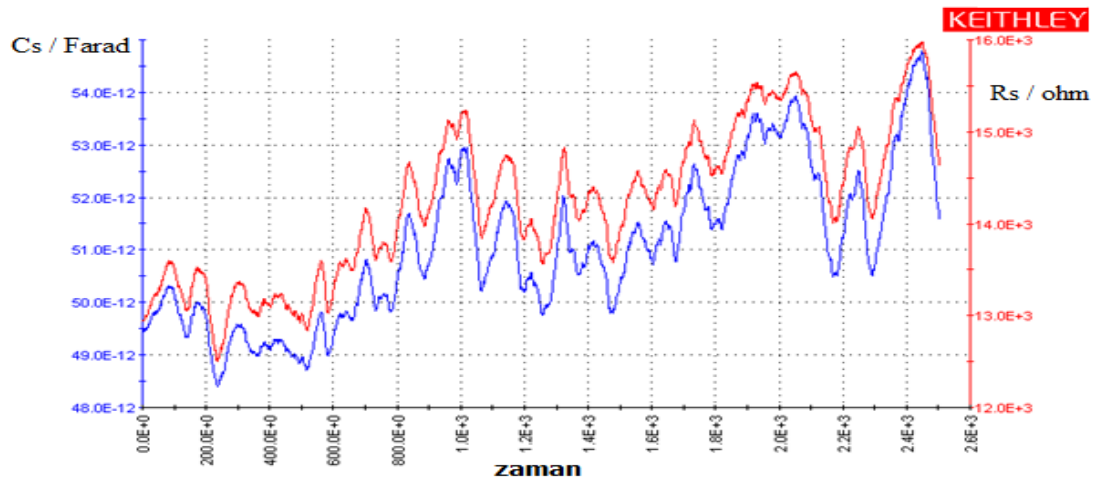
Şekil 3.12. DI su kullanarak SPA ve LCR' den alınan ölçümlerin karşılaştırılması

Üretilen biyosensörlerle doğrudan biyolojik uygulamalar deneylerine geçmeden önce ilk olarak biyosensörün tekrarlanabilirliğinin ve kararlılığının uygun olup olmadığını anlamak için biyosensör UNAM temiz odada bulunan parametre analizörü ve prob istasyonunu kullanarak birer gün aralıklarla ölçümler yaptık. Aldığımız ölçümler Şekil 3.13' de empedans/zaman grafiğinde gösterilmiştir. Empedans değerlerinin yaklaşık olarak birbirine eşit olması biyosensörün tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.13. Parametre analizörü kullanarak farklı günlerde alınan ölçüm sonuçları

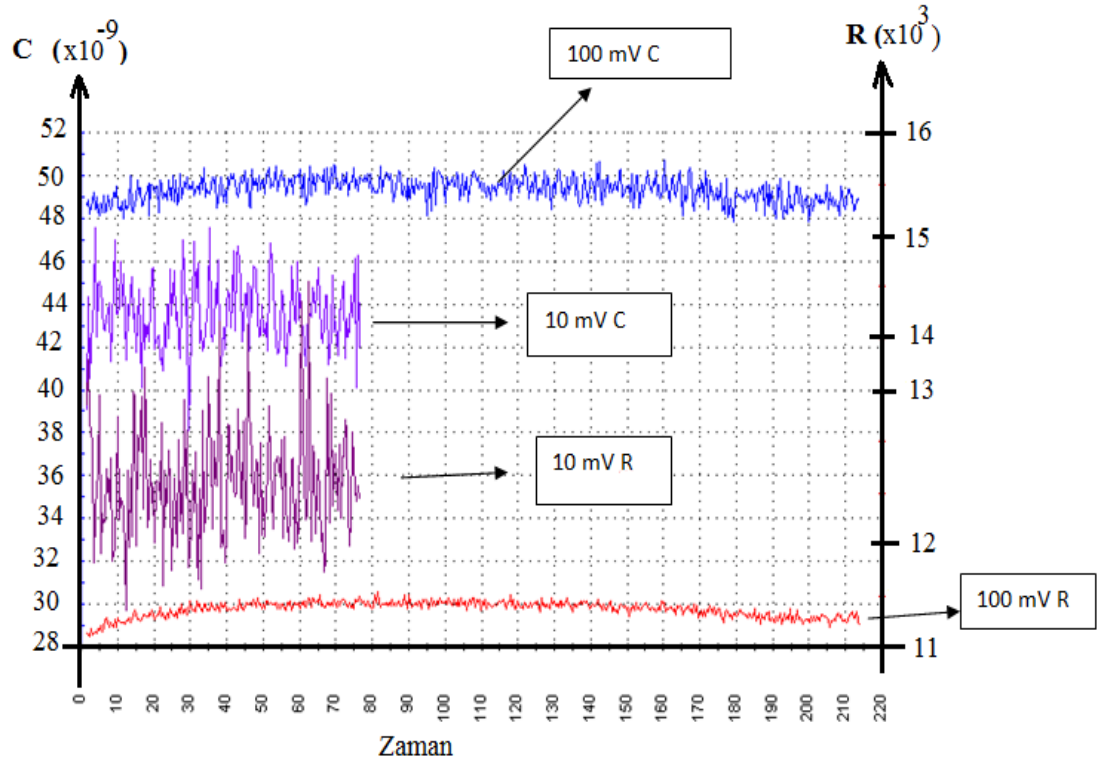
Bir sonraki aşama olarak biyosensörde alınan ölçümlere, zamanın etkisinin olup olmadığını incelemek için biyosensör 2500 sn test edildi. Değişimler UNAM temiz odada bulunan parametre analizörü kullanılarak alındı. Alınan sonuçlar Şekil 3.14’ de gösterilmiştir.



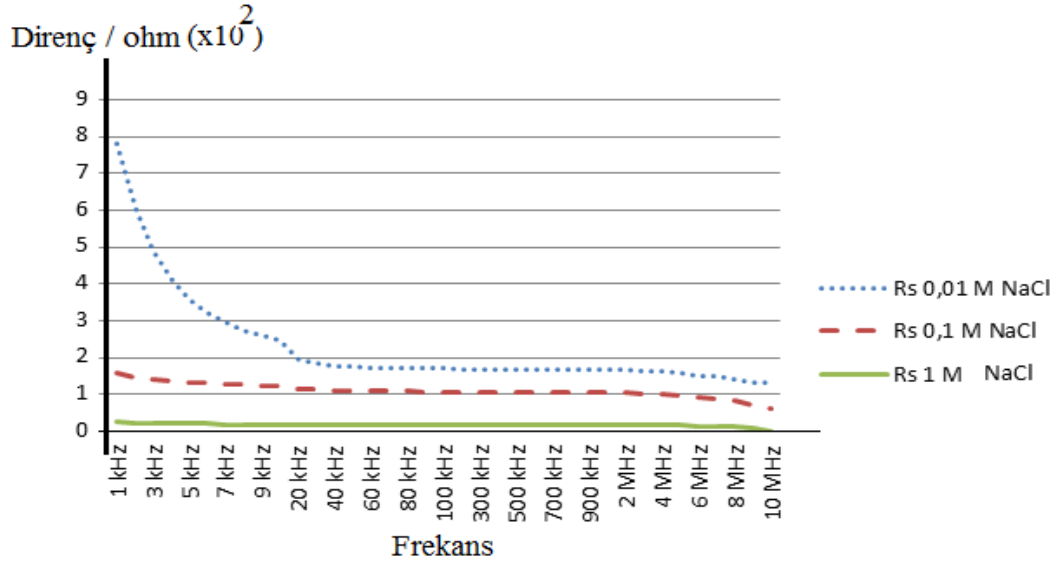
Şekil 3.14. Parametre analizörü kullanarak biyosensörün uzun zaman aralığında ölçüm testi

Üretilen biyosensör tekrarlanabilirlik ve kararlılık testlerinden geçmiştir. Biyosensörün farklı voltaj değerlerine nasıl tepki verdiğini gözlemlemek için 10 mV'luk düşük voltaj ile 100 mV 'luk yüksek voltaj değerlerini kullanarak deneyler yaptık. Parametre analizörü kullanarak alınan sonuçlar Şekil 3.15' de gösterilmiştir. Şekil 3.15' den anlaşılacağı üzere sensör düşük voltaj değerlerinde gürültü düzeyi yüksek iken yüksek voltaj değerlerinde çalıştığında gürültüde azalma meydana gelmektedir.

Biyosensör hazırlık olarak farklı derişimlere sahip NaCl (0,01 M, 0,1 M ve 1 M) solusyonlar ile test edildi. Parametre analizörü kullanarak elde edilen veriler Şekil 3.16' da gösterilmiştir.



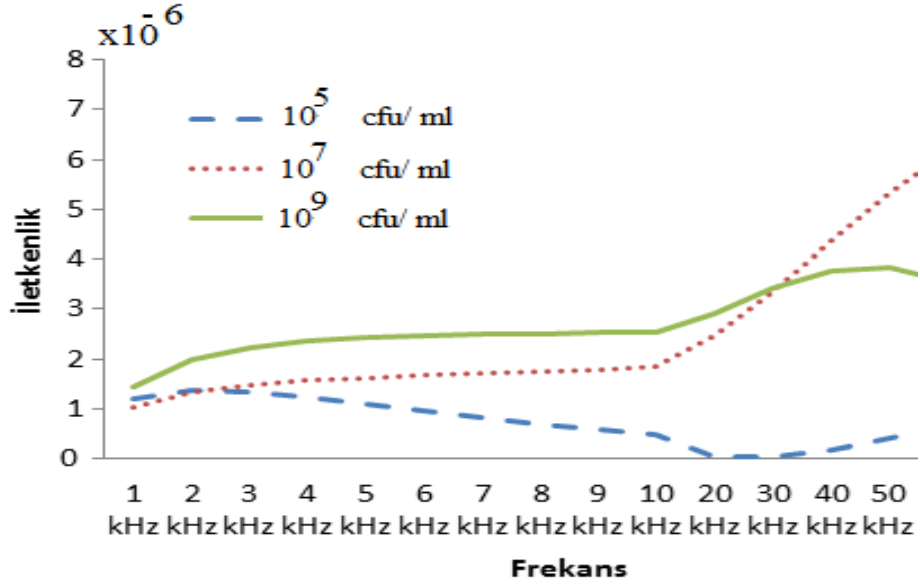
Şekil 3.15. Yüksek voltaj ve düşük voltaj kullanımında gürültü düzeyi



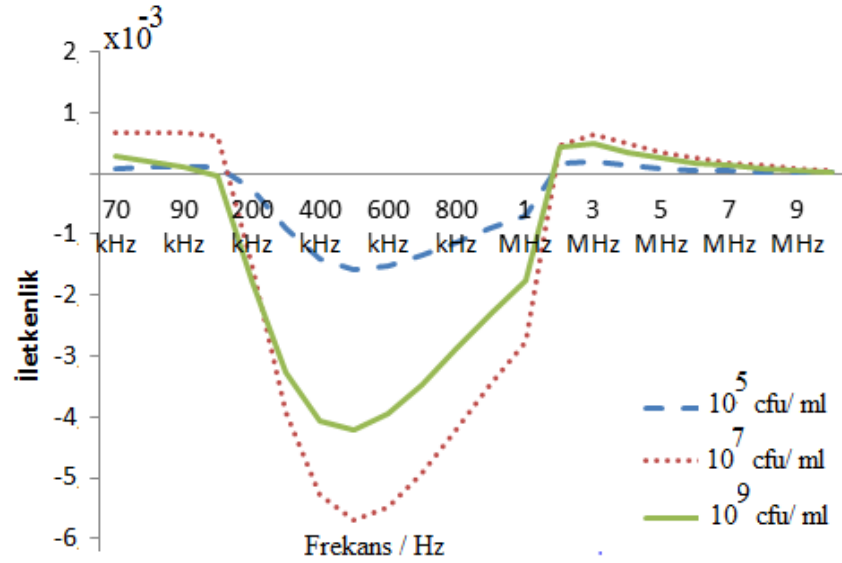
Şekil 3.16. Farklı solusyonların iletkenliğe etkisini gösteren direnç/frekans grafiği

Yüksek derişime sahip çözelti frekans değişiminden etkilenmediği görülmüştür. Düşük derişime sahip çözeltilerdeki iletkenlik değişimi frekans değeri arttıkça direnç azalmaktadır. Düşük derişime sahip çözeltiler 30 kHz'dan sonra direnç değerlerinde kayda değer bir değişim olmamıştır. Üretilen biyosensörler ön testlerden geçtikten sonra E. Coli deneylerine başlandı. E. Coli' nin hücre dışına yaymış olduğu nano boyutlardaki iletken parçacıklar nanoboyuttaki parmaklıklar arasına girerek direnç' in miktarını değiştirir.

Deneylerde E. Coli'nin 10⁵ cfu/ml, 10⁷ cfu/ml ve 10⁹ cfu/ml kullanılıp iletkenlikteki değişim incelendi. Şekil 3.17 ve Şekil 3.18' de E. Coli 'nin düşük ve yüksek frekansa bağlı olarak iletkenlikteki değişimi gösterilmiştir. Şekil 3.17 ve Şekil 3.18' de ölçümler Parametre analizörü kullanarak alınmıştır.



Şekil 3.17. Düşük Frekans aralığında iletkenliğin frekansa göre değişimi



Şekil 3.18. Yüksek Frekans aralığında iletkenliğin frekansa göre değişim

Şekil 3.17 ve Şekil 3.18' ten de anlaşılacağı üzere üretilen sensörler yaklaşık 15 kHz' in altında doğru sonuçlar vermektedir. Temiz odada bulunan parametre analizörü kullanılarak mHz mertebesinde yapılan ölçümlerde sensörün verdiği tepkiler güvenilir değildir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Biyosensör teknolojisi, çeşitli uygulama alanlarında çoklu disiplinler arası bir çalışmayla, ihtiyaçlar doğrultusunda gelişerek, çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Biyosensörler klasik tayin yöntemlerine nazaran çoğu zaman spesifik, güvenilir sonuçlar veren, yerinde erken teşhis amaçlı, hassas sonuçların pratik bir şekilde ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde seri olarak üretilebilmeleri ve bu türlerin çoğu zaman kullanırken özel deneyim gerektirmemeleri, onları gelecek vaat eden biyo algılayıcı sistemler olarak ön planda tutmaktadır. İmpedans spektroskopisi sağladığı avantajlarla etkin bir yöntemdir ve biyosensör uygulamaları için kullanılabilir. Fakat solüsyon içinde iyonların olması nedeniyle elektriksel çift tabaka oluşmuştur. Geleneksel olarak, yüksek frekanslar (> 100 kHz) elektriksel çift tabakayı ortadan kaldırmak için tercih edilir. Bununla birlikte, bu frekanslarda parazitik ve indüktif etkilerinin yanı sıra, yüksek frekanslı sistemler, maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmez. Bu tez, düşük frekans ölçümleri için bir teknik göstermiştir. Bu teknik aynı zamanda ölçüm hacmini minimize etmeye yararlı bir nano aralık tabanlı biyosensör yapısı geliştirmiştir.

Bu tez çalışmasında, nano aralık tabanlı biyosensörlerin fabrikasyon, tasarım ve karakterizasyon aşamaları gerçekleştirilerek gösterilmiştir. Bu çalışmada altın materyal kullanılarak Termal kaplama cihazı ve ALD yöntemi ile filmler büyütülmüştür. Üretilen nanobiyosensörlerin biyolojik uygulamalar ile farklı koşullar altında tepkisini ölçtük. Biyolojik uygulamalar için sensörde meydana gelen direnç değerinin değişimine bağlı olarak iletkenlik ölçüldü. Deneylede yüksek voltaj'da alınan ölçümlerde gürültü düzeyinin minimum oluşu görüldü. Yüksek frekansda yapılan iletkenlik ölçümlerinde kararsızlık meydana gelmiştir bunun sebebi yüksek frekanslarda gürültü miktarı çok yüksektir. Biyosensörümüz düşük frekans ve yüksek voltaj ölçümlerinde kararlı, tekrarlanabilir ve güvenilirdir. Ayrıca yüksek frekanslı sistemler, maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmezler. Alınan sonuçlar sensörün biyolojik uygulamalar için duyarlı olması, tutarlı ve kararlı olması, beklentilere olumlu cevap vermiştir. Bununla birlikte biyosensörler litaretürdeki çoğu biyosensörler gibi çözülmesi gereken bazı problemler içermektedir. Bunlardan

bazıları biyosensörün hazırlanmasının uzun sürmesi, üretilecek sensör için hazırlanan film tabakasında oluşacak çok küçük bir hatanın ölçüm sonuçlarını etkilemesi ve nano boyutlara inildikçe maddelerin veya moleküllerin sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özelliklerin değişmesi çözümlenmesi gereken problemlerden bazılarıdır.

Bu sensör platformunun aynı zamanda kimyasal veya gaz sensörleri olarak uygulanabilirlik adına potansiyel bulabileceğini söyleyebiliriz. Gelecekte yapılacak çalışmalar için belirli bir biyo işaretleyici olarak bir hedef molekül üzerinde çalışılabilir. Ayrıca, mevcut platform mikro akışkan sistemi ve düşük maliyetli bir ticari kapasitans çip ile entegre edilebilir. Bu birleşim yerinde bakım erken teşhis amacıyla yeni ve faydalı sistemleri sunabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Von Lucadou I, Luft G, Preidel W, Richter GJ. The electrocatalytic glucose sensor. *Horm Metab Res Suppl.* 20: 41–3, 1988.
- [2] Meyers, M.A., et al., "Biological Materials: Structure & Mechanical Properties", *Progress in Materials Science.* 53: 1-4, 2008.
- [3] Nice EC, Catimel B. Von Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions. *Bioessays.* 21: 339–52, 1999.
- [4] A. Rasooly, Biosensor technologies. *Methods.* 37(1): 1–3, 2005
- [5] Updike, S.J., Hicks, G.P., The Enzyme Electrode. *Nature*, vol. 214, pp. 986–988, 1967.
- [6] Velasco-Garcia, M. N. ve Mottram, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering Vol 84 (1):*1-12, 2003.
- [7] Bairoch A. "The ENZYME database in 2000". *Nucleic Acids Res* 28: 304–305. doi:10.1093/nar/28.1.304. PMID 10592255, 2000.
- [8] Jaeger KE, Eggert T. "Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution". *Curr Opin Biotechnol.* 15(4): 305–313. doi:10.1016/j.copbio.2004.06.007. PMID 15358000, 2004.
- [9] Koshland D. E. "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 44 (2): 98–104. doi: 10.1073/pnas.44.2.98. PMID 16590179, 1958.

- [10] Akyilmaz E, Yorganci E. A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. *Biosens Bioelectron.* 23:1874–7, 2008.
- [11] Anonim, Antikor, <http://www.acikbilim.com/wp-content/uploads/2012/05/255px-Antibodypng.png> (Erişim tarihi: 26–10–2014).
- [12] Lwoff A. "The concept of virus". *J. Gen. Microbiol.* 17 (2): 239–53. PMID 13481308, 1957.
- [13] Gooding J.J., Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends, *Analytica Chimica Acta* 559, pp. 137-151, 2006.
- [14] Lewenstam, A., Maj-Zurawska, M., Hulanicki, A., Application of ion-selective electrodes in clinical analysis, *Electroanalysis*, vol. 3, pp. 727-734, 1991.
- [15] Akbayirli, P, Akyilmaz, E. Activation-based catalase enzyme electrode and its usage for glucose determination. *Analytical Letters*, pp. 40:3360-72, 2007.
- [16] Akyilmaz E, Yorganci E. A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. *Biosens Bioelectron.* 23:1874-7, 2008.
- [17] Eggins, B.R. “Biyosensors: an introduction” Chichester :Wiley-Teubney,c.,1996.
- [18] L. Q. Yao, J. G.Zhang, L. Lu ve M. O. Lai, “ Nonlinear Dynamic Characteristics of Piezoelectric Bending Actuators Under Strong Applied Electric Field” *Journal of Microelectromechanical Systems*, Sayı:13, No. 4, 2004.

- [19] F. Patolsky ve ark., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101 sayfa:14017, 2004.
- [20] Shah J ve Wilkins E, Electroanalysis; 15, 3; sayfa: 157-167, 2003.
- [21] Kissinger, P.T. “biosensorsa perspective” Biosensors and Bioelectronics, pp. 20,2512-2516, 2005.
- [22] Hall, E.A.H.. Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; s.3-30, 1990.
- [23] Kılınç A., Biyosensör tasarımı ve uygulamalarında son gelişmeler, http://tipfak.trakya.edu.tr/news/biyosensor-tasarimi-ve-uygulamalarinda-son-gelismeler#.UuznA_1_uT8 (Erişim tarihi: 20.10.2014).
- [24] Dong S, Chen X. Some new aspects in biosensors. J Biotechnol, pp. 82:303–23, 2002.
- [25] Dinçkaya E. Biyosensörler. İzmir, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, 1999.
- [26] D’Souza SF. Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications. Appl Biochem Biotech, 96, pp. 225–38, 2001.
- [27] Rainina EI, Efremenco EN, Varfolomeyev SD, Simonian AL. The development of a new biosensor based on recombinant E. coli for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. Biosens Bioelectron, 11, pp. 991–1000, 1996.
- [28] McGlennen RC. Miniaturization technologies for molecular diagnostics. Clin Chem. 47, pp. 393–402, 2001.

- [29] Telefoncu, A., Biyosensörler. Biyokimya lisansüstü yaz okulu 20-26 Haziran 1999 Kuşadası, Türkiye. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi. s: 1–9, 1999.
- [30] Mello, L. D. ve Kubota, L. T., Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* Vol 77.237–256, 2002.
- [31] Voldman, J., Gray, M.L. Schimdt, M.A., “Microfabrication in biology and medicine” *Biomed. Eng.* 01, pp. 401–425, 1999.
- [32] Gooding JJ, Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends, *Analytica Chimica Acta*, 559, sayfa:137, 2006.
- [33] Gosden C ve Gardener D, *BMJ*; 331 ;sayfa: 395, 2005.
- [34] K. Brown, *Science*; 305; sayfa: 261, 2004.
- [35] Van T., Van N., Anh T., Toan T., Ngoc K., Hong D., Thanh H., Silicon nanowires prepared by thermal evaporation and their photoluminescence properties measured at low temperature. *Adv. Nat. Sci. : Nanosci. Nanotechnol.* Vol. 2, pp. 15–16, 2011.
- [36] Anonim, Thin Film Deposition Processes, Las Positas College, Vacuum Technology 60A & 60B, <http://ipc1.clpccd.cc.ca.us/lpc/tswain/chapt14.pdf> (Erişim tarihi: 21–06–2012), pp. 171-212, 2002.
- [37] Kurt J.L. , E-gun, Thermal Evaporator Instructions, Updated 04-13-2007.
- [38] Şahin B. , Ağan S. , PECVD Tekniği ile Büyütülmüş İnce Filmlerde Oluşan Ge ve SiGe Nanokristallerin Geçirgen Elektron Mikroskobu (TEM) ,Raman ve Fotoışma Spektroskopisi Teknikleri ile İncelenmesi, *International Journal of Engineering Research and Development*, Vol.2, No.2, June 2010.

- [39] Anonim, Fotolitografi nedir, <http://www.bnmfabrika.com/maskaligner1-fotolitografi-nedir.html> (Erişim tarihi: 13.06.2014).
- [40] Scotten W.J. , Photolithography. IC Knowledge LLC, 2008.
- [41] Rothschild, W. Horn M. , Keast L. C. , Kunz R. , Liberman V. , Palmateer C. S. , Doran S. P. , Forte A. , Goodman R. B. , Sedlacek J. H. , Uttaro R. S., Corliss D. ve Grenvill A. , Photolithography at 193 nm, the Lincoln laboratory journal, v: 10 , number 1, 1997.
- [42] Chen X., Guo Z., Yang G.M., Li J. , Li M.Q., Liu J.H. ve Huang X.J., Electrical nanogap devices for biosensing, *Materials Today*, vol. 13, no. 11, pp. 28–41, Nov. 2010.
- [43] Liang X. ve S. Chou Y., Nanogap Detector Inside Nanofluidic Channel for Fast Real-Time Label-Free DNA Analysis, *Nano Lett.*, vol. 8, no. 5, pp. 1472–1476, 2008.
- [44] Liu B. , Xiang J., Tian J. H., Zhong C., Mao B.W., Yang F. Z., Chen Z. B. , Wu S.T. ve Tian Z.Q., Controllable nanogap fabrication on microchip by chronopotentiometry, *Electrochimica Acta*, vol. 50, no. 15, pp. 3041–3047, May 2005.
- [45] Schlecht U., Malavé A., Gronewold T. M. A., Tewes M. ve Löhndorf M., Detection of Rev peptides with impedance-sensors — Comparison of device-geometries, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no. 9–10, pp. 2337–2340, Apr. 2007.
- [46] Im H., Huang X.-J., Gu B. ve Choi Y.K., A dielectric-modulated field-effect transistor for biosensing, *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 7, pp. 430–434, 2007.

- [47] Ionescu-Zanetti C., Nevill J. T., Di Carlo D., Jeong K. H. ve Lee L. P., Nanogap capacitors: Sensitivity to sample permittivity changes, *Journal of applied physics*, vol. 99, no. 2, 2006.
- [48] O. Hanoğlu, Nanogap based label-free impedimetric biosensors for point-of-care and early cancer detection. Yüksek lisans tezi. Bilkent Üniversitesi, Ankara, 2012.
- [49] Morgan H. ve Green N. G., *AC Electrokinetic: Colloids and Nanoparticles*, 1st ed. Research Studies Pr, 2002.
- [50] Charge Relaxation in Uniform Conductors, http://web.mit.edu/6.013_book/www/chapter7/7.7.html. (Erişim tarihi: 07.06.2012).
- [51] Finot E., Bourillot E., Meunier-Prest R., Lacroute Y., Legay G., Cherkaoui-Malki M., Latruffe N., Siri O., Braunstein P. ve A. Dereux, Performance of interdigitated nanoelectrodes for electrochemical DNA biosensor, *Ultramicroscopy*, vol. 97, no. 1–4, pp. 441–449, Oct. 2003.
- [52] Van Gerwen P., Laureys W., Huyberechts G., De Baeck M., Baert K., J., Varlan A., Sansen W., Hermans L. ve Mertens R., Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors, in *Solid State Sensors and Actuators, 1997. Transducers '97 Chicago., 1997 International Conference on*, vol. 2, 1997.
- [53] Huang, Y., Dong, X., Liu, Y., Li, L. J., & Chen, P. (2011). Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 12358–12362, 2011.
- [54] M. Yüksel, Protein algılamasına yönelik nanobiyosensörlerin yeni malzeme ve tekniklerle geliştirilmesi. Doktora tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012