

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NANO-BİYOSENSÖRLERİN PROTEİN-DİELEKTRİK-METAL
ARAYÜZEY İNCELEMELERİ**

Suat PINARBAŞI

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sedat AĞAN**

**2014
KIRIKKALE**

Fizik Anabilim Dalında Suat PINARBAŞI tarafından hazırlanan NANO - BİYOSENSÖRLERDE PROTEİN – DİELEKTRİK - METAL ARAYÜZEY İNCELEMELERİ 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. Mustafa YÜKSEL) _____
Üye (Danışman) : (Prof. Dr. Sedat AĞAN) _____
Üye : (Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN) _____

31.01.2014

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

NANO - BİYOSENSÖRLERDE PROTEİN – DİELEKTRİK – METAL ARAYÜZEY İNCELEMELERİ

PINARBAŞI, Suat

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Sedat AĞAN

Ocak 2014, 62 sayfa

Bu tezde, üretilecek nanobiyosensörlerin Streptavidin proteininin biotin ve Cr, Au, Ag gibi yüzeylere bağlanmaları araştırıldı. Filmler Termal kaplama cihazı (PVD), ALD ve PECVD yöntemi ile büyütüldü. Bu tez çalışmasında üretilecek olan nanobiyosensörün uygun geometrik tasarımı yapılmıştır. Çalışma prensibi ise, hedef moleküllerin bağlanması ile impedimetrik değişiklikler tespit etmektir. Tasarlanan aygıtta dikey nano aralıklı nano biyosensörler üretildi. Algılanması istenen yapılar, dielektrik malzemenin bulunduğu SiO₂ katmana bağlanmaktadır.

Sonuç olarak algılanması istenen moleküllerin Au, Ag ve Cr yüzeylere daha iyi bağlandığı gözlemlendi. Nanobiyosensör teknolojisinde karşılaşılan en büyük problemler, maliyetin yüksek olması, tekrarlanabilir ve kararlı yapıların üretilmemesidir. Kapasitif, etiketsiz nanobiyosensörler üretimi nisbeten ucuz ve kolay, yüksek hassasiyet değerlerinde algılama potansiyeli olan aygıtlardır. Bu tezin konusu olan kapasitif nano-biyosensörler, performans ve tekrarlanabilirlik sorunlarını çözmek ve ticari bir nanobiyosensör alternatifi sunmak için ara yüzey bağlanma incelemeleri umut verici sonuçlar vermektedir. Geliştirilecek olan nanobiyosensörlerin birçok uygulama alanlarından bir tanesi ve belki de en önemlisi erken teşhis çalışmalarında kullanılabilmesi olacaktır.

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

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROTEIN-DIELECTRIC-METAL INTERFACES FOR NANO-BIOSENSORS

PINARBAŞI, Suat

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Physics, Ph. G. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sedat AĞAN

January 2014, 62 pages

In this thesis, fabricated nanobiosensors of biotin and streptavidin protein Cr, Au as to attach to surfaces were investigated. Films, was grown by thermal coater device (PVD), atomic layer deposition (ALD) and PECVD methods. In this thesis, the proper geometrical design of produced nanobiosensor was made. The operating principle, impedimetric changes are to identify with the binding of target molecules. Designed device, vertically nano spaced nanobiosensors were produced. Sensing desired structures will bond in the area of the dielectric material.

As a result of detection of the desired molecule, was observed better binding to the Au, Ag and Cr surfaces. The biggest problems of nanobiosensors are the high cost, repeatable and unproducable stable structures. Capacitive, unlabeled nanobiosensors are relatively inexpensive and easy to manufacture high-precision values devices that detect potential. Which is the subject of this thesis capacitive nano-biosensors, performance and repeatability to solve problems and to provide a commercial alternative nanobiosens interfacial binding studies provide promising results. Nanobiosensör which will be developed one of the many application areas, and perhaps most importantly, early diagnosis will be used in the study.

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

TEŐEKKÖR

Tezimin hazırlanması esnasında hiçbir yardımcı esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara büyük destek olan, bilimsel deney imkânlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren, tez yöneticisi hocam, Sayın Prof. Dr. Sedat AĞAN 'a, tez çalışmalarım esnasında, bilimsel konularda daima yardımını gördüğüm hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÜKSEL 'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN' a, TÜBİTAK Proje No:112M944 kapsamında TÜBİTAK'a K.Ü. BAB (2011/05) kapsamında Kırıkkale Üniversitesi yönetimine büyük fedakârlıklarla bana destek olan arkadaşım İsmail BİLİCAN' a, tezimin birçok aşamasında yardım gördüğüm Mustafa Tahsin GÜLER'e ve son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen aileme 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. Biyosensörler	2
1.1.a. Biyokomponentler (biyoreseptörler)	5
1.1.a.i. Biyoaffinite Esaslı Biyosensörler	6
1.1.a.ii. İmmobilize Hücre Esaslı Biyosensörler	7
1.1.a.iii. Transmembran Esaslı Biyosensörler	7
1.2. Çeviriciler	7
1.3. Reseptör Tutuklanması (immobilizasyonu)	9
1.4. Biyoreseptör Molekülleri	10
1.4.1. Enzimler	11
1.4.2. Antikorlar	11
1.4.3. Aptamerler	12
1.4.4. Reseptör Proteinler	13
1.4.5. Diğer Adaylar	13
1.5. Nitelikli Bir Biyosensörde Aranılan Özellikler	16
1.6. Biotin (H Vitamini)	16
1.6.a. Biotinin Kimyasal Özellikleri	16
1.6.b. Biotin-Enzim Bağlanması	16
1.7. Streptavidin	16

2. MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1. Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans Tekniği (LSPR).....	18
2.2. Termal Buharlaştırma Sistemi (PVD).....	23
2.3. Plazma ile Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar Depolama Sistemi (PECVD).....	23
2.4. Atomik Katman Biriktirme (ALD)	25
2.5. Fotolitografi	26
2.6. Nano Aralık Temelli Biyosensörler	26
2.7. Sensör Fabrikasyonu	30
2.7.1. Altlık ve Yüzey Hazırlığı.....	38
2.7.2. Alt Elektrotun Büyütülmesi	39
2.7.3. Dielektrik Katmanların Büyütülmesi.....	39
2.7.4. Üst Elektrotun Desenlendirilmesi	40
2.7.5. Üst Elektrodun Kaplanması ve Kaldırma İşlemi (LİFT-OFF)	40
2.7.6. Nano Aralık Oluşturma.....	41
2.7.7. Ölçüm Sistemi.....	42
2. ARAşTIRMA VE BULGULAR	44
3.1. Protein Algılama	44
3.2. Kararlılık Testleri	55
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
SONUÇ—TARTIşMA.....	58
KAYNAKLAR	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bir Biyosensörün Genel Şematik Gösterimi	3
1.2. Biyosensörün Yapısı ve Çalışma Metodu	5
1.3. Biyoanfinite Esaslı Biyosensörler	6
1.4. Biyokatalitik ve İmmobilize Hücre Esaslı Biyosensörler	6
1.5. Transmembran Esaslı Biyosensörler	7
1.6. Biyosensörlerde Çeviriciler	8
1.7. Biyosensörün Biyoaktif Tabaklarında Biyoaktif Bileşenler	9
1.8. Altın Yüzey Üzerine Antikor Bindirme	10
1.9. Enzimler ve Substrat İlişkisi	11
1.10. Hücredeki Antikorlar	12
1.11. Hücredeki Antikorlar, Antijenler ve Marker Molekülerin Modellemeleri .	13
1.12. Hücre Zarının Elektron Mikroskopundaki Kesiti	13
2.1. Safir Alttaş Üzerinde Gümüş Nanoparçacıkların Dalga Boyuna Göre	
Yansıma Miktarı	19
2.2. Anti-ADDL Tespiti İçin LSPR Biyosensör Tasarımı	20
2.3. Bir AFM modunda Dokunma ve SAM kaplı AgNanoparçacık	22
2.4. Termal Buharlaştırma Sistemi	23
2.5. PECVD Yöntemi	24
2.6. Nano Transistorun 200 nm Büyük Nanogapta SEM görüntüsü	24
2.7. Nano Transistorun 200 nm Büyük Nanogapta TEM görüntüsü	25
2.8. ALD Yöntemi	25
2.9. Fotolitografi	26
2.9. Polimer Yüzey ve Bir Polimer Mikroakışkan Çip Üzerinde Bir Au nano IDA içeren Cihazın Şematik Görünümü	27
2.11. Nanocihaz Fotoğrafları	27
2.12. Polimer Substratta nano IDA dizilerinin SEM Görüntüleri	28
2.13. Nano Transistor Yapının Üç Boyutlu Görüntüsü	29
2.14. Nano Transistor Yapının Dizayını	29
2.15. Yüzey Fonksiyonelleştirme Adımı	30

2.16. Nano IDA Sensörün Dizaynı	31
2.17. Polimer Mikroakışkan Kanallar ile nano IDA için Fabrikasyon İşlemi	33
2.18. Biyosensörün Çalışma Sistemi.....	34
2.19. Sensör Fabrikasyonu	35
2.20. Tasarlanan Sensörlerin Görünümü ve Çalışma Sistemi.....	36
2.21. Tasarlanan Sensörlerin Görünümü ve Çalışma Sistemi.....	36
2.22. Nano Aralıklı Biyosensörün Devre Modellemesi	37
2.23. Fabrikasyon Sonunda Elde Edilen Aygıtların Gösterimi.....	38
2.24. Yüzey Temizliğinin Yapılması	38
2.25. Termal Buharlaştırma Yöntemi ile Alt Elektrotun Büyütülmesi.....	39
2.26. Dielektrik Katmanların Büyütülmesi	39
2.27. Fotolitografi Tekniği ile Elektrotun Desenlenmesi.....	40
2.28. Termal Buharlaştırma Yöntemi ile Üst Elektrotun Desenlenmesi.....	41
2.29. Kaldırma İşlemi ve Sonrasında Sensörün Şekli	41
2.30. Islak Aşındırma İşlemi ve Sonrasında Sensörün Şekli	42
2.31. Üretilen Biyosensörün Fonksiyonalizasyon Öncesi SEM Görüntüsü	42
2.32. UNAM Temiz Odada Bulunan Parametre Analizörü	43
2.33. Vakum Haznesindeki Örneğin Mikro-İğneler Vasıtası ile Elektriksel Ölçümler İçin Bağlantı Alınmış Durumdaki Görünümü	43
3.1. Yapıların Üzerine Streptavidin Damlatılmış Durumdaki Görüntüsü.....	44
3.2. Streptavidin Uygulanan Sensörün Frekans Kapasitans Değişimi	45
3.3. Farklı Streptavidin Konsantrasyonlarında Sensörün Kapasitans Değişim Yüzdesi-Frekans Grafiği.....	46
3.4. Protein Algılama Gösterimi Sistemi	46
3.5. Gümüş Parçacıklardan Alınan Transmisyon Ölçümleri	47
3.6. Farklı Konsantrasyonlarda Elektrolit KCl Altında Bir Nano IDA'nın EIS a) Amplitüd Cevabı ve (b) Faz Yanıtı	48
3.7. Elektrolit İçinde Nano IDA İçin Elektriksel Modelleme	49
3.8. Proteinlerin Epoksi Numuneye Bağlanması	50
3.9. İmpedimetrik Tepki.....	51
3.10. DMFET Nanogap Cihazın IDS-VGS Özellikleri	52
3.11. DMFET Nanogap Cihazın Elektriksel Özellikleri.....	53
3.12. DMFET Elektriksel Özelliklerinin Karşılaştırılması (I-V)	54

3.13. DMFET Elektriksel Özelliklerinin Karşılaştırılması (V-Numune).....	54
3.14. Yapıların Odaklandırılmış İyon Demeti Taramalı Elektron Mikroskobu (FIB SEM) Görüntüleri.....	55
3.15. Kararlılık Doğrulamak İçin Kapasitans-Zaman Değişimi	56
3.16. Üst Üste Altı Kez Alınan Kuru ve DI Sudaki Kapasitans-Zaman Değişimi	56
3.17. Bir Parmağın Ön Profilinin SEM Görüntüsü.	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

	<u>Sayfa</u>
1.1. Doğal Biyosensör ve Üretilen Dönüştürücü Özellikleri	16
1.2. Doğal Biyosensörlerin Avantaj ve Dezavantajları.....	17

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALD	Atomik Katman Biriktirme
PVD	Termal Buhar Biriktirme
PECVD	Plazma ile Güçlendirilmiş Buhar Biriktirme
DI	Saf su (Damıtılmış Su)
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
LYPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans
IDA	İnter Dijital Elektrot Dizisi
LSPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans
EIS	Elektrokimyasal İmpedimetrik Spektroskopisi
COC	Cyclic Olefin Copolymer
SAM	Yüzeye kendiliğinden bağlanma
NSL	Nano-Safir Litografi
ADDL	Amyloid-Driven Diffusible Ligands
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
DMFET	Dielektrik Modüllü Alan-Etki Transistör
FIB SEM	İyon demeti odaklandırılmış taramalı elektron mikroskobu
NaCl	Sodyum Klorür
KCl	Potasyum Klorür
Ag	Gümüş
Si	Silisyum
O ₂	Oksijen
H	Hidrojen
Al ₂ O ₃	Alumina
Cr	Krom
Au	Altın
N	Azot
S	Kükürt

SiO ₂	Silikon dioksit
((CH ₃) ₂ CO)	Aseton
CO ₂	Karbondioksit
FET	Alan etkili transistör
SA	Streptavidin
AC	Alternatif akım
DC	Doğru akım
R	Direnç
E	Elektriksel Alan
F	Elektriksel çekim kuvveti
K	Kolumb sabiti
ml	mililitre
D	Kondansatörün dielektrik kalınlığı
W	Watt
UV	Ultraviyole
Nm	nanometre
Mm	milimetre
µm	mikrometre
kHz	Kilohertz
MHz	Megahertz
GHz	Gigahertz
Å ⁰	Angstrom
F	Farad
I	Akım
Φ	Faz farkı
ε _r	Dielektrik sabiti
ε ₀	Boşluğun dielektrik sabiti
C _p	Paralel Kapasitans
C _s	Seri Kapasitans
IPA	İzo propan Alkol
UNAM	Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi

1.GİRİŞ

Bütün canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri hızlı bir şekilde algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere adapte olmaya çalışırlar. İşte bu değişimlere adapte olmak için gerekli algılama mekanizması biyosensörlerin yapılmasına kapı aralamıştır. Canlılar bu uyarıları algılamayı sağlayan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri doğurmuştur. Biyosensör teknolojisi günümüzde o kadar hızlı gelişmektedir ki hatta günümüzde ve gelecekte en popüler araştırma ve uygulama alanları arasında yer alacaktır.

Günümüz teknolojisinde kullanacağımız aletlerde en çok aranan özellik daha küçük, daha doğru ve daha ucuz aletlere eğilim vardır. Canlıların yaşamında önemli birer unsur olan beş duyu organının (görme, işitme, koklama, tatma, dokunma) işlevleri doğal en mükemmel biyosensör olarak bilindiklerinden yapay biyosensörlere ilham kaynağı olmuşlardır.

L.C.Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) bir operasyon esnasında kandaki O₂ miktarını bir elektrot yardımıyla izlemesi ile biyosensörlerin miladı olmuştur. Clark ve Lyons, 1962 yılında Glukozoksidaz (GOD) enzimini O₂ elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz seviyesini ölçmüşlerdir.

Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini de yapabilmektedir. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensörler adı verilir.

Sensörler fiziksel etkileri elektrik sinyallerine dönüştüren mekanik duyu organı cihazlarıdır. Çalışma şekillerine göre ve dönüştürücü adı verilen yapılarına göre; termal, mekanik, kimyasal, radyoaktif sensörler ve biyosensörler olarak farklı çeşitlere ayrılmaktadırlar. Biyosensörler genel olarak, biyolojik yapıdaki analitleri hisseden sensörler veya reseptör birimi biyomoleküler yapıda olan sensörlerdir.

Nitelikli bir biyosensör oldukça duyarlı olmalı, seçiciliği olmalı, bir ölçüm aralığı olmalı, ölçüm süresi olmalı, sonuçları tutarlılık göstermeli, bir tespit sınırı olmalı, uzun ömürlü olmalı ki tekrar tekrar kullanılmalı ve son olarak da kararlı olmalıdır. Biyosensörler bu sekiz parametreye göre nitelendirilirler.

Biyosensörlerin, klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, kalite kontrol, biyoreaktörler, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi,

endüstriyel atık, su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur.

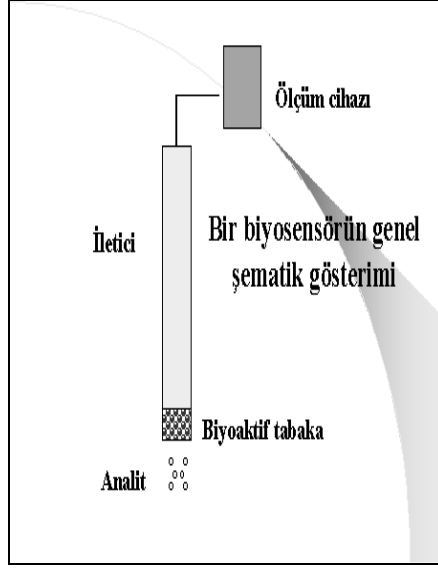
Tıbbi laboratuvarların bir çipe sığdırılabilmesi nanoteknolojideki gelişmelerle sağlanacaktır. Avuç içine alınabilecek boyuttaki küçük çip ile yalnızca birkaç dakikada diagnostik testler yapılabilir. Bilim insanları çok kısa bir zaman aralığında diagnostik testler yapabilen nano laboratuvarları geliştirmek için yoğun çaba harcamaktadırlar. Bu hayal de yakın bir zamanda ümit ederiz gerçekleşecektir.

Başka sağlık taramaları için de laboratuvar çiplerinin kullanılması planlanmaktadır. Örneğin, Tom Duke, Londra Nanoteknoloji Merkezi'nde yaptığı çalışmalarda HIV testi yapabilecek bir çip laboratuvarı için uğraş vermektedir. Yakın bir gelecekte birçok hastalık ve virüs bu çiplerle teşhis edilebilecektir. Yine bu teknoloji ile genetik mutasyon ve kanser türlerinin de tespiti yapılabileceği hedeflenmektedir.

Belirtildiği üzere geleceğin teknoloji ve endüstri devrimi olacak nanoteknoloji araştırma ve geliştirme çalışmaları ivme kazanmıştır. Bununla birlikte bilim, elektronik, tekstil, tıp, biyoteknoloji, farmakoloji, makine endüstride, askeri teknolojiler ve enerji gibi değişik alanlarda yeni ufuklar açması sağlanmıştır. Dünyanın değişik ülkelerinde nanoteknolojinin gelişmesi için üniversitelerde ve endüstriyel alanda önemli yatırımlar ve çalışmalar yapılmaktadır. Ülkemizde de bu konuda yapılan faaliyetlerden birisi Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) kurulmasıdır. Bu alanda ülkemizde uluslararası kongre ve seminerler de düzenlenmektedir.

1.1.Biyosensörler

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), bünyesinde biyolojik bir duyargacı bulunan ve bir fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analiz edilecek madde miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir.



Şekil 1.1. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi. [6]

Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu ile oluşturulurlar.

Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler, doku kültürleri, organeller, mikroorganizmalar, antikorlar ve nükleik asitler de kullanılabilir. Bunun yanında ölçüm tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, akustik, optik sensörler piezoelektrik olarak adlandırılırlar.

Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyokomponentlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısalttığından bir dezavantajdır.

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; seçici tanıma mekanizmasına sahip 'biyomolekül / biyoajan', bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen 'çevirici' ve 'elektronik' bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime

giren, duyarlı biyolojik ajandır. Genel olarak biyoajanlar, biyoafinite ajanları ve biyokatalitik ajanlar olarak iki alt gruba ayrılırlar. Biyoafinite ajanları olan antikorlar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılmaktadırlar.

Biyosensörlerin, klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur.

Özellikle 20. yüzyılın son 10 yılında, askeri bir tehdit oluşturmasından dolayı dönemin genelkurmay başkanı, ABD eski dışişleri bakanı Colin Powell'in olabilecek en ürkütücü silahın biyolojik silahlar olduğu yönündeki açıklamaları, 21. yüzyılın ilk dönemi için hem maddi hem de teknik açıdan biyosensör araştırmalarının yönünü belirlemiştir.

2002 yılı Mayıs ayında Japonya'nın Kyoto şehrinde gerçekleşen '7. Dünya Biyosensör Kongresi' çalışma gruplarına ait başlıklar, dünyanın güvenlik, teknik ve ticari anlamda hangi tür araştırmalara öncelik tanıdığı konusunda fikir vermesi bakımından önemlidir. Bunlar: [6]

- ✓ *Biyoelektrik ve mikroanalitik sistemler*
- ✓ *Nükleik asit sensörleri ve DNA yonganları*
- ✓ *Organizma ve tam hücre sensörleri*
- ✓ *Biyosensörler için doğal ve sentetik reseptörler*
- ✓ *Enzim tabanlı sensörler*
- ✓ *İmmunosensörler*

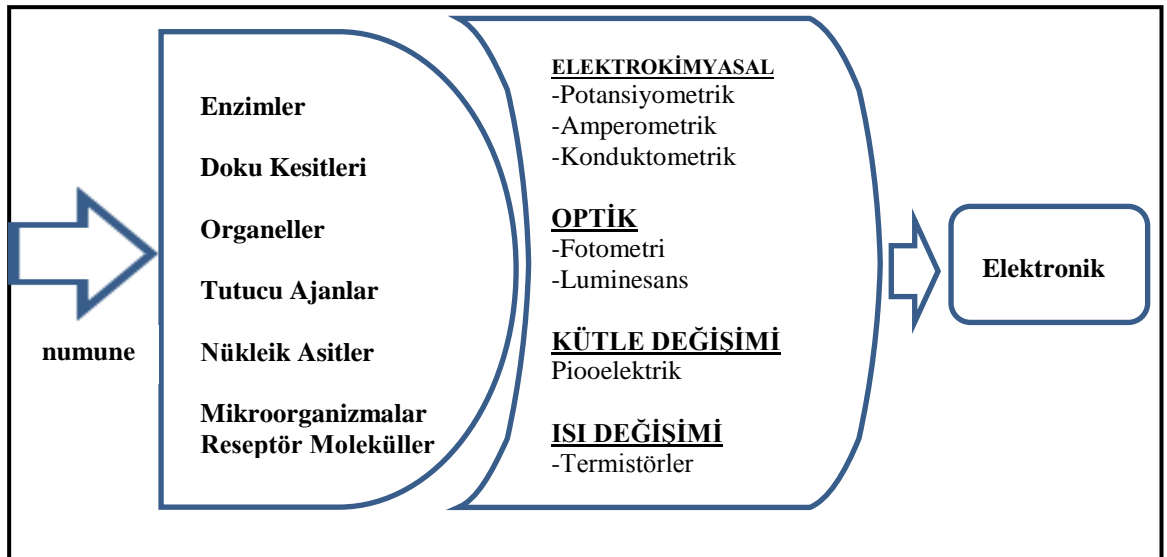
Biyosensörler, biyokomponentler (reseptör) ile fiziksel komponentlerden (transduser) oluşurlar. Biyosensörün görevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir.

1.1.a.Biyokomponentler(biyoreseptörler)

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyokomponentler çoğu kez biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Protein yapılı makromoleküllere ilaveten nükleik asitler ve karbonhidratlar da genom zincir analizleri ve hücre yüzeyi karakterizasyonu gibi özel alanlarda kullanılan biyosensörlerin yapısına girmektedir. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler de biyoreseptör (biyokomponent) olarak kullanılırlar.

Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır.

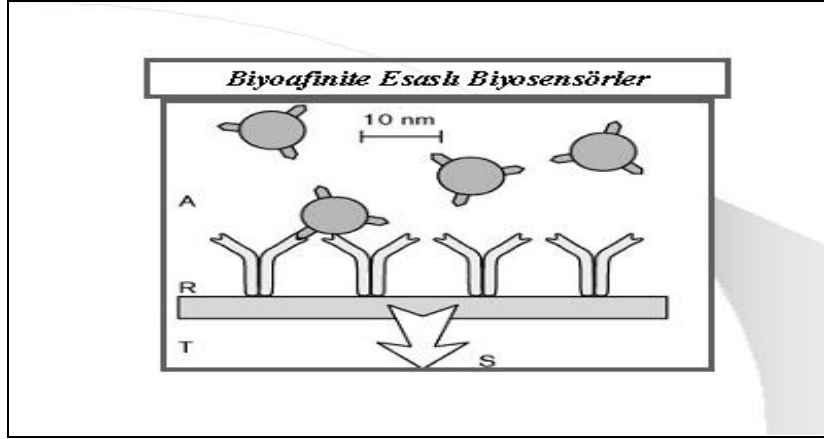
Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma metodu.

Aslında biyosensörleri çalışma prensiplerine göre biyoaffinite sensörleri ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

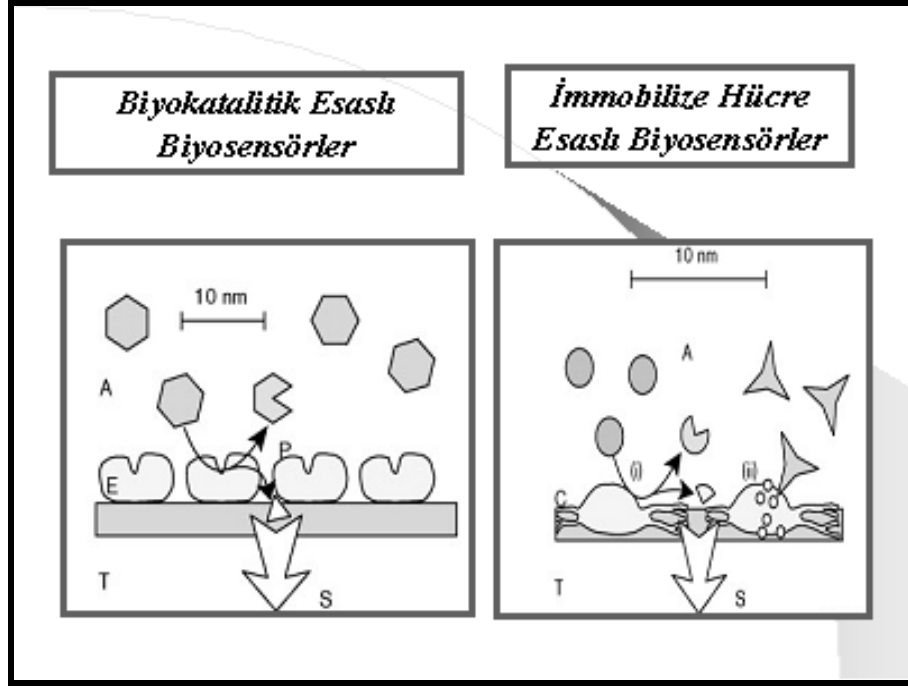
i. Biyoaffinite Esaslı Biyosensörler: İletici sistem üzerinde antikor immobilizasyonu ile antijenlerin tespiti yapılır.



Şekil 1.3. Biyoanfinite esaslı biyosensörler. [6]

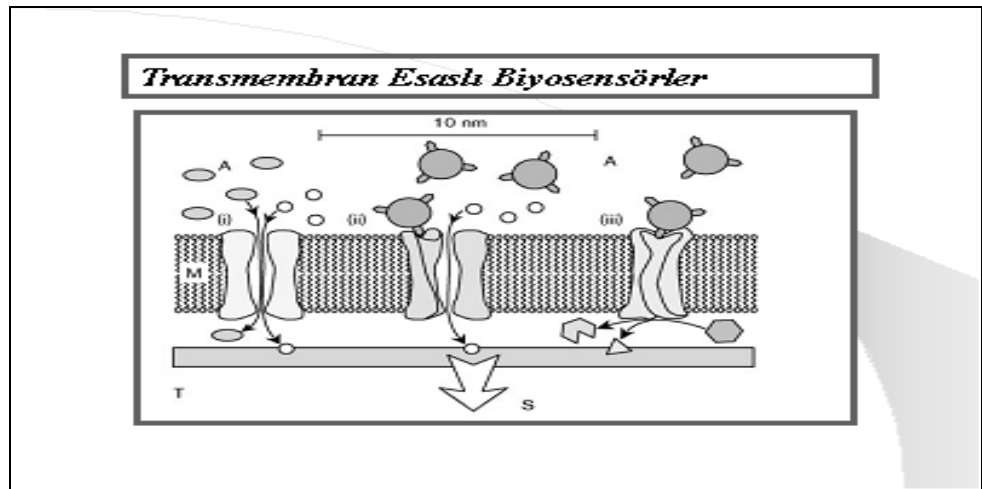
ii. İmmobilize Hücre Esaslı Biyosensörler : İletici sistem üzerinde enzim immobilizasyonu ile enzimin substratı, inhibitörü, aktivatörü veya koenzimi olan çeşitli kimyasal maddelerin tespiti yapılır.

iii. İmmobilize Hücre Esaslı Biyosensörler: İletici sistem üzerinde hücrelerin immobilizasyonu ile o hücreler tarafından metabolize edilen çeşitli maddelerin tespiti yapılır



Şekil 1.4. Biyokatalitik ve immobilize hücre esaslı biyosensörler. [6]

iv. *Transmembran Esaslı Biyosensörler*: Çeşitli moleküllere spesifik reseptör veya farklı membran proteinlerini içeren hücre membranlarının iletici sistem üzerinde immobilizasyonu ile istenilen moleküllerin seçimli bir şekilde tayinleri yapılır.

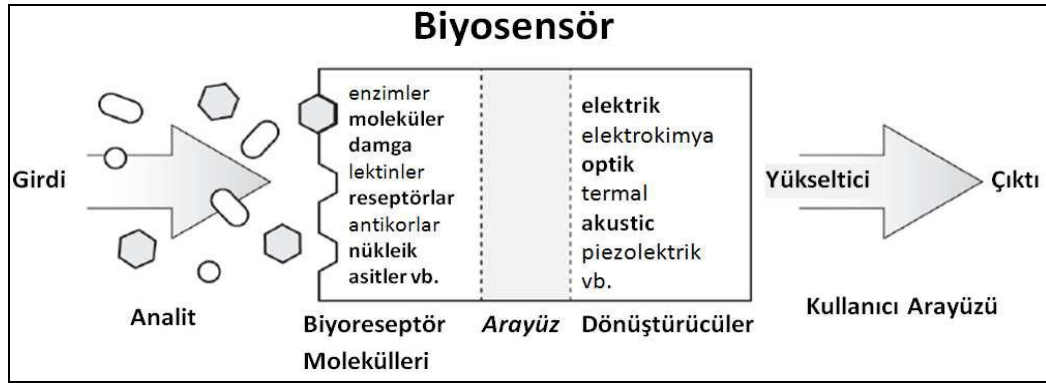


Şekil 1.5. Transmembran esaslı biyosensörler. [6]

1.2.Çeviriciler:

Biyosensörlerin, en önemli ikinci kısmı, biyolojik tanıma ajanının bulunduğu “tanıyıcı tabaka” dışındaki “Çevirici (Transducer)” bölümüdür.

Çeviriciler, biyoajan - analit etkileşmesi sonucu gerçekleşen fizikokimyasal sinyali elektrik sinyaline dönüştürerek, bu sinyalin daha sonraları yükseltilerek okunabilir ve kaydedilebilir bir forma girmesine öncülük ederler. Biyoajan - analit etkileşmesi sonucu olan değişimler, sadece tek bir değişimle ifade edilemez. Örneğin, glikoz ölçümü için kullanılan glikoz sensöründe glikoz, oksijenin varlığında glikoz oksidaz enzimi ile hidrojen peroksit ve glikonik aside parçalanır.



Şekil 1.6. Biyosensörler de çeviriciler. [32]

Bu tepkime sonucunda:

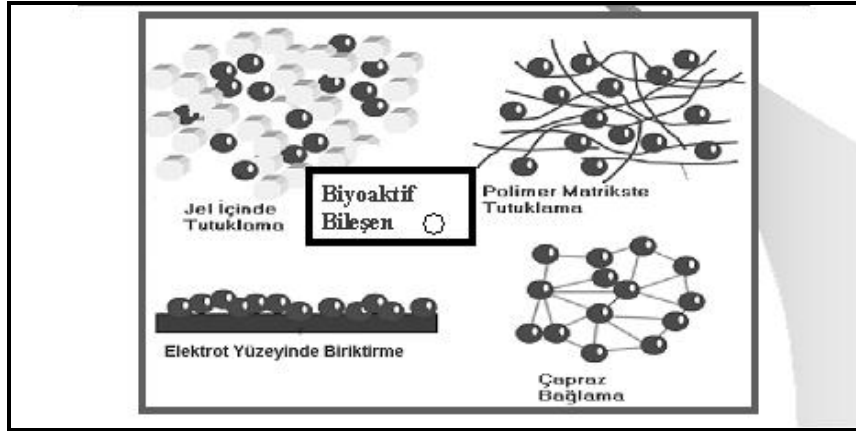
- Ortamda bir miktar oksijen tüketilir ve bu azalma bir oksijen elektrodu ile takip edilebilir mi?
- Ortamda glukonik asit arttığı için pH değişimi olmuştur ve bu bir pH metre ile ölçülebilir mi?
- Ortamda bir elektroaktif madde olan hidrojen peroksit açığa çıktığı için bu maddenin miktarı amperometrik olarak ölçülebilir mi?

Bu soruların cevabı hem evettir hem de hayırdır.

Çünkü, biyoajan-analit tepkimesindeki değişimin boyutları, mutlak ölçüt olarak nanogram, pikoamper, mikrovolt vb gibi çok küçük boyutlarda olabilmektedir. İşte bu evrede çeviricilerin önemi ortaya çıkmaktadır. Bu kadar küçük boyuttaki bir değişimi en sağlıklı, doğru ve orantılı olarak aktaran çevirici, o tepkime için ideal olarak değerlendirilir.

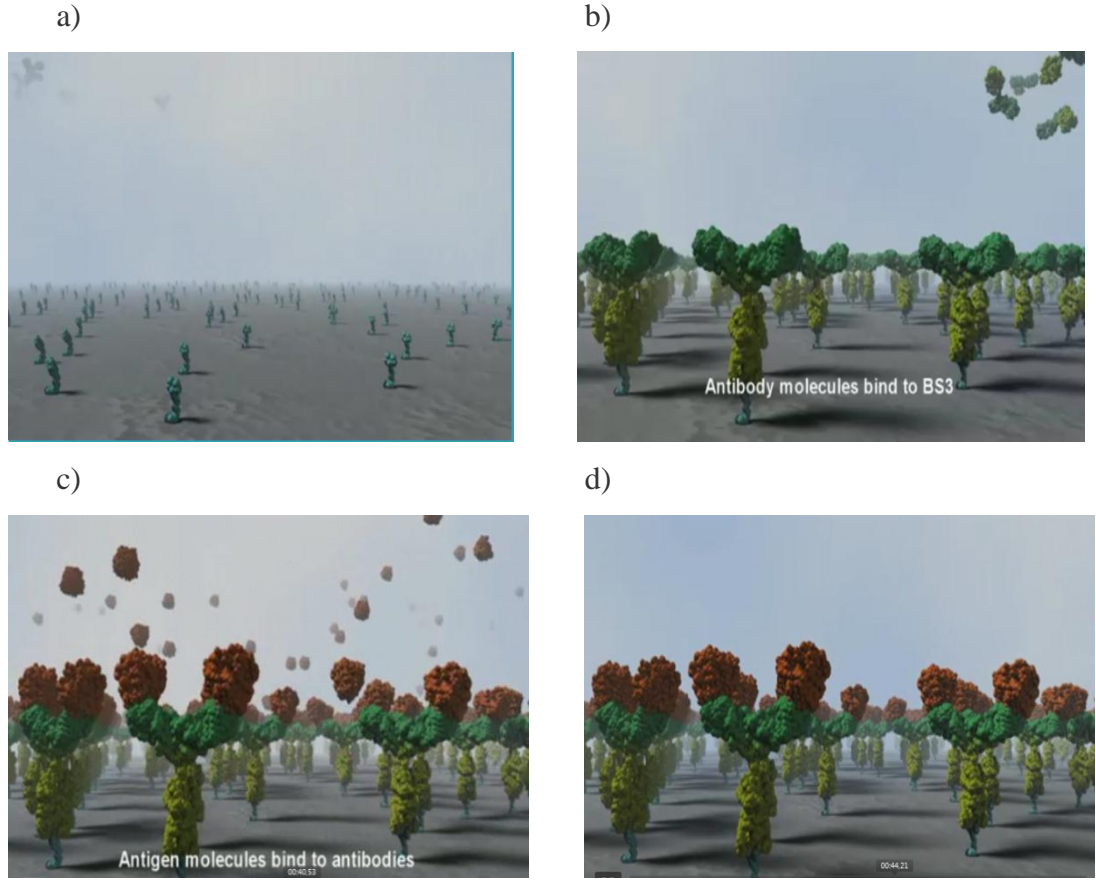
1.3. Reseptör Tutuklanması (immobilizasyonu)

Biyoaktif bileşen ile iletici unsurun birleştirilmesinde çok farklı immobilizasyon yöntemlerinden yararlanılabilir. Biyoaktif bileşen sensör olarak da ifade edebileceğimiz temel iletici unsur üzerinde fiziksel olarak, jel içinde veya polimer matrikste tutuklanabilir, elektrot yüzeyinde biriktirilebilir, kovalent veya çapraz bağlanarak immobilize edilebilir.



Şekil 1.7. Biyosensörlerin biyoaktif tabakalarında biyoaktif bileşen immobilizasyonunda kullanılan genel teknikleri. [6]

Aşağıdaki şekillerde altın yüzey üzerine antikorları bindirilmesi gösterilmiştir.



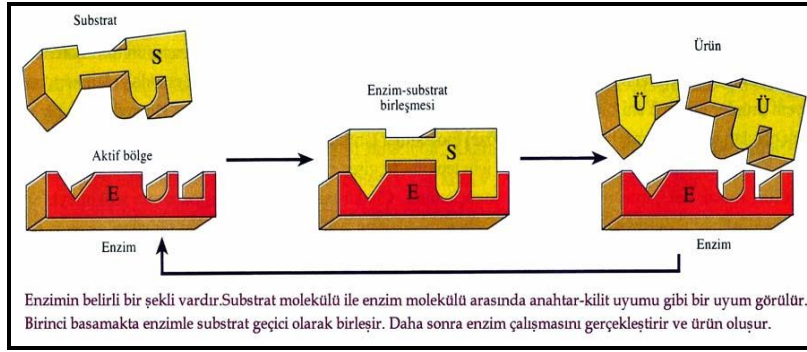
Şekil 1.8. Altın yüzey üzerine antikor bindirme. [10]

1.4. Biyoreseptör Molekülleri

Biyosensörlerin yapısında yer alan biyokomponentler (biyokimyasal bileşenler) çoğu kez biyoreseptör (biyolojik algılayıcı) olarak da adlandırılırlar. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler sensörlerde biyokomponent (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler transduser tarafından algılanır. Enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir.

1.4.1.Enzimler

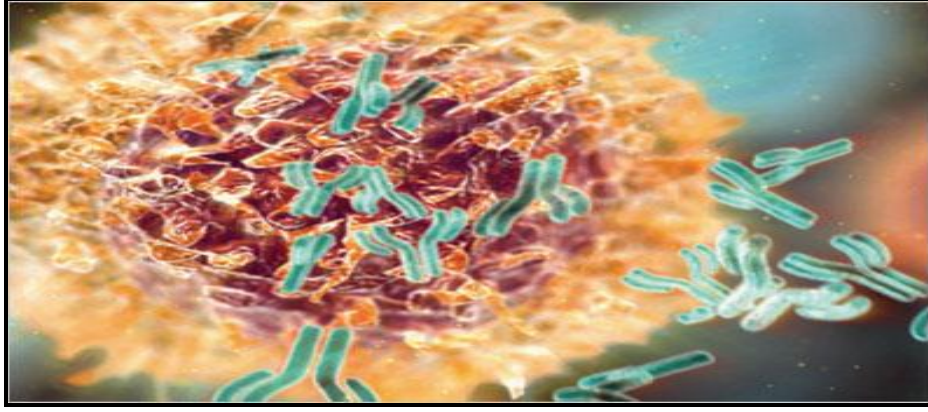
Enzimler, biyoreseptör moleküllerinin en çok bilinenidir. Her substrata özgü enzim vardır ve enzimlerin kendilerine özgü substrada karşı afinitesi vardır. Enzimler kimyasal reaksiyonlarda katalizör görevi alırlar ve binlerce kimyasal arasından ilgili oldukları substratı seçerler. Tekrar ve tekrar kullanılabilirler, kimyasal reaksiyonun aktivasyon enerjini düşürürler. Tüm kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da ortamın sıcaklığı, pH'sı, iyonik kudreti ve diğer çevre şartları oldukça önemlidir.



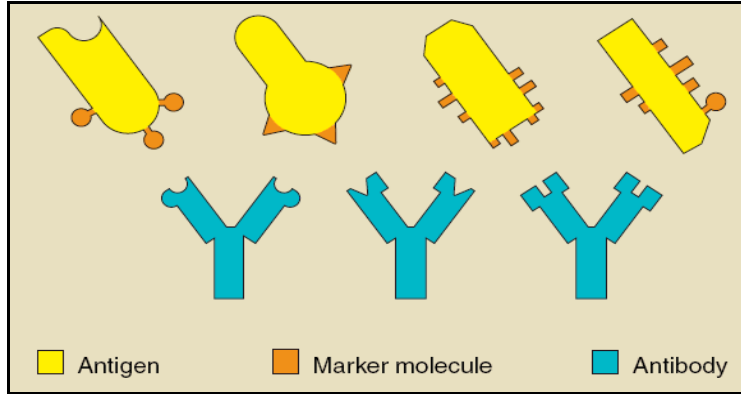
Şekil 1.9. Enzim ve substrat ilişkisi. [8]

1.4.2.Antikorlar

Bir glikoprotein olan antikorlar kandaki proteinlerin %20'sini oluşturular. Y şeklinde olup iki adet antijen tanıma bölgesi mevcuttur. Canlıların bağışıklık sisteminde antikorlar tarafından tanınan ve immün cevap oluşumuna sebep olan yabancı moleküllere antijen adı verilir. Antikorların, antijen tanıma bölgelerinin farklılığı kendi aralarındaki ayırt edici bir özelliktir. Her farklı antikor tıpkı enzimlerde olduğu gibi kendine özgün olan antijeni tanır ve ona geçici olarak bağlanır.



Şekil 1.10. Hücredeki antikorlar. [27]



Şekil 1.11. Hücredeki antikorlar, antijen ve marker molekülerin modellemeleri. [27]

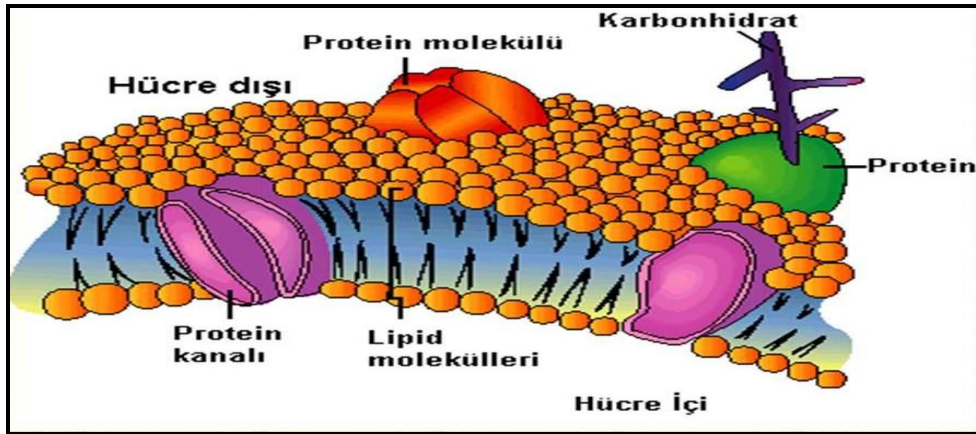
1.4.3. Aptamerler

Aptamerler rastgele sentezlenmiş tek zincirli oligonükleotidler olarak tanımlayabiliriz. Önce oligonükleotid sentezleyicisine zincir dizim sekansı bakımından trilyon adet farklı olasılıkta sentetik oligonükleotid üretilir. Sentetik oligonükleotitler ise biyosensör teknolojisinde biyoreseptör olarak kullanılır.

Antikorlara rakip olan bu moleküller gün geçtikçe uygulamada kendini daha fazla göstermektedir. Hatta son 10 yıl içinde özel yöntemlerle üretilen aptamer proteinlerin bazılarının altın ve bakır gibi madenlere karşı bile özgün bağlanma gösterdikleri görülmüştür. Bu da, özellikle yer altı suları üzerinden maden aramaları yapmak için orijinal biyosensör imalatının yapılabileceğinin işaretini vermektedir.

1.4.4. Reseptör proteinler

Reseptör proteinler biyolojik aktif bileşikler için yüksek ama özgün bağlanma gücüne sahiptirler. Yani, her bir farklı reseptör protein yalnızca kendine has bileşiğe bağlanabilir. Bu özelliklerinden dolayı biyoreseptör olarak biyosensör teknolojisinde kullanılmaktadırlar.



Şekil 1.12. Hücre zarının elektron mikroskopundaki kesiti. [7]

1.4.5. Diğer Adaylar

Biyosensörlerde biyoreseptör olarak kullanılmaya aday bir çok biyolojik materyal bulunmaktadır. Bu materyaller; bakteriler, hücreler, organeller, membran tabakaları bunlardan bazılarıdır. Herhangi bir biyomateryalin biyoreseptör amaçlı

kullanımı için, materyalin istenilen analiti bir şekilde özgün olarak tanıma kapasitesine sahip olması gerekir.

Çizelge 1.1. Doğal biyosensör ve üretilen dönüştürücü özellikleri.

BİYOSEPTÖR ÇEŞİTLERİ	YAPISAL BÜTÜNLÜK İÇİN GEREKLİ OLAN ANA İHTİYAÇ	ÜRETİLEN SİNYAL ÇEŞİDİ
Organ parçası	Bozulmuş doku	Aksiyon potansiyeli
Doku	Besin ve oksijen temini	Metabolik ürün
Hücrenin kendisi
Hücre organeli	Ozmatik ve asidik kararlılık	Elektron zincir ürünleri
Biyomembran(reseptör)	Mekanik koruma	Salınan içerikler
Enzim	pH ve elektronik kararlılık	Reaksiyon türü

Biyosensörler sekiz parametreye göre nitelendirilirler. [32]

1.5. Nitelikli Biyosensörlerde Aranılan Özellikler [6]

- 1-Duyarlılık: Cihazın analitteki değişime birebir cevap vermesi demektir.
- 2-Seçicilik: Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.
- 3- Ölçüm aralığı: Cihazın ölçebildiği analit konsantrasyonunun aralığıdır.
- 4- Ölçüm süresi: Bir tür cihazın ölçme hızını gösterir.
- 5- Tutarlılık: Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı ifade eder.
- 6- Tesbit sınırı: Cihazın tesbit edebileceği en düşük analit konsantrasyonunu ifade eder.
- 7- Ömrü: Cihazın, performansında gözle görülür bir azalma olmadan verdiği hizmet ömrünü ifade eder.
- 8- Kararlılık: Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki veya baz çizgisinde değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeridir.

Çizelge 1.2. Doğal biyosensörlerin avantaj ve dezavantajları.

KAYNAK	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
SAF ENZİMLER	Daha spresifik Difüzyon sorunu yok Daha kısa süreli analiz Kullanım miktarı az	Pahalıdır Kararlılığı düşük İmmobilizasyon problemi Kullanım süresi kısa
DOKU KESİTLERİ	Yüksek kararlılık Yüksek aktivite Düşük maliyet Kullanım kolaylığı	Difüzyon sorunu yoktur Daha uzun analiz süresi Mikroorganizma üremesine açık Gaz geçirgenliği az
MİKROORGANİZMALAR	Mekanik duyarlılığı yüksek Hazırlama kolaylığı Yüksek kararlılık Yüksek aktivite	Difüzyon sorunu vardır Daha uzun analiz süresi

Biyosensörler için çözülmesi gereken problemler şunlardır:

- Biyokomponentlerin ömrünün kısa olması
- Biyosensör hazırlamanın uzun sürmesi
- İmplant edilebilen sensörlerin steril tutulabilme güçlüğü
- Moleküler biyolojik prosesler hakkında yeterli bilgi birikimi olmaması

Biyosensörler için sonuç ve beklentilerimiz ise;

- Yüksek duyarlılık
- Kısa ölçüm süresi
- Gereksinime göre işlem akışı
- Ölçüm ve analiz giderinde düşme
- Otomatik ölçüm ve işlem alanının devreye sokulması

1.6.Biotin (H Vitamini)

Biotin, karboksilasyon ve transkarboksilasyon reaksiyonlarında koenzim fonksiyonu gören suda çözünebilen çift halkalı bir vitamindir. Biotin yapısındaki zincir sistemi nedeniyle sekiz adet stereoizomer oluşturur. Bunlardan sadece bir tanesi yani D-biotin, doğal formdur ve biyolojik olarak aktiftir. Biotin, bitki ve hayvansal ürünlerin yapısında da geniş şekilde yer almaktadır.

1.6.a.Biotinin Kimyasal Özellikleri

Diğer vitaminlere göre biotin oldukça stabildir. 4 M sülfürik asitle 120 °C'de 2 saat muamele edildiğinde bile dayanıklıdır. Bu işlemle biyolojik örneklerden toplam biotin ekstraktı elde edilir. Sıvı veya ince tabaka kromatografisi de biotinin biyolojik örnekten eldesinde kullanılabilir. Biotin tüm yaşayan canlılar için gereklidir. Ama sadece bitkiler değil, funguslar ve mikroorganizmaların çoğundan da biyosentezlenmektedir. Hayvansal kaynak olarak biotin, yumurta sarısında ve sütte bulunmaktadır.

1.6.b.Biotin-Enzim Bağlantısı

Biotin, üç sınıf enzime bağlıdır. Bunlar karboksilaz, transkarboksilaz ve dekarboksilazlardır. Tüm reaksiyonlar bu enzimlerin katalizörlüğünde gerçekleşir ve biotin CO₂ taşıyıcısı olarak rol alır. İnsanlar için günlük en az alınması gereken biotin miktarı 100 mg'dır. Çünkü biotin birçok besin maddesinde bulunur. Çiğ yumurta beyazı yiyerek beslenen hayvanlardan da biotin elde edilir. Biotin en çok proteinlerden avidin ile düzenli bağ yapar. Biotin avidin arasındaki bu ilişki moleküler biyolojideki araştırma ve teknolojilerde kullanılmaktadır. Bunun sebebi glikoprotein olan avidinin yumurta beyazından eldesindedir. Molekül ağırlığı 15.600 dür. Biotin için ilk antikor 1970 yılında Berger tarafından keşfedilmiştir. Şimdilerde daha fazla çeşidi geliştirilmiştir.

1.7.Streptavidin

Streptomyces avidini'nden elde edilen dört alt birimli (tetramerik) bir proteindir. Biotin-streptavidin kompleksinin ayrışma katsayısı (Kd) 10^{-14} mol/L mertebesindedir. Bu bağlanma doğada bilinen en kuvvetli non-kovalent etkileşimlerden biridir. Biyolojide, streptavidin moleküler yaygın olarak kullanılır. Çünkü biotin'e olan olağanüstü afinitesinin yanında, aşırı pH, sıcaklık, organik çözücüler, denatüranlar (guanidinium klorür gibi), deterjanlar (SDS, Triton gibi) ve proteolitik enzimler, streptavidin proteininin biotine bağlanmasını etkilemez. Çok olumsuz şartlara karşı dayanıklılığı ve çok küçük boyutta olması (3 nm civarında) nano aralıklı aygıtlarda etkin bir biyoalgılayıcılar olarak kullanılabilmesi avantajı sağlamaktadır. Zaman içinde biyosensörler beklenen üstünlükleri sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Lokelize Yüzey Plazmon Rezonans Tekniği (LSPR)

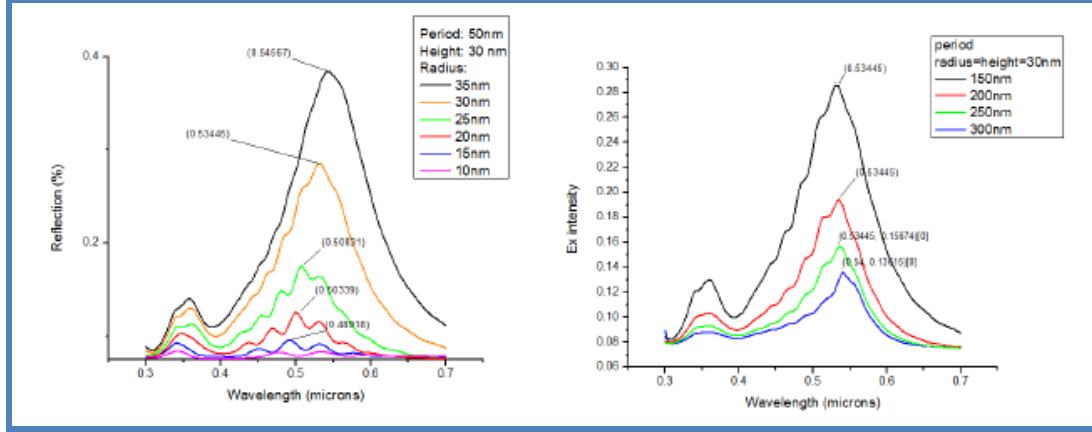
Bir yüzeyde, UV-V bandında elektromanyetik dalgalarla nano boyuttaki metal parçacıklarının uyarılması sonucu, yüzeyde bulunan bütün atomların elektronlarının belirli bir frekansa veya dalga boyunda rezonansa girerek maksimum enerji soğurması durumudur. Metal nanoparçacıkların rezonans girmesi için gerekli dalga boyunda, ortamın kırıcılık indisi önem arz etmektedir. Metal nanoparçacıklara yapışan herhangi bir malzeme materyalin rezonans frekansın değiştirecektir. Bu nano boyuttaki değişiklikler rezonans frekansındaki şiddet artımı ve dalga boyundaki değişmeler dedekte edilerek algılanır. Madde yüzeyinde etkileşim sonucu meydana gelen rezonans frekansındaki değişimler tespit edilerek kullanılan yöntem Lokelize Yüzey Plazmon Rezonans tekiniği'dir. Bu teknikle kanser teşhisi, bakteri ve nano boyuttaki biyolojik malzemelerin dedeksiyonu ve gıda sağlığı ve güvenliği için etkin teşhis yapılabilmektedir.

Lokelize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR) tekniğine dayalı nano-biyosensör tasarımı ile ilgili çalışmalar yapılmış ve çok az bir numune ile tespit yapılmıştır. Ölçüm sisteminin kolaylıkla kurulabilir olması ve diğerlerine nazaran daha ucuz olması, portatif ve pratik kullanım sunması ve tespite özel bir geometriye gerek olmaması avantaj sağlamıştır. E-Coli Bakterisine Duyarlı Plazmonik Nano-Biyo Sensör Tasarımı bunlardan bir tanesidir.

Bu teknikte biyolojik sensörler, nano boyutlarda şekillendirilmiş yüzeylere uygulanan kimyasalların; nano parçacıkların bulunduğu ortamın kırılma indeksini değiştirerek; LSPR dalga boyunda oluşturduğu kayma miktarının ölçülmesi esasına göre çalıştığı gözlenmiştir. Biyo-sensör çalışmaları simülasyonlar, fabrikasyon ve ölçümlerden oluşmaktadır.

Simülasyonlarda safir alttaş üzerinde periyodik sıralanmış silindir şeklinde gümüş nano-parçacıklar, farklı periyot ve yarıçaplar ile denenmiştir. Simülasyon sonuçları Şekil 2.1'de görülebilir. [1]

Fabrikasyon aşaması Elektron Işın Litografisi metodu ile yapılmakta ve bu sayede nanoparçacıkların şekil, büyüklük ve periyodunun daha hassas şekilde belirlenmesi sağlanmıştır.



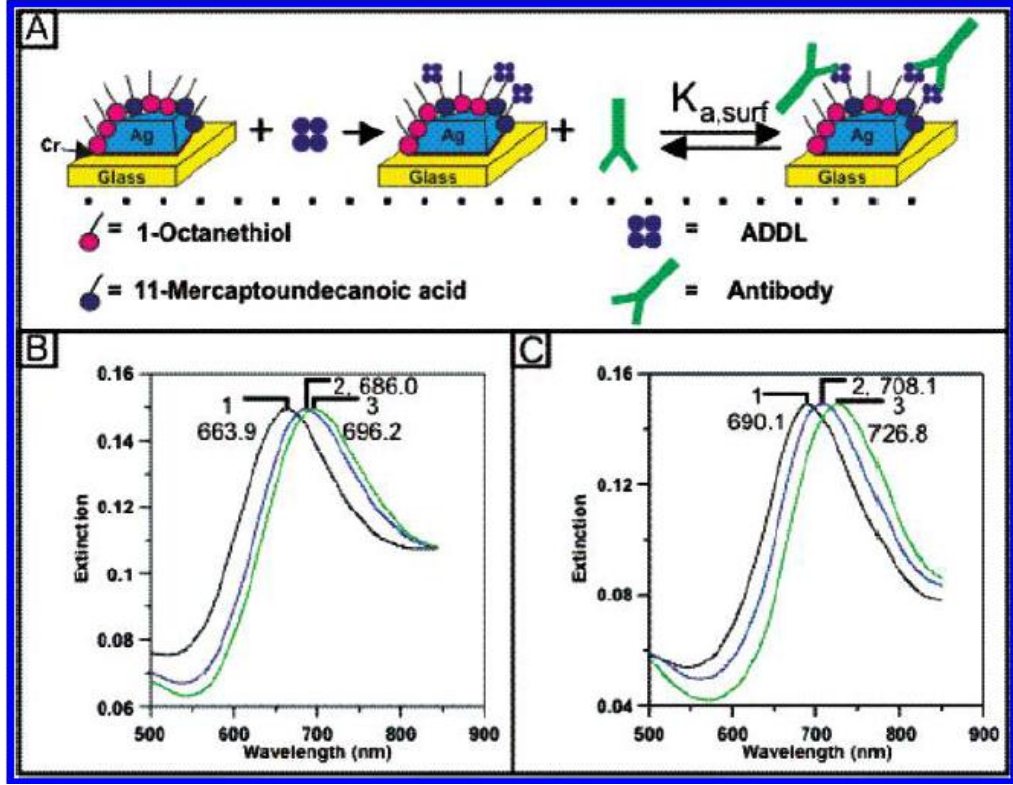
Şekil 2.1. Safir alt taş üzerinde, gümüş nano-parçacıkların dalga boyuna göre yansıma miktarı. Sol - Yarıçapa göre. Periyot 150 nm, yükseklik 30 nm, yarıçap 10-35 nm arasında değişmekte, Sağ- Periyoda göre. Yarıçap ve yükseklik 30 nm’de sabit, periyot 150-300 nm arasında değişmekte. [1]

Yine Alzmyer hastalığı teşhis ve tespit için LSPR tekniği kullanılarak elde edilen biyosensörler kullanılmıştır.

Ag nanoüçgenlerin optik özelliklerine göre Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR) nanosensörlerin merkezlenmesi gösterilir. Alzheimer hastalığıyla ilgili çalışmaların gelişiminde, ilgili muhtemel molekülerin etkileşim β - türetilmiş yayılabilir ligandları (ADDL) ve anti-ADDL antikor arasındaki etkileşim anlayışına yardımcı olmuştur.

Anti-ADDL antikor konsantrasyonunun değiştirilmesiyle, bir yüzeyi $3,0 \cdot 10^{-7} M^{-1}$ bağlama konsantrasyonunda hapsedilmiş anti-ADDL ‘ler ve ADDL’lerin etkileşimi için ölçülmüştür. Cr, nano parçacıklarının yapışma tabakasının etkilerinin, bu tahlilin duyarlılığı olarak sınırlayıcı bir faktör olduğu gösterilecektir. Bu LSPR nanosensör ilk nanomodel uygulamadır.

Şekilde de görüleceği üzere; Ag aygıt üzerine öncelikle antijenleri bağlanması sağlanır. Sonra ise ADDL’ler, daha sonrasında da ADDL’ler antikorların bağlanması sağlanmıştır. Yüzeyden alınan LSPR algılaması ile oluşturulan E-W grafiği ile değişimler gözlenmiştir.



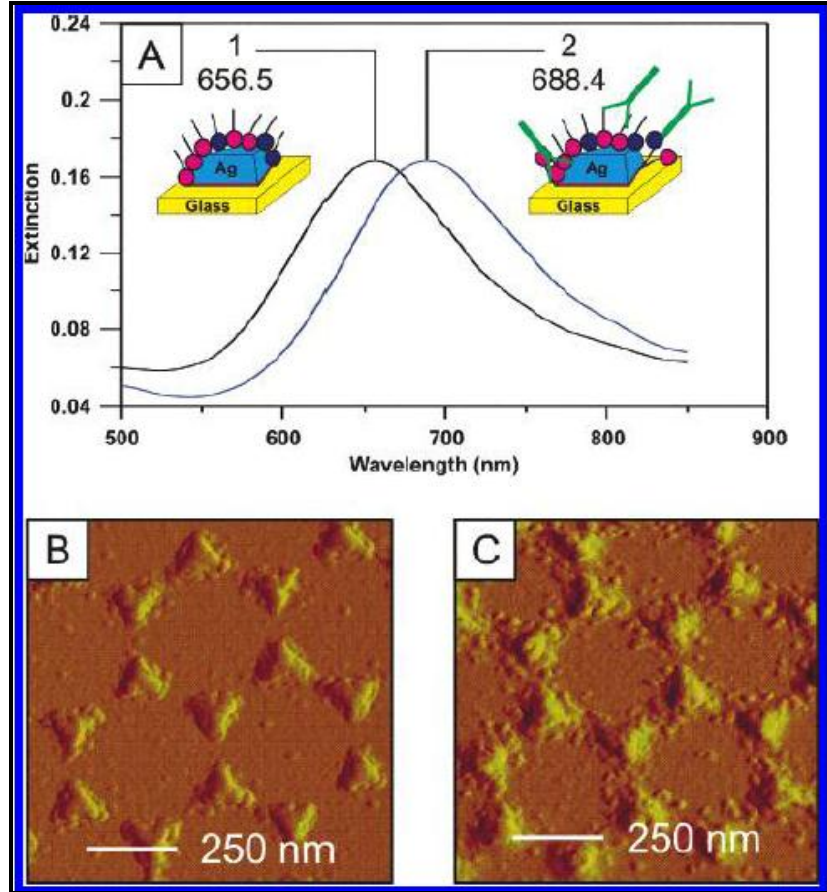
Şekil 2.2. Anti-ADDL tespiti için LSPR biyosensör tasarımı. (A) Ag nanoparçacık sensörünün yüzey kimyası. Yüzey-sınırlı. (B) anti-ADDL antikorun bir düşük konsantrasyonda Ag nanobiosensor hazırlanması her adımı için LSPR spektrumu. [3]

Ag nanoparçacık NSL kullanılarak sentezlenir. Cam alt-tabakaya yapışma nanoparçacık 0,4 nm Cr tabaka kullanılarak yükseltilir. Nanoparçacık bir SAM oluşturulması için bir 3:1 1-OT/11-MUA çözelti içinde inkübe edilir. Daha sonra, numuneler, 100 mM EDC/100 nM ADDL çözeltisinde bekletilir.

Son olarak, bir anti-ADDL immunoeseey de antikorun değişik konsantrasyonlarında ADDL kaplı nanoparçacıklar kuluçkalanarak tamamlanır.

Ag nanoparçacıklar sonra (B-1) 1 mM 3:1 1-OT/11-MUA, $\lambda_{\max} = 663.9$ nm, (B-2) 100 nM ADDL, $\lambda_{\max} = 686.0$ nm ve (B-3) 50 nM anti-ADDL, $\lambda_{\max} = 696.2$ nm ile modifiye edilir. Tüm spektrumlar, bir N₂ ortamında toplanmıştır. (C) Anti-ADDL yüksek bir konsantrasyonda Ag nanobiosensor hazırlanması her adımı için LSPR spektrumu gösterilmiştir.

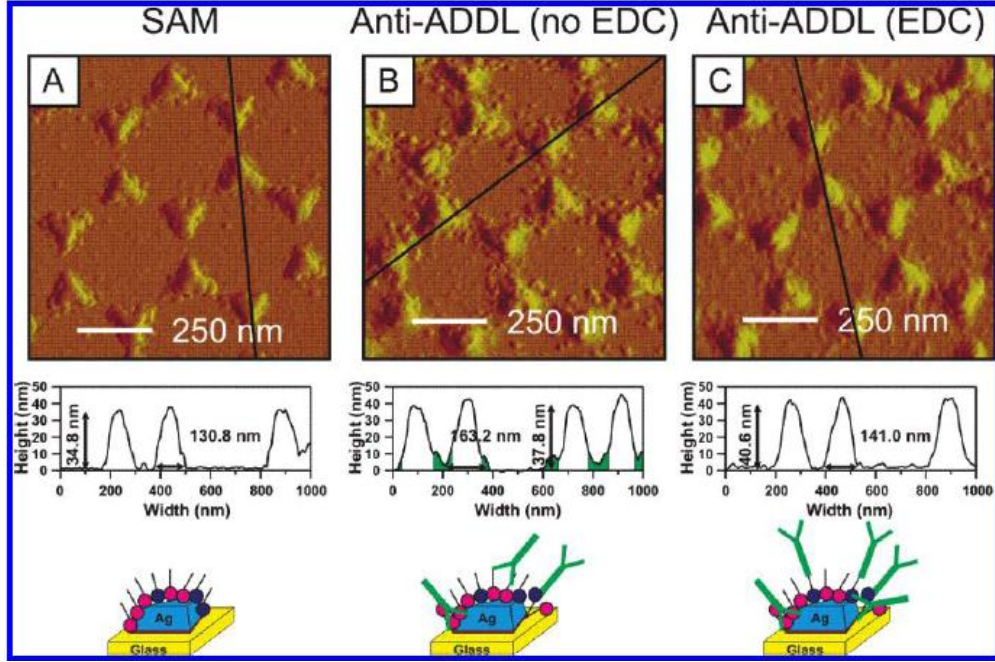
Ag nanoparçacıkları sonra (C-1) 1 mM 3:1 1-OT/11-MUA, $\lambda_{\max}= 690,1$ nm ile değiştirilmesinden sonra, (C-2) 100 nM ADDL, $\lambda_{\max}=708.1$ nm ve (C-3) 400 nM Anti-ADDL, $\lambda_{\max}= 726,8$ nm de değişiklikleri. Tüm spektrumlar ina N₂ ortamı toplanmıştır.



Şekil 2.3. Bir Ag biyosensör ile kovalent bağlanmayan ADDL ye anti-ADDL antikorun spesifik olmayan bağlanmasını gösteren LSPR spektrumları. [3]

Ag nanoparçacıklar 1 mM 01:3 11-MUA/1-OT, $\lambda_{\max}= 656.5$ nm de modifiye edilmesinden sonra (A-2) 100 nM, anti-addl, $\lambda_{\max}=688,4$ nm de Ag nanoparçacıklar, 1 mM 1:3 11-MUA/1-OT, $\lambda_{\max}= 656,5$ nm ile değiştirilmesinden sonra Ag nanoparçacıklar. (A-2) 100 nM, anti-ADDL, $\lambda_{\max}= 688,4$ nm ile modifiye Ag nano parçacıkları görülmektedir. Tüm sönme ölçümleri, bir N₂ ortamında toplanmıştır.

(B) Ag nanopartikülerin AFM görüntüsü SAM ile fonksiyonlandı.(3A-1 de spektumun karşılığı) (C) 100 nM anti-ADDL ile Ag nanopartikülerin AFM görüntüsü modifiye edildi. (3A-1 de spekturumun karşılığı)



Şekil 2.4. Bir AFM modunda dokunma ve SAM kaplı Ag nanoparçacık biyosensör için anti-ADDL arasında spesifik olmayan bağlanmasının çizgi tarama analizi. [3]

(A) Ag nano parçacıklar 3:1 1-OT/11-MUA (ortalama yükseklik) 34,8 (3,15 nm, ortalama genişliği) 130.8 (1.85 nm) ile yapılan modifikasyonlar.

(B) Ag nano parçacık (SAM tabaka ile) 100 nM anti-ADDL çözeltisinde (EDC yokluğunda)(ortalama yükseklik) 37.8 (1.68 nm, ortalama genişliği) 163.2 (10.2 nm) değişimleri.

(C) EDC mevcudiyetinde bir 100 nM anti-ADDL çözeltisinin doğrudan bağlantı (ortalama yükseklik) 40.6 (2.46 nm, ortalama genişlik) 141.0 (6.11 nm) ile değiştirilmesinden sonra (SAM tabaka ile yeni bir Ag nano parçacık numune. [3]

2.2. Termal Buharlaştırma Sistemi (PVD)

Metal kaplamada en çok kullanılan tekniklerdendir. PVD sistemi mikro ve nanofabrikasyon süreçlerinde örneklerin yüzeylerine metal kaplamalar yapmak üzere kullanılan bir yöntemdir. Sistemde genellikle yüksek buhar basıncına sahip ve kolay kontamine edilen metaller termal yöntem ile buharlaştırılmaktadır. Minimum vakum seviyesi $2e-6$ Torr seviyesinde olan bir sistemdir. Sistemde iki adet buharlaştırma kaynağı kullanılabilir. Kaynak örtücüleri ve örnek döndürme özellikleri ile 100 mm çaplı alttaşlara homojen kaplamalar yapılabilir. Sistem yarı otomatik bir sistemdir.



Şekil 2.4. Termal buharlaştırma sistemi.

Katı bir metalin rezistif olarak ısıtılması sonucu buharlaştırılarak, serin bir yüzey üzerinde biriktirilmesiyle oluşur. Ancak, bu yöntemde yüzeyde pürüzlülük problemi ortaya çıkmaktadır.

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

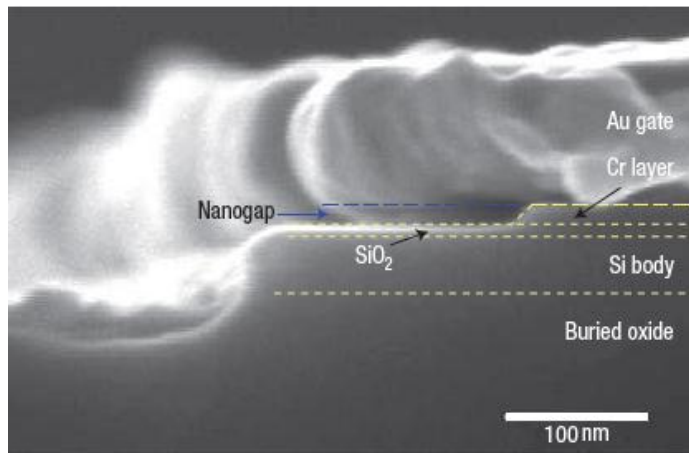
Plazma biriktirme sistemi ana hatlarıyla, içerisinde plazmanın elde edildiği reaktör, birbirine paralel, disk şeklinde iki elektrot, gazların bileşenlerine ayrılması için radyo frekanslı gerilim uygulayan RF jeneratörü, reaktöre kontrollü bir şekilde gaz akışını sağlayan iğne vana, akış ölçer ve düzenleyicilerin olduğu gaz girişleri ile çıkıştaki mekanik vakum pompasından oluşmaktadır.



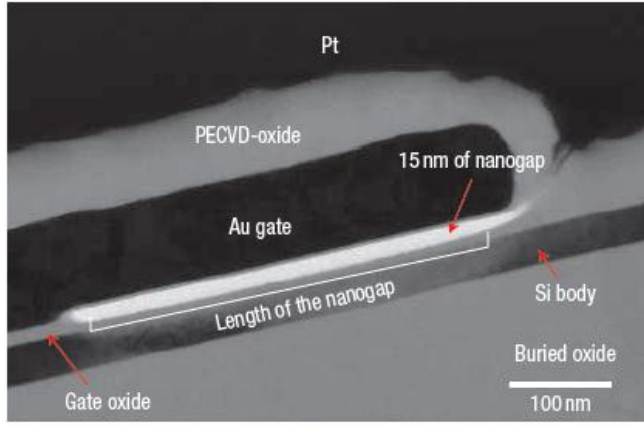
Şekil 2.5. PECVD yöntemi.

Bu yöntem, plazma oluşturmada çok sık kullanılmakla birlikte ileri teknoloji gerektiren büyük boyutlu elektronik aygıtlarda, ince film üretimi ve inceltme yöntemlerinde tercih edilmektedir.

Tasarlanan aygıtta tabakanın elektron ışınından gördüğü zararı azaltmak için buhar biriktirme (PECVD) yöntemi ile bir SiO_2 tabaka (PECVD-oksit) plazma geliştirilmiş kimyasal kullanılarak altın tabakası üzerinde biriktirilmektedir. TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu)'in bir arka plan malzemesi olarak platin tabakası biriktirilir. Şekilde, platin ve altın yüksek atom numarası nedeniyle, siyah görünür ve nanogap bölge beyaz görünür.(Şekil 2.6-7) [4]



Şekil 2.6. 200-nm-büyük nanogapda SEM görüntüsü. [4]



Şekil 2.7. 400-nm büyük nanogapda TEM görüntüsü. [4]

2.4. Atomik Katman Biriktirme (ALD)

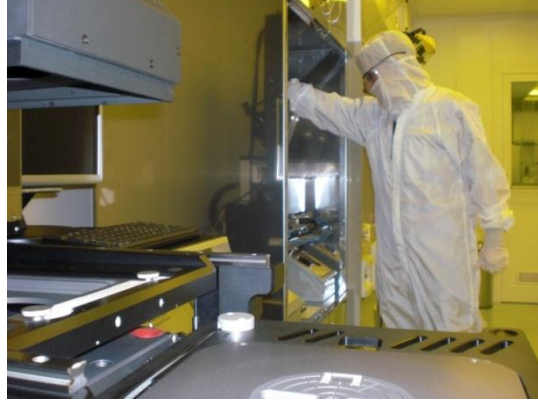
Bu yöntemle pürüzlülükler ortadan kaldırılır. Aslında ALD tekniği, bir çeşit Kimyasal Buhar Biriktirme (CVD) yöntemidir. Tepkimede tek bir atomik katmanın oluşmasından sonra doyuma ulaşip kaplama durmaktadır. Bu sayede kaplanan kalınlık kontrolü sağlanmış olur. Ayrıca homojen bir kaplamanın gerçekleştirilmesi ve en zor geometrik şekilli yüzeylerin dahi konformal olarak kaplanması mümkün hale gelmektedir. ALD ile prosesinde asla gaz fazında gerçekleşen reaksiyon olmaz. Sıralı proses uygulanarak bütün reaksiyonların yüzeyde gerçekleşmesi sağlanır. Yüzeyler tamamen bir atomik katman ile kaplandıktan sonra reaksiyon sona erer. Bu durum istenen bir özelliktir. Oluşturulan filmler stokiometriktir. Yani her elementin oranı sabittir.



Şekil 2.8. ALD yöntemi.

2.5. Fotolitografi

Fotolitografi istenilen bir kalıbın materyal üzerine aktarılmasında kullanılan bir tekniktir. Bunun için maske üzerine aktarılan örnek bilgisayar programı (CAD) yapılır. Maske cam levhadan yapılmıştır. Yüzeyinde, ışıkla tanımlanabilir opak bir materyal olan krom yer alır ve materyal istenilen şekli taşımaktadır.

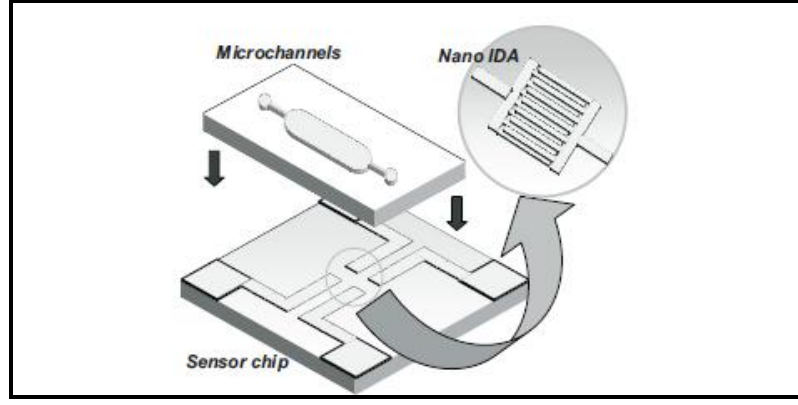


Şekil 2.9. Fotolitografi yöntemi.

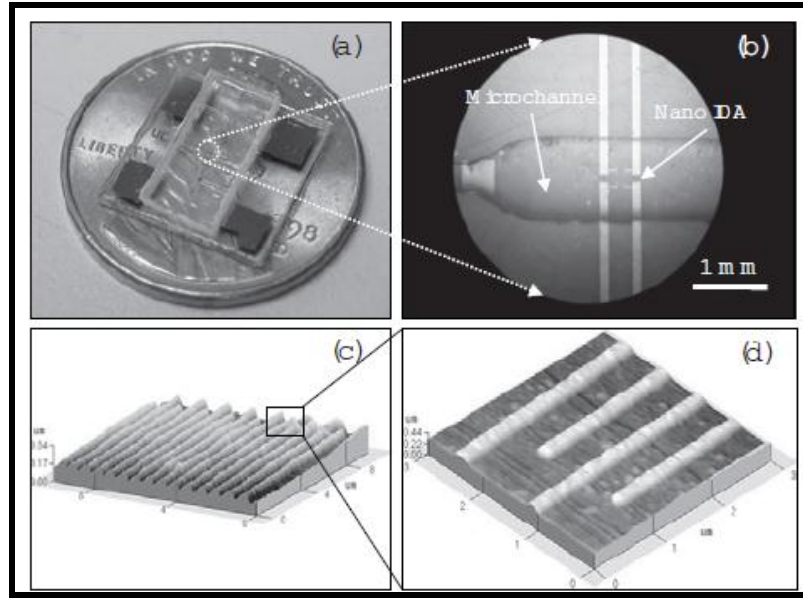
Maske hazırlığı tamamlanması ile altlık, ışığa duyarlı organik bir polimerle kaplanması ile şekil aktarılması başlar. Altlık ile maske birleştirilir. Maskenin şeffaf kısımlarının altındaki ışığa duyarlı polimerlerin çözülerek çözelti haline gelmesi maske içerisinde ışığa duyarlı organik polimerlerin üzerine UV ışık gönderilmesi ile olur. Bu kabartma işlemine pozitif fotorezist (fotodirenç) denir.

2.6. Nano Aralık Temelli Biyosensörler

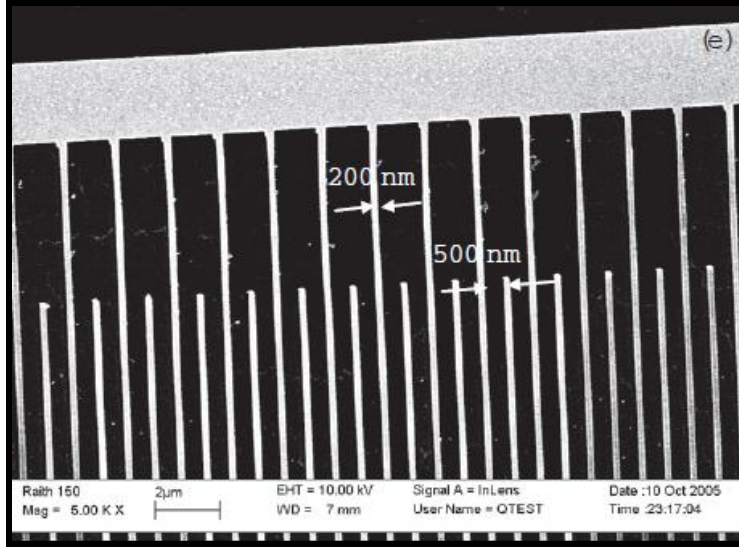
Bu tip biyosensörler, minimum seviyede aygıt olması ve en küçük düzgün elektrik alanda en az numune ile hedef moleküllerin algılanmasını sağlayan aygıtlardır. Çok çeşitli üretim teknikleri ile fabrikasyonu yapılmış nanobiyosensörler ile ilgili bazı çalışmaları Şekil 2.10-11-12' de gösterilmiştir. Bu aygıtlar kimyasal depolanan ve litografi yöntemi ile üretilmişlerdir. Ancak yüksek üretim maliyeti ve uzun fabrikasyon şu an için problem teşkil etmektedir.



Şekil 2.10. Polimer yüzey ve bir polimer mikro akışkan çip üzerinde bir Au nano IDA içeren cihazın şematik görünümü. [2]



Şekil 2.11. Nanocihaz fotoğrafları: (a) tüm çip, (b) nano IDA'nın mikroskop görüntüsü, elektrik bağlantıları ve Mikrokanallar, (c), (d) AFM.

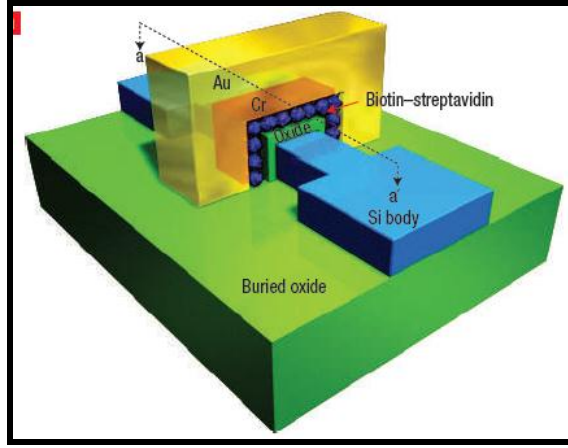


Şekil 2.12. (e) Polimer substratta (numune) nano IDA dizilerin SEM görüntüleri. [2]

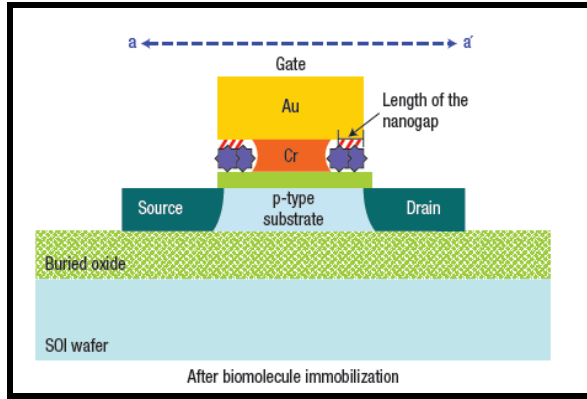
Nano cihaz HP 4284A LCR metre kullanarak çeşitli konsantrasyonlarda elektrik KCl çözeltisi içinde karakterizedir (Şekil 2.8).

Alan etkili transistörler (FET) de biyosensörler merkez alınarak çalışmalar yapılmıştır. Bir yarı iletken kanalından şarj akışını kontrol ettiği elektrikle çalışan bir geçit, yarıiletken teknolojisi içinde entegre biyo algılayıcıların beklentisi ile tahrik edilir.

Çok sayıda önerilen FET biyosensör kanal veya kapının çalışmasındaki etki çözelti içerisindeki biyomoleküller ile yüzey etkileşimleridir. Bununla birlikte, bu cihazlar çoğu zaman sınırlı hassasiyetlere sahiptir. Burada gösteriyor ki FET biyosensör, dikey kapı, biyotin ve streptevidinin spesifik bağlanmasına duyarlıdır. [4]



Şekil 2.13. Nano transistor yapının üç boyutlu görüntüsü; silikon gövde (mavi), gömülü oksit (yeşil) ve krom (turuncu) ve altın (sarı) elektrotlar. [4]



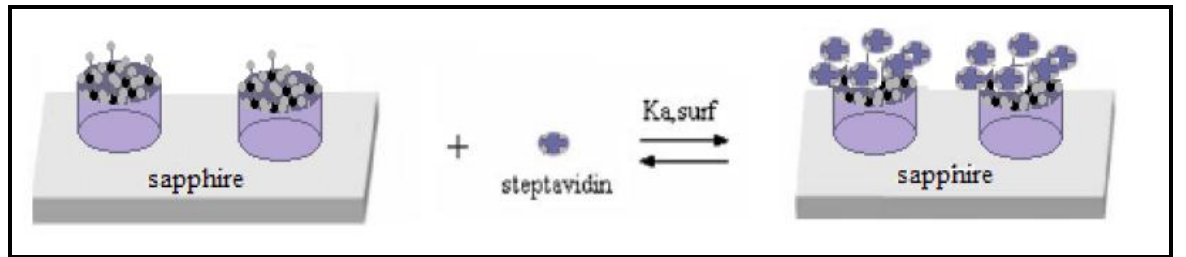
Şekil 2.14. Nano Transistor Yapının Dizaynı. Doldurulmuş nanokapı da noktalı çizgi doğrultusu boyunca cihazın bir kesiti gösterilmiştir. Silikon vücutta implante fosfor kaynak ve boşaltma elektrotlarından oluşturulmaktadır. [4]

Silikon gövdesinin dar bölgesi, aktif silikon bölgesini (kanal) oluşturmaktadır. Krom tabaka ile kısmen doldurulabilir bir hava boşluğu meydana getirecek kazınmış biyomoleküller. [4]

2.7.Sensör Fabrikasyonu

LSPR yöntemi kullanılarak elde edilen “E-Coli Bakterisine Duyarlı Plazmonik Nano-Biyo Sensör Tasarımı” fabrikasyonda ilk adımında safir alttaş hazırlanmış ve alttaş hem E-line resisti ile hem de aquasave ile kaplanmıştır. Sonrasında ise “Elektron Işın Litografisi” tekniği ile nano-silindirler hazırlanan yüzeyde yazdırılmış. Üzerine “Elektron Işın Buharlaştırıcı” ile gümüş metal kaplanarak fabrikasyon tamamlanmıştır.

Sensör yüzeyinin belirli bir bakteri ya da ajana duyarlı hale getirilmesi amacı ile iki aşamalı çalışma planlanmıştır. İlk olarak yüzey “biotin-avidin” adı verilen ve birbirini ile çok kuvvetli bağ yapabilen bir malzeme çifti ile deneme yapılır. İkinci evrede ise biotine konjuge edilmiş E-Coli antikorunun, E-Coli antijeni ile bağ yaptığı tespit edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle gümüş yüzeyin üzerinde “Self-Assembled Alkanethiol Monolayer (SAM)” oluşturulmuştur. Burada amaç; “biotin” maddesinin amid bağlar ile SAM yüzeye kovalent olarak bağlanabilmesidir. Numunelerin farklı konsantrasyonlardaki avidin solüsyonlarına daldırılmasıyla avidin malzeme ile yüzeye tutturulan biotin malzeme bağ yapacak ve böylece ortamların kırılma indislerinde değişiklik meydana gelecektir. Bu durumda ortamın kırılma indislerine duyarlı LSPR dalga boyunda kaymalara sebep olacaktır. Buradaki sapmlar her yüzey fonksiyonelleştirmede geçirim ölçümleri ile ölçülerek kayma miktarlarına bakılacak ve avidin varlığı ve konsantrasyonu hakkında veri elde edilecektir. Bu durum aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.(Şekil 2.15) [1]

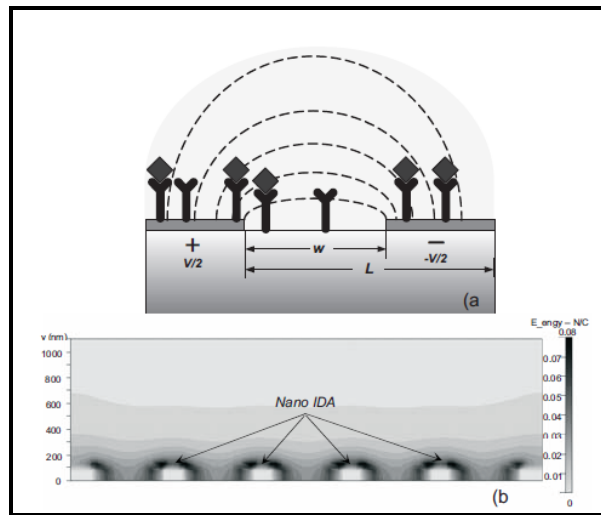


Şekil 2.15. Yüzey fonksiyonelleştirme adımı, çeşitli kimyasallar gümüş nano-silindirler üzerine yapıştırılarak biotin malzemenin yapışacağı bir yüzey oluştururlar. Biotin ise, örnek avidin çözeltisine daldırıldığında avidin ile bağ yapar. [1]

Mikroakışkan sistem ile polimer yüzeyde bir entegre nano interdiijite bir elektrotlar dizisi (IDA) çalışmasında: Genomik, proteomik ve hüresel analiz için hassas ve kolay kullanılabilen bir impedimetrik sensör minyatüre edilmiş.

Tek kullanımlık lab-on chip uygulamaları için de kullanılan altın (Au), ideal polimer (Cyclic Olefin Copolymer, COC) subratta nano IDA başarıyla desenlenmiş ve fabrikasyon işleminde cihaz elektrokimyasal impedimetrik spektroskopisi (EIS) kullanılarak KCI tuz çözeltisinde karakterize edilmiştir. Ön izleme protein bağlama sonucu protein immunosensörler için kullanılmak üzere bu cihazın nasıl bir potansiyel sağladığı hem de protein bağlanmalarının ön izleme sonuçlarını gösterdiği görülmüştür.

EIS (Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi) solüsyon içinde kullanılarak duyarlı yüzey analizleri ve biyomoleküler aktivitelerin yüzey algılamalarında yüksek yoğunlukta IDA kullanılmaktadır. Küçük bir AC gerilimi, elektrot çiplerine uygulandı, böylece hücrelerin değişik konsantrasyonları veya yüzeye bağlı biyomoleküllerin elektrotlar arasındaki elektriksel empedansındaki farklı değişimleri vereceği gözlemlenecektir. Bu etki teorik olarak analiz edilmiştir.



Şekil 2.16. NanoIDA: (a) Polimerde bir Au nano IDA protein bağlayıcı impedimetrik sensörün dizaynı ve (b)Suda nano IDA'nın elektrostatik enerji dağılımının FEA simülasyonu ($L = 700 \text{ nm}$, $W = 200 \text{ nm}$, ve $V = \pm 25 \text{ mV}$). [2]

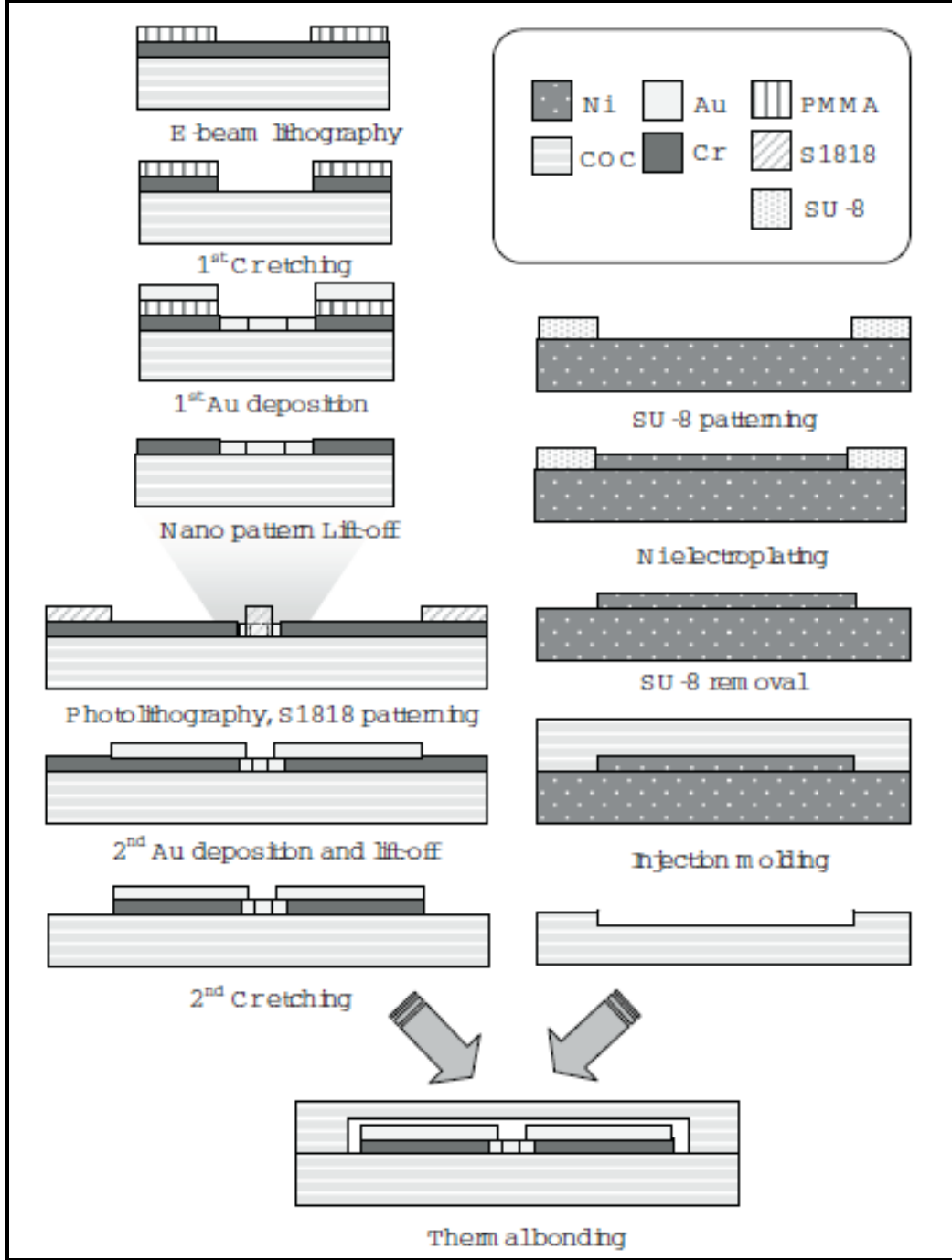
Entegre mikro akışkan sistemi ile polimer üzerinde Au nano IDA'nın şematik illüstrasyonu Şekil 2.16'de gösterilmiştir. Polimer mikroakışkan çiplerin kullanılması ile analit tüketimi ve toplam algılama süresi önemli ölçüde azalır.

FEA simülasyon, su içinde Au nano IDA çevresindeki elektrik alan enerjisini analiz etmek için kullanılır. Şekil 2.12'de gösterildiği gibi, su ortamında Au elektrotların üç çifti, 100 nm yüksekliği, 200 nm genişliği ve 500 nm aralığı ile modellenmiştir.

Simülasyon sonucu açık bir şekilde, proteinlerin bağlanmasıyla sensör yüzeyinin 600 nm içinde tüm elektrik alanların konsantrasyonunu gösterir. İmalat işlemleri, Şekil 2.17 'te özetlenmiştir. Bir 3 inç boşlukla çok iyi pürüzsüz yüzeyi olan COC alttaş hazırlanır. Ni kalıp disk yüzeyi, plastik enjeksiyon teknikleri ile yüzey son derece iyi parlatılır.

İlk önce COC ile yüzey uyumlu hale getirmek için E-Işın litografisi ile 10 nm Cr tabaka buharlaştırılır. Elektron dirençli Polimetilmetakrilat (PMMA), COC' un nispeten düşük erime noktası spin kaplamalı ve ön ısıtma koşuluna bağlı olarak ayarlanır. E – Işın Litografisi, PMMA da açığa çıkan Raith-150 sistemi tarafından gerçekleştirilir. Nano desen geliştirme ve CR gravür sonra tanımlanır. Daha sonra bir 100 nm Au tabaka E-ışın metal buharlaştırıcı tarafından (E-beam tarafından) desenli alt tabaka üzerinden buharlaştırılır. Nano desen geliştirme ve Cr gravür sonra tanımlanır. Daha sonra, bir 100 nm Au tabakası E-beam tarafından desenli alt tabaka üzerinde buharlaştırılır. Numuneye, daha sonra Lift-off tekniği ile aseton yerleştirilir. Au nano IDA bu adımda oluşturulur. Sonra nanofabrikasyon, fotolitografi teknikleri, pedlerin elektrik bağlantıları ile Au nano IDA'nın nanomikro ara yüzeylerin desenlendirilmesi için kullanılır.

İkinci bir Au katman (200 nm) nano fabrikasyonla, elde mevcut temas noktalarını kapsayan kısımları buharlaştırıldı. Numune, daha sonra lift-off için aseton içine daldırıldı. Son olarak, tüm gereksiz Cr kazınarak dışarı atılmış olur. [2]

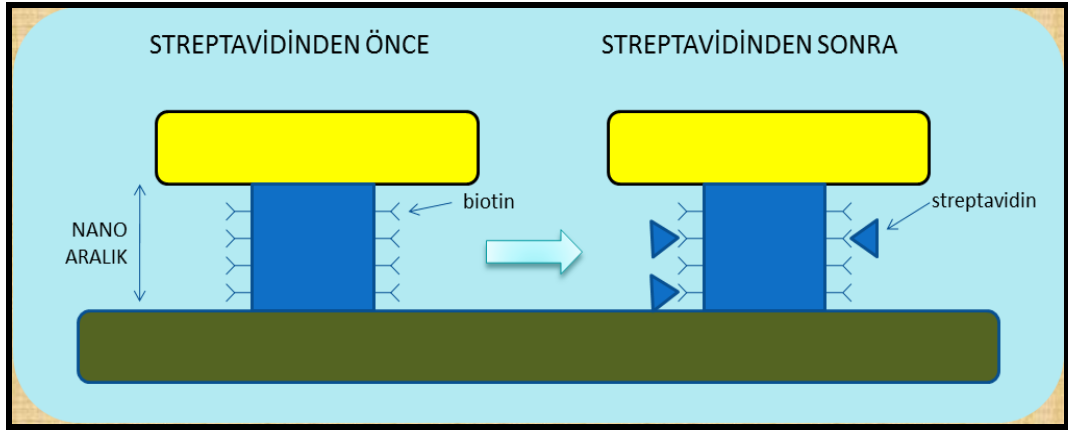


Şekil 2.17. Polimer mikroakışkan kanallar ile nano IDA için fabrikasyon işlemi. [2]

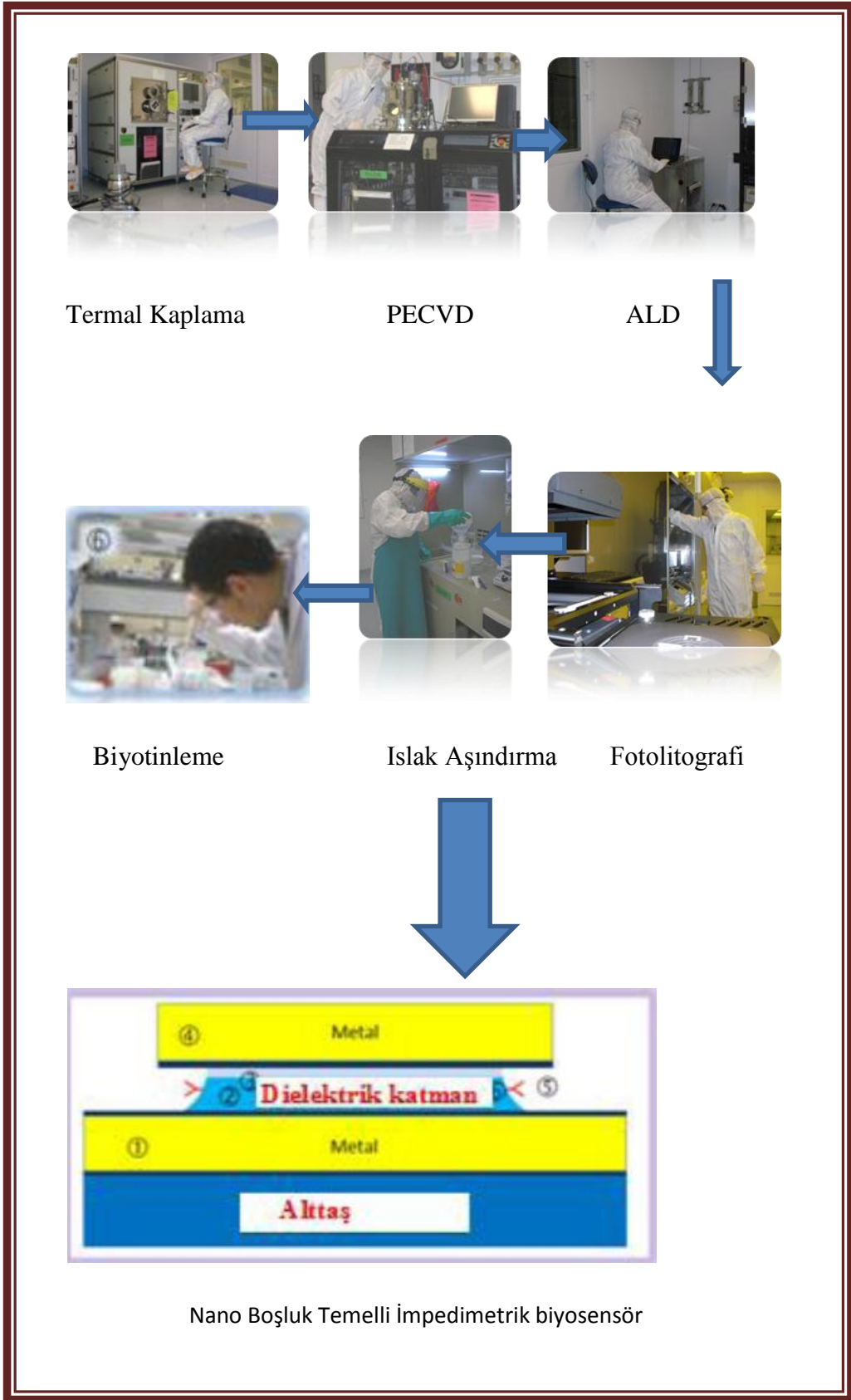
Çalıştığımız sensörün yapı şekli aşağıda Şekil 2.18’te gösterilmiştir. Sensör tasarımından da görüleceği üzere bir alt taş ve bunun üzerine bir altın elektrot bu altın elektrot ile diğer altın elektrot arasında dielektrik malzemenin (Cr tabaka ve

SiO₂-Al₂O₃ den oluşan dielektrik katman) oluşmaktadır. Bu iki elektrot arasındaki katman nano aralık seviyesindedir. Bu dikey nano aralıklı aygıtlar seri halinde üretilmiştir ve 150 adet parmak şeklinde kapasitanstan oluşmaktadır. Dielektrik katmana biyotinlerin bağlanması sağlanmıştır. Bu sayede iki elektrot arasında bir katman oluşturulmuştur ve algılanması arzulanan moleküller için de tutucu yapılar meydana getirilmiştir.

Saf su içerisinde ölçümler yapılarak hedef moleküllerin dielektrik katmana daha rahat bağlanması sağlanmıştır. Dielektrik katmana hedef moleküllerin bağlanması ile birlikte nano aralıklı bölgede dielektrik sabiti değişecektir. Bu değişik aygıtta bir empedans değişikliği doğuracaktır. Saf suyun nano aralığın her yerinde düzgün bir elektrik alan oluşturması bize avantaj sağlamaktadır ve istemeyen etkileri ortadan kaldırmaktadır. Elektrot boyutları ile nano aralık karşılaştırıldığında elektrot boyutlarının saçak alan etkisi ihmal edilir (Şekil 2.21.a-b).

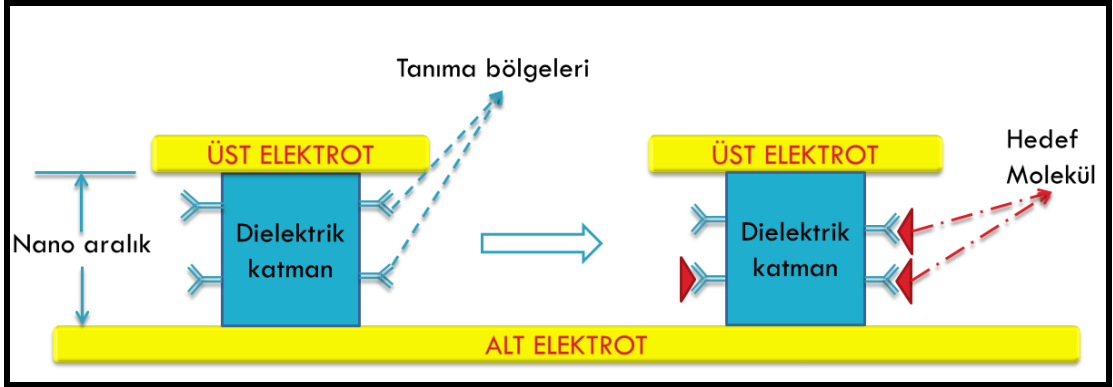


Şekil 2.18. Biyosensörün çalışma sistemi görülmektedir. [5]



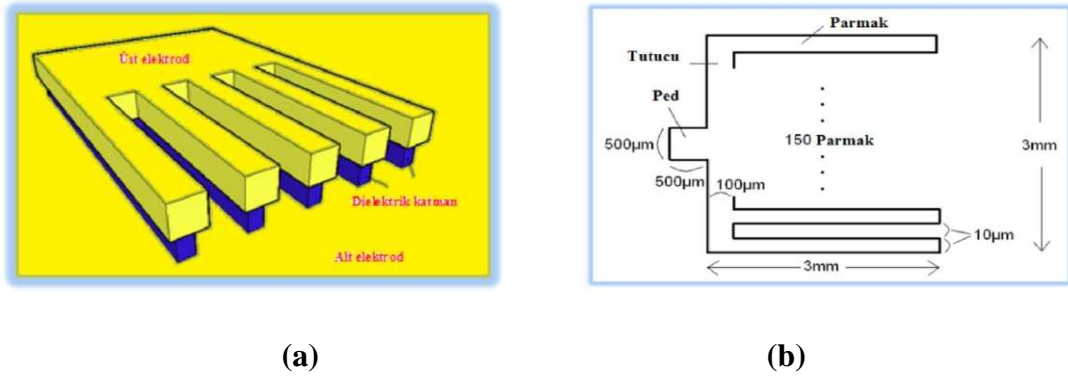
Şekil 2.19. Sensör Fabrikasyonu.

Yapılan kapasitif biyosensörün yapısı aşağıdaki Şekil 2.20’de verilmiştir. Tanıma bölgeleri dediğimiz Aptamerlere streptavidin proteininin bağlanması sonucu kondansatör vazifesi gören biyosensörümüzde empedans değişiminin ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu empedans değişimine göre değerler gözlemlenecek ve alınan veriler doğrultusunda değerlendirme yapılacaktır.



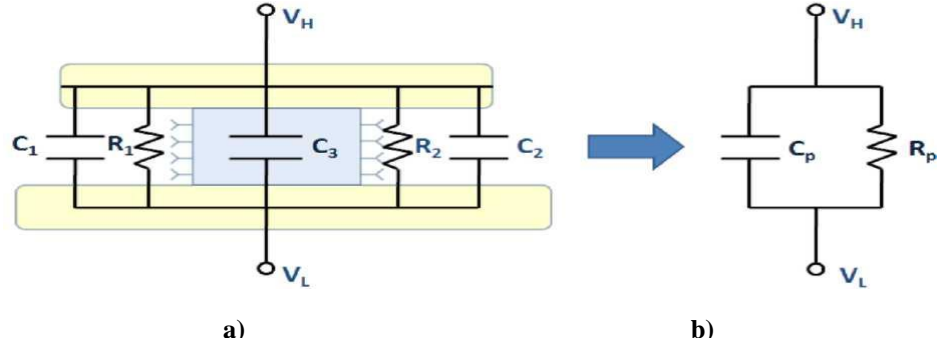
Şekil 2.20. Tasarlanan sensörün görünümü ve çalışma prensibi. [5]

Yine bu yapılardan tasarlanan sensörün görünümü aşağıdaki şekilde görülmektedir. Parmak şeklinde dizilmiş birçok biyosensör ile algılayıcı aygıt oluşturulur (Şekil 2.17).



Şekil 2.21. Tasarlanan sensörün görünümü ve çalışma sistemi. a) parmakların önden kesit görünümü, b) tasarlanan sensörlerin boyutlarının gösterimi. [5]

Oluşturulan biyosensör parmak yapılar sembolik gösteriminde de görüleceği üzere devredeki kapasitansın değişimi hesaplanır veya elektronik aletlerle ölçümü yapılır.



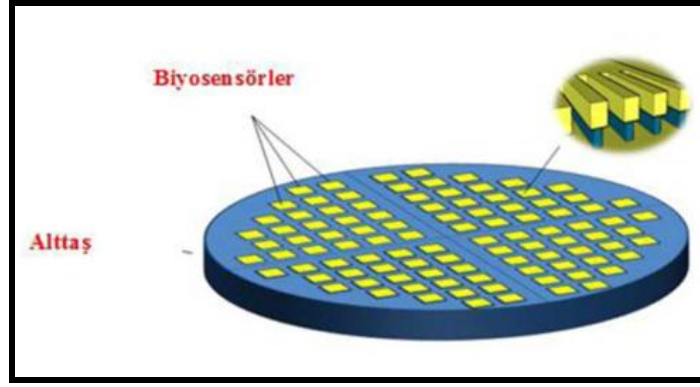
Şekil 2.22. Nano aralıklı biyosensörün devre modellemesi a) Nano aralık paralel kapasitörleri, (C₁ ve C₂) ve direnç (R₁ ve R₂) modellemesi, dielektrik katman kapasitör modellemesi (C₃). b) Eşdeğer devre modellemesi. [5]

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d} A \quad (3.1)$$

Burada A, plakanın yüzey alanıdır, d ise iki plaka arasındaki mesafedir, " ϵ_0 " dielektrik sabittir (8.854x10 F m). " ϵ_r " ise plakalar arasındaki dielektrik sabittir.

Fabrikasyon bir altlık üzerine metal katman ve metal katman üzerine bir dielektrik tabaka, dielektrik tabakanın üzerine bir metal katman biriktirmek suretiyle tamamlanır.

Fabrikasyon sonunda elde edilen aygıtların gösterimi aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 2.23. Fabrikasyon sonunda elde edilen aygıtların gösterimi. [5]

2.7.1. Altlık ve Yüzey Hazırlığı

Fabrikasyonda altlık olarak, silikon, kuartz, veya pyrex kullanılabilir. Burada altlığın görevi aygıtları taşımaktır. Altının yüksek iletkenliği özelliğinden dolayı alt ve üst elektrotlar altın tabaka olarak yapılmıştır.

Fabrikasyonun ilk aşamasında, yüzey temizliği büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, alttaş aseton ((CH₃)₂CO), metanol ve izopropil alkol ((CH₃)₂CHOH) içerisinde 5'er dakika ultrasonik titreşime tabi tutulur.

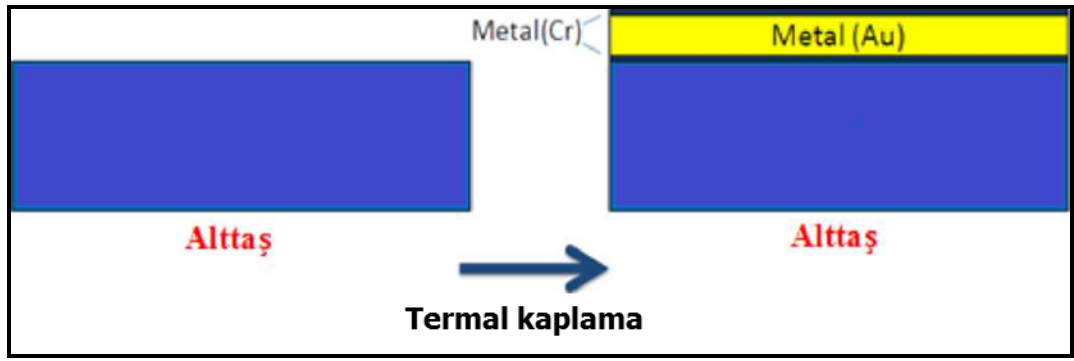
Sonrasında saf su (DI) musluğunun altına tutularak, yüzeyin temizliği neticelendirilmektedir. Daha sonra ise Azot (N₂) gazı ile yüzey kurutulur. Yüzeyin fabrikasyon öncesi güvenilir hale gelmesi için bu temizlik son derece önemlidir.



Şekil 2.24. Yüzey temizliğinin yapılması saf su ve ardında Azot gazı ile kurutulma.

2.7.2.Alt Elektrotun Büyütülmesi

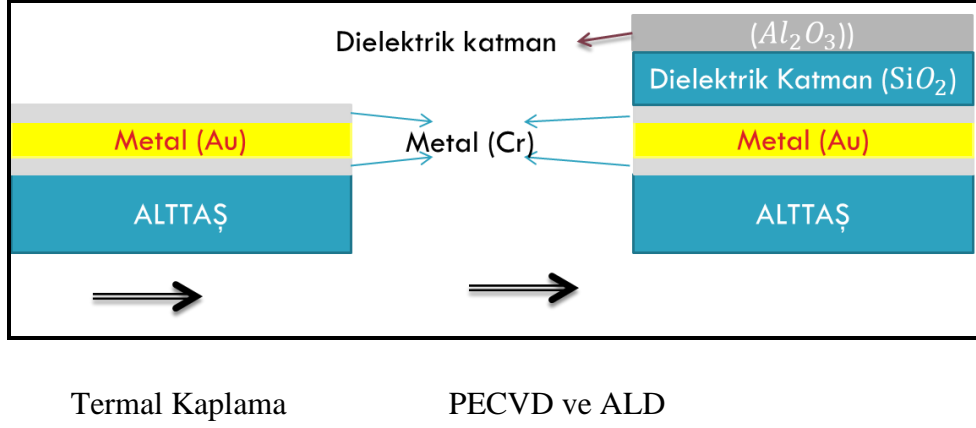
Termal buharlaştırma cihazı altın alt elektrotun kullanılır. Elektrot malzeme olarak Altın kullanılmasının başlıca nedeni altın, iletkenliği yüksek bir malzeme olması ve metallerin çoğunun, oksit oluşumuna negatif serbest enerji göstererek oksijenle reaksiyona girmesine rağmen, altın pozitif serbest enerjiye sahiptir (oksijen atomu başına 227 ° C'de 10,5 kcal). Ayrıca altın havaya maruz kaldığı zaman kararlıdır, oksitlenmez.



Şekil 2.25. Termal buharlaştırma yöntemi ile alt elektrotun büyütülmesi aşaması.

2.7.3.Dielektrik Katmanların Büyütülmesi

Kaliteli bir dielektrik katman oluşturulması için SiO₂ katman, kimyasal plazma buhar biriktirme yöntemi (PECVD) tekniği ile kaplanmıştır. Sızıntı akımı gibi problemlerin olmaması için de ek bir çok ince Al₂O₃ katmanı ek bir dielektrik katman biriktirmek gerektirmektedir.



Şekil 2.26. Dielektrik katmanların büyütülmesi.

2.7.4.Üst Elektrotun Desenlendirilmesi

Üst elektrotun kaplanmasından önce, istenen tasarımı aktarmak için fotolitografi tekniği kullanılır. Fotolitografi işleminin en önemli elemanı fotorezisttir. Fotorezist malzeme ışığa duyarlı bir malzemedir. Oluşturulan maskenin şeffaf bölgelerine UV ışınlar gönderilir ve istenilen desenleme gerçekleştirilir. Oluşturulan aygıtın developer içerisinde kalma süresi son derece önemlidir. Uzun süre kalması yüzeydeki ince parmakları da kaldırarak istenmeyen sonuçları meydana getirecektir ve istenilen desenleme oluşturulamayacaktır.

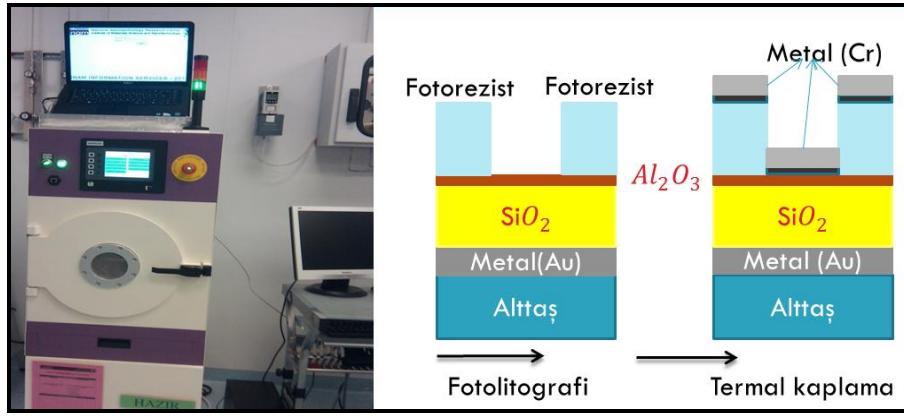


Şekil 2.27. Fotoliografi tekniği ile üst elektrodun desenlenmesi.

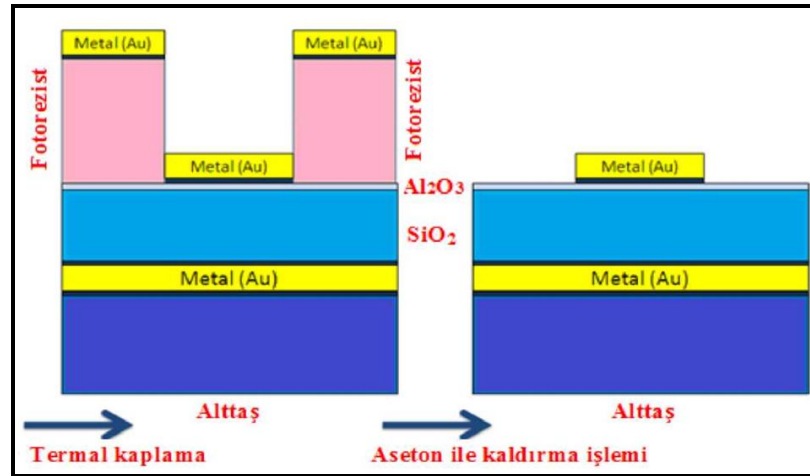
2.7.5.Üst Elektrodun Kaplanması ve Kaldırma İşlemi (Lift-off)

Üst elektrotta da alt elektrota benzer şekilde metal kaplama ve ısıl buharlaştırma teknikleri ile kaplama gerçekleştirilir. Dielektrik katmanın üstüne ince bir Cr tabaka ve akabinde Au tabaka büyütülerek katman oluşturulur (Şekil 2.24).

CVD ve metal kaplama yönteminden sonra malzemedeki arzu edilmeyen kısımların kaldırma işlemi (lift-off) yapılır. Bu işlemde de yine aseton kullanılır. Bu işlemde malzemenin maruz kalma süresi ve titreşime tabi tutma süresi önemlidir. İşlem sonrasında arzu edilen desenleme gerçekleştirilmiş olur (Şekil 2.27).



Şekil 2.28. Termal buharlaştırma yöntemi ile üst elektrotun desenlenmesi.

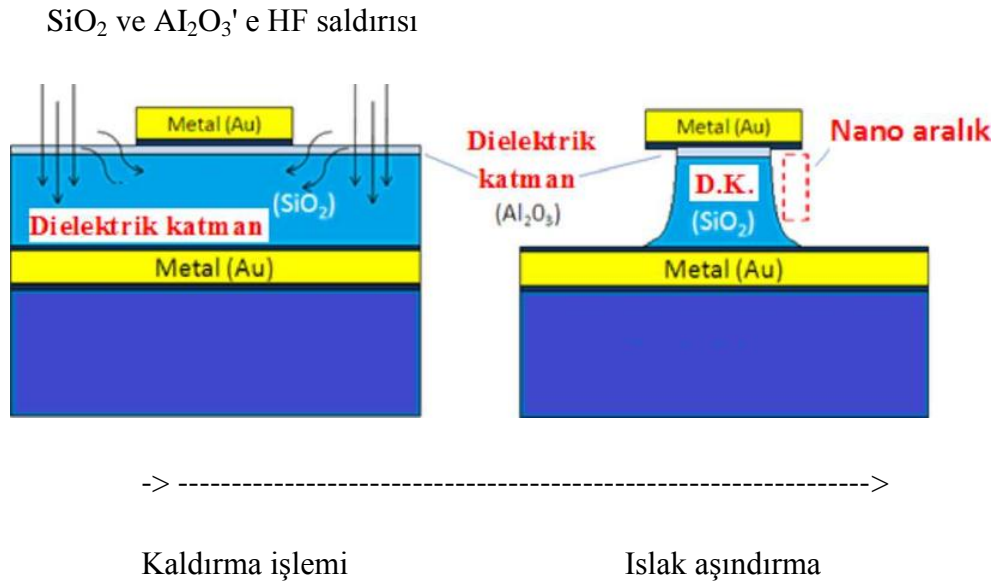


Şekil 2.29. Kaldırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli.

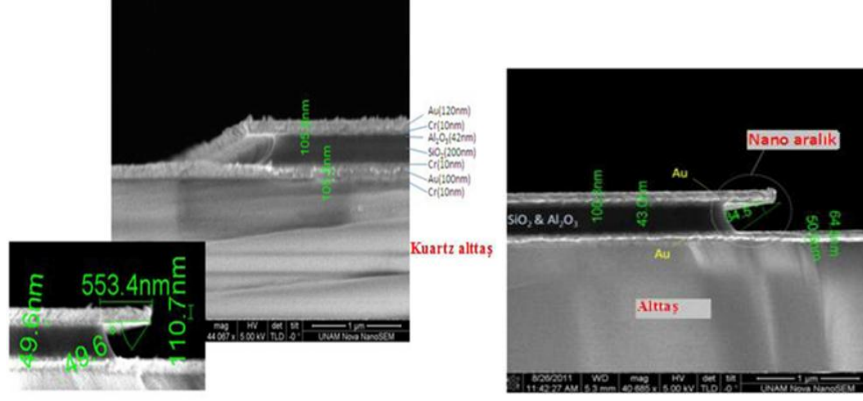
2.7.6. Nano Aralık Oluşturma

Islak aşındırma yöntemi ile nano aralık oluşturulur. SiO_2 ve Al_2O_3 oluşan dielektrik katman seyreltilmiş HF asidi ile aşındırılır. Altının HF asidi ile tepkime vermemesi bize avantaj sağlamakta ve altın üst elektrot bir maske görevi üstlenmektedir. Bu aşındırma işleminde istenilen geometrik yapı elde edilmesi için özen gösterilmesi gerekmektedir. İstenilen geometrik yapı Şekil 2.30'da gösterilmiştir.

Bu işlemde zaman son derece önemlidir. İstenilen yapının elde edilmesinde HF asidi saldırısına maruz kalma süresinin fazla veya az olması son derece önemlidir. Kontrolsüz yapılan aşındırma işlemleri istenmeye sonuçlar doğuracaktır.



Şekil 2.30. Islak aşındırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli.



Şekil 2.31. Üretilen biyosensörlerin fonksiyonallazasyon öncesi SEM görüntüleri.[5]

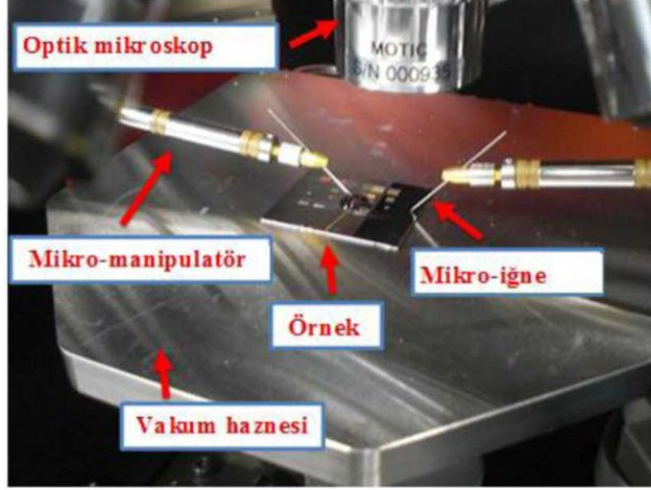
2.7.7.Ölçüm Sistemi

Üretilen biyosensörlerin empedans ölçümleri temiz odada yapılır. Empedans ölçümleri için düşük frekanslı ölçümler yapabilen bir parametre analizörü ve manuel prob istasyonu kullanılır.



Şekil 2.32. UNAM temiz odada bulunan parametre analizörü ve prob istasyonu.

Örnek, prob istasyonunun vakum haznesine yerleştirildi, mikro iğne uçları yardımıyla üst ve alt elektrotlardan bağlantı yapıldı.

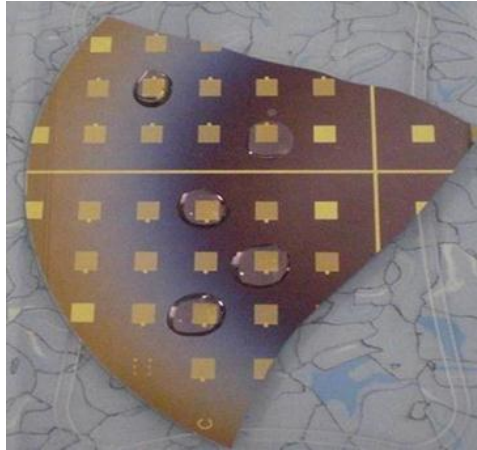


Şekil 2.33. Vakum haznesindeki örneğin mikro-iğneler vasıtasıyla elektriksel ölçümler için bağlantı alınmış durumdaki görünümü.

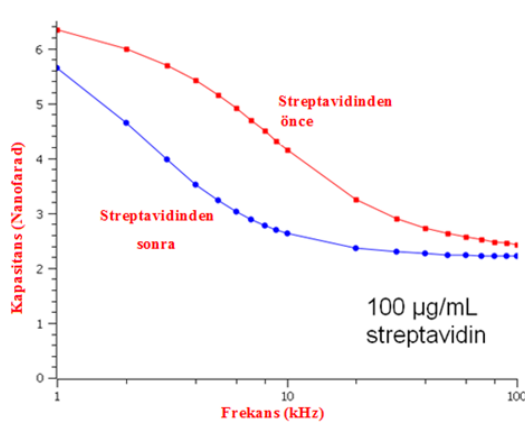
3.ARAŞTIRMA VE BULGULAR

3.1.Protein Algılama

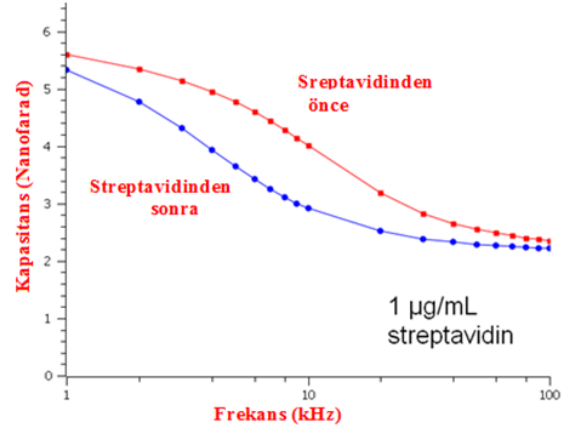
Üretilen yapılar biyotinle kaplanır ve dielektrik bölgenin streptavidin proteinine karşı afinitesinin çok iyi olması sağlanır. Biyotin ile streptavidin proteini arasındaki bağ son derece kuvvetli bir kimyasal bağıdır. Solüsyon içindeki streptavidin proteinleri biyotinlerle sıkı bir bağ yapar ve bunun sonucunda dielektrik katmanın kapasitansında değişme olur. Cihazda kuru ölçümler ile ıslak ölçümler karşılaştırılarak empedans değişimleri gözlemlenir. Buradan çıkartılacak sonuç, dielektrik katmana moleküllerin bağlanması cihazda kapasitans değişikliğine neden olmaktadır. Streptavidinin biyotinlere bağlanması empedans değişikliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum beklediğimiz bir sonuçtur.



Şekil 3.1. Yapıların üzerine streptavidinler damlatılmış durumdaki görüntüsü.



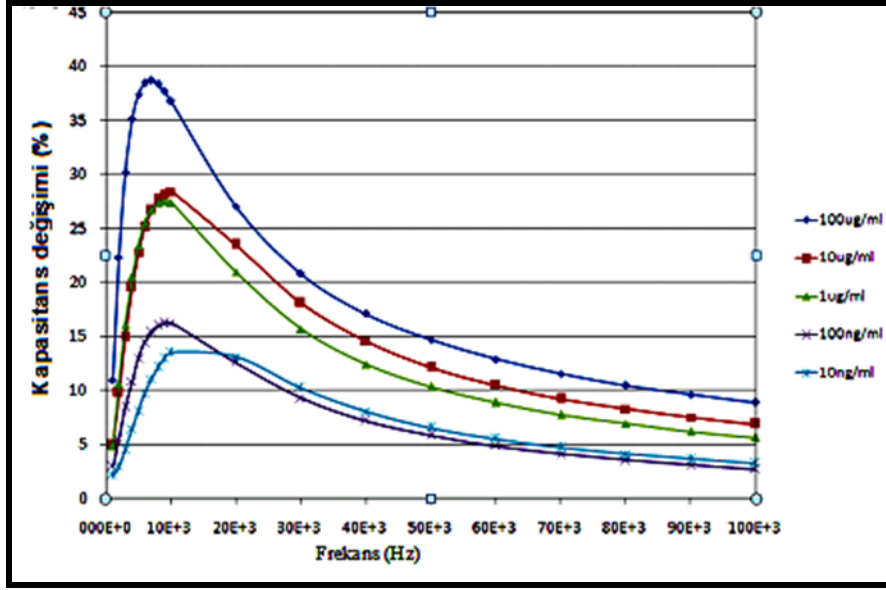
a)



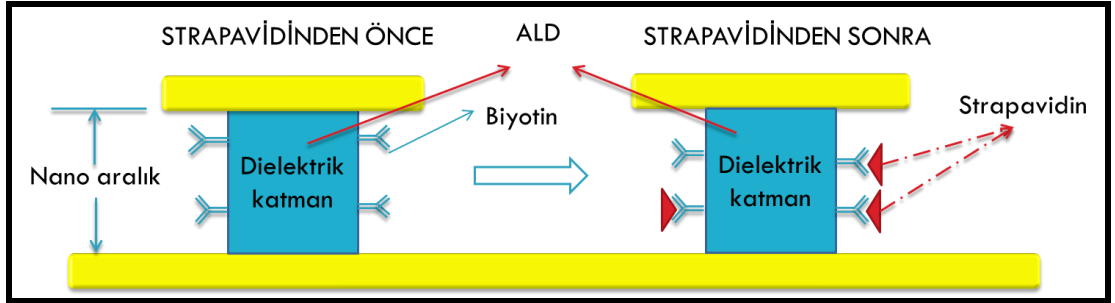
b)

Şekil 3.2. a) 100µg/ml streptavidin uygulanan sensörün, b) 100ng/ml streptavidin uygulanan sensörün edilen kapasitansın (Cp) frekansa (f) göre değişimi grafikleri. [5]

Yukarıdaki Şekil 3.2’de de görüleceği üzere farklı miktarlarda streptavidin uygulanan sensörü kapasitans – frekans değişimi birbirine benzerdir. Streptavidin miktarına göre sapmalar olmuştur. Oluşan eğriler kısmen simetriktir. Bu durum beklediğimiz kapasitans değişiminin madde miktarı ile orantılı olduğunu gösterir. Ayrıca biyosensörlerden beklediğimiz ölçüm aralığı olması şartını da yerine getirmiş oldu. Yine streptavidin miktarına göre kapasitans değişim yüzdesi – frekans grafiği ile de bu simetrik değişim beklenen sonucu teyitlemiştir (Şekil 3.3). Cihazın ölçebileceği bir konsantrasyon aralığı olması ve sonuçlarının tutatlılık göstermesi, tespit sınırının olması son derece memnun edicidir. Grafikten de anlaşılacağı üzere üzere cihaz analitteki değişime birebir cevap vermektedir. Bu durum cihazın son derece duyarlı oluşunun bir göstergesidir.

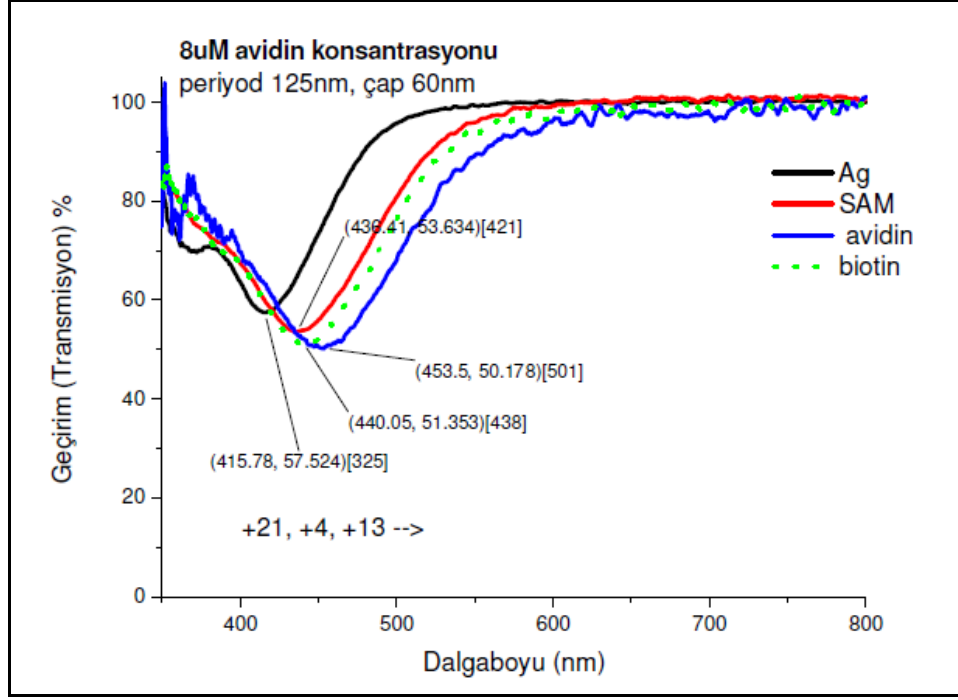


Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonlardaki streptavidin çözeltilerinin sensörlerde meydana getirdikleri kapasitans değişim yüzdesi- frekans grafikleri.[5]



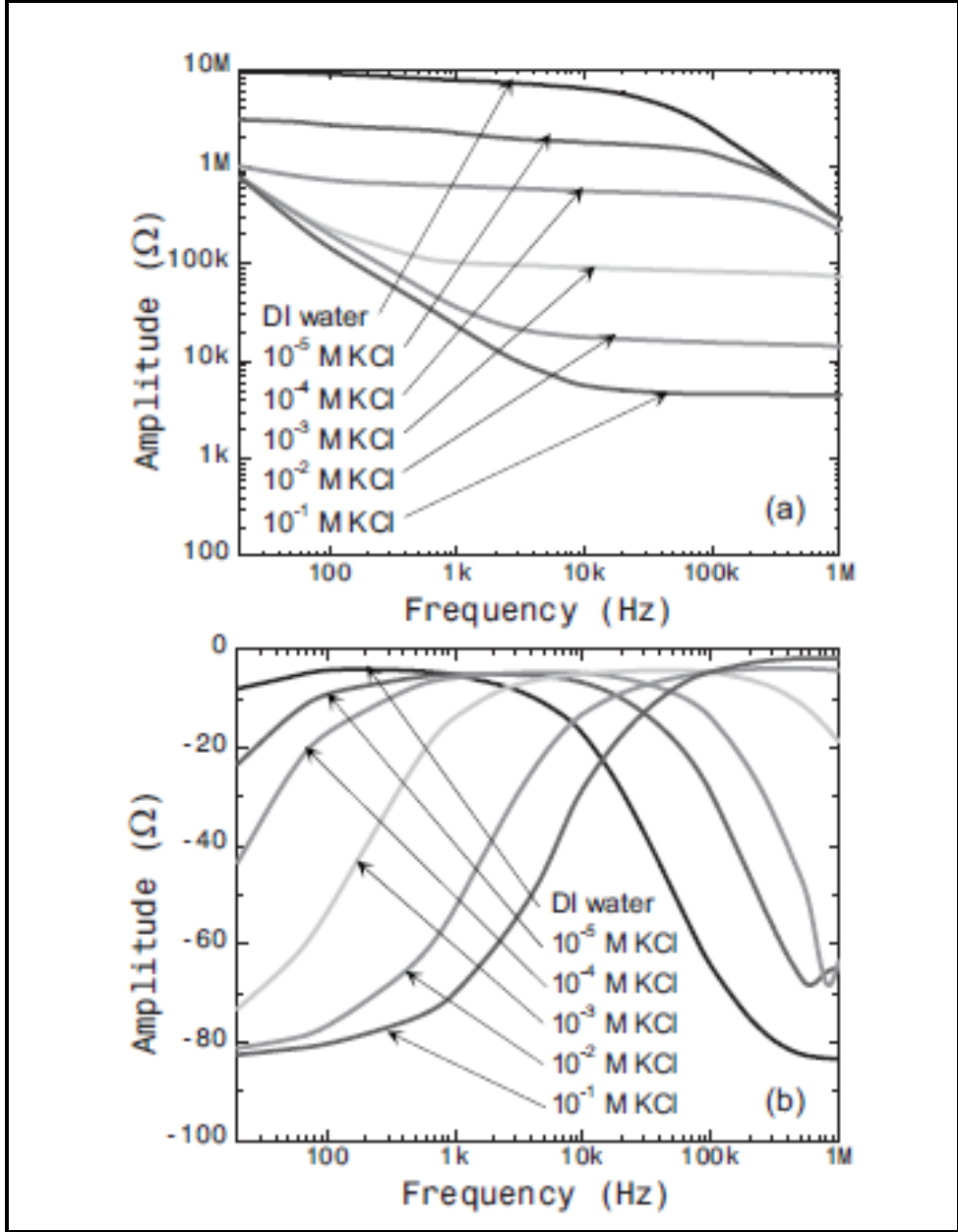
Şekil 3.4. Protein Algılama Gösterim Sistemi. [5]

“E-Coli Bakterisine Duyarlı Plazmonik Nano-Biyo Sensör Tasarımı” çalışmasında sonuç olarak; aşağıda 125 nm periyod, 60 nm çap, 30 nm yüksekliğindeki gümüş nano-silindirlerin her bir yüzey fonksiyonelleştirme adımından sonraki LSPR dalda boyu kaymaları gösterilmiştir. Bu grafikler ile biyosensör yapısının çalışmakta olduğu doğrulanmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5).



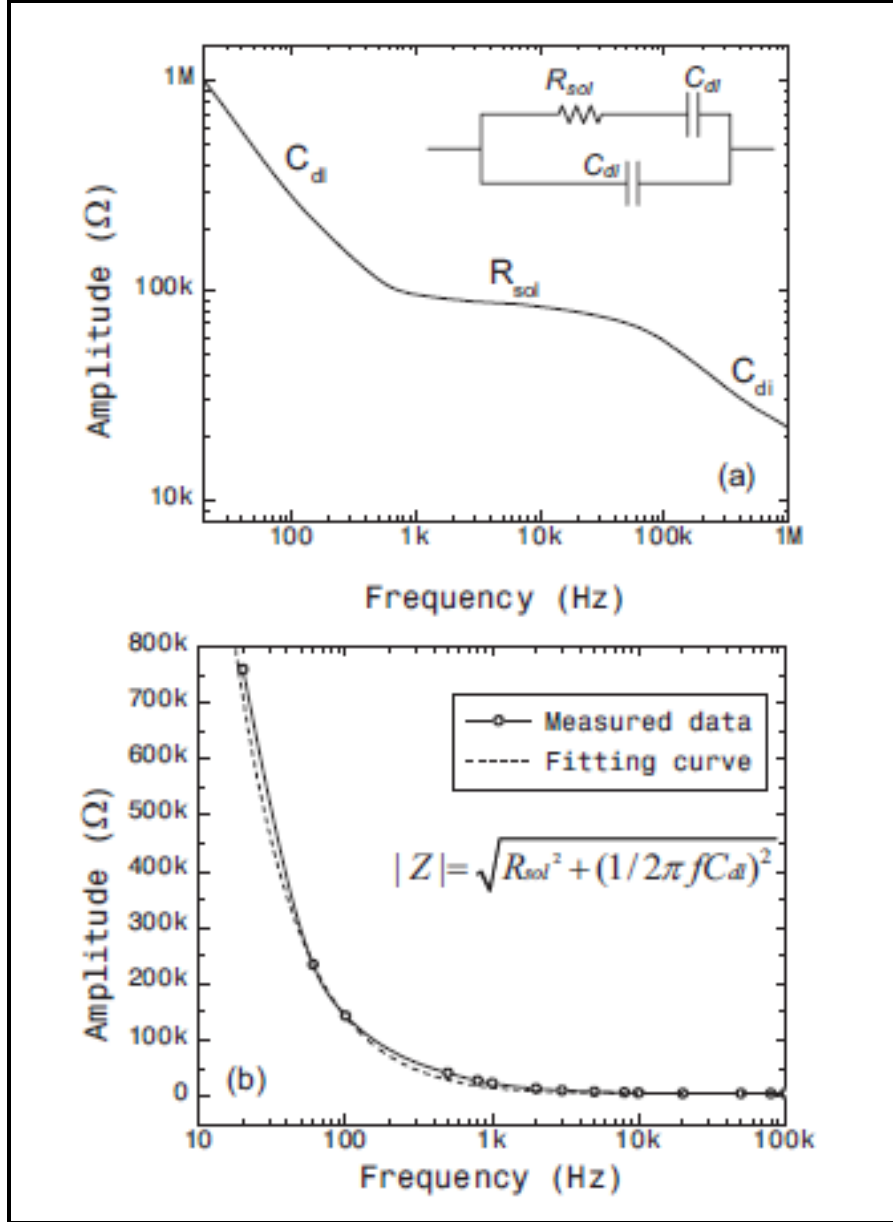
Şekil 3.5. Gümüş parçacıklardan alınan Transmisyon ölçümleri. Sadece Ag nanoparçacıklar (Siyah), SAM adımıdan sonra (kırmızı), Biotin adımıdan sonra (yeşil), Avidin adımıdan sonra (mavi). [1]

Nano IDA da, EIS frekans aralığı 1 MHz ile 20 Hz de 50 mV gerçekleştirilir. Sonra örnek çözelti algılama kanalları içine enjekte edilir. DI su ve KCl çözeltileri düşük ölçülür. Aynı yöntemi kullanarak yüksek konsantrasyonu içinde uygulanır. 10^{-3} M KCl çözeltisi içinde nano IDA nın tipik empedansı yanıtı analiz edilerek Şekil 3.4'de gösterildiği gibi çözelti, üç bölge, alt gruplara ayrılabilir. [2]



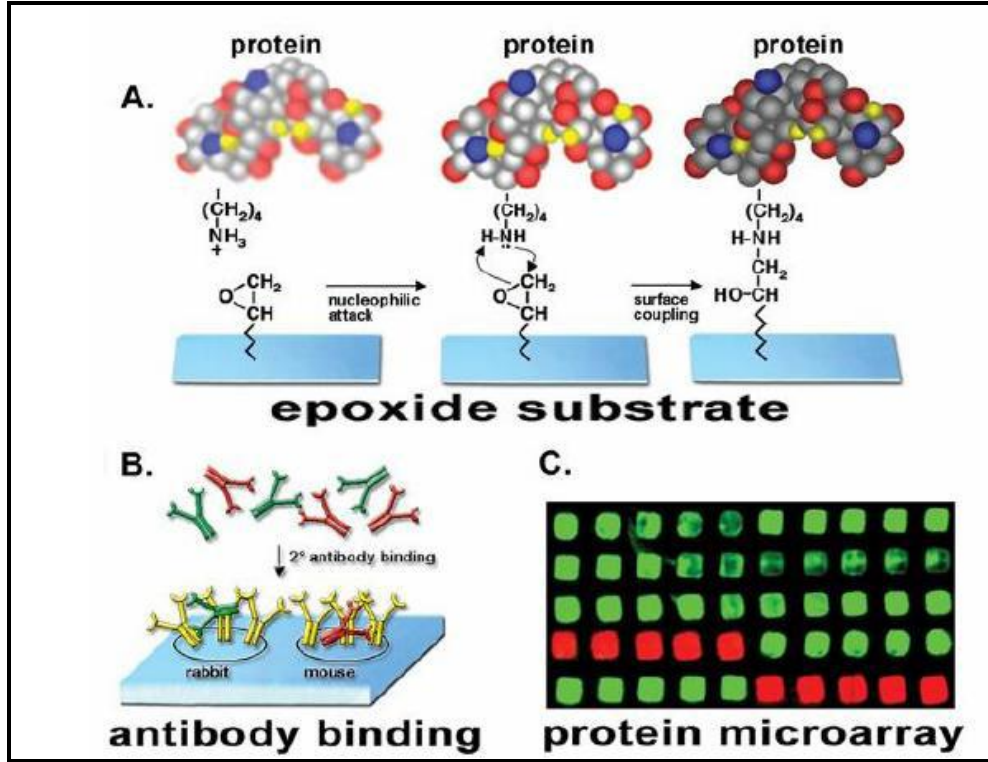
Şekil 3.6. Farklı konsantrasyonlarda elektrolit KCl altında bir nano IDA'nın EIS a) amplitüd cevabı ve (b) faz yanıtı.

Basitleştirilmiş bir elektrik modeli (Şekil 3.7a) için kullanılır. [2]



Şekil 3.7. Elektrolit içinde nano IDA için elektriksel modelleme:

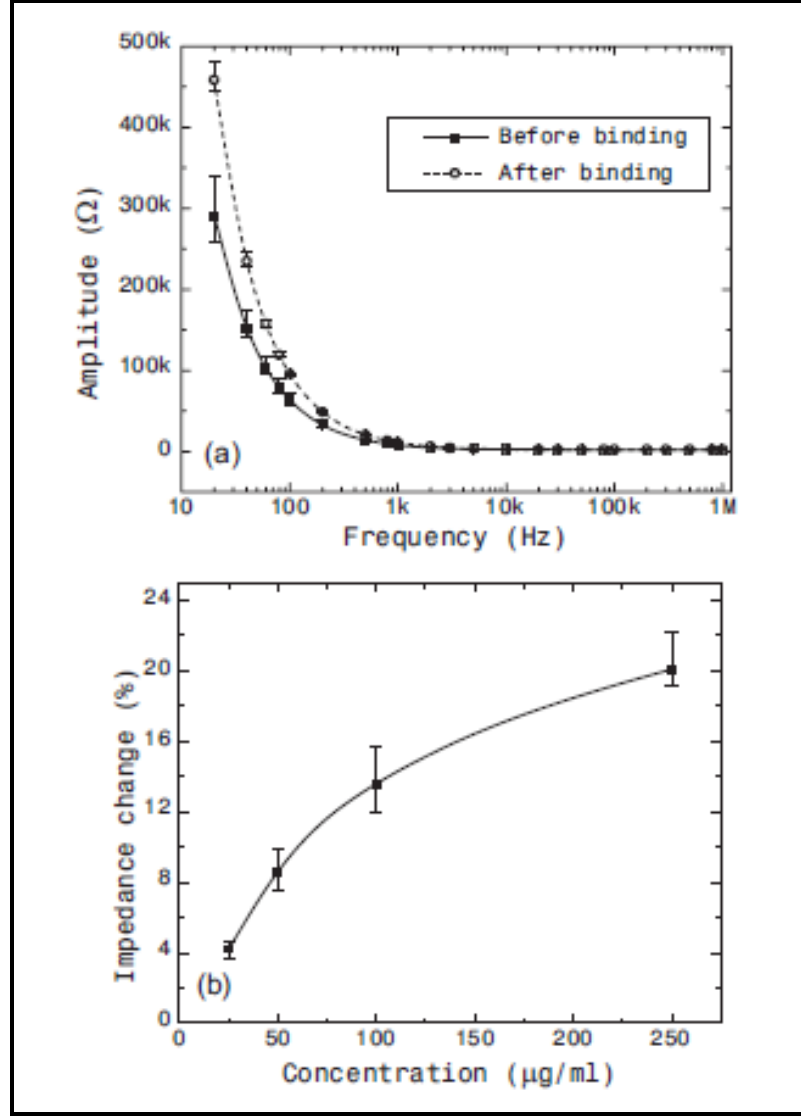
- (a) Empedans genlik 10^{-3} M da KCl çözeltisi içinde Empedans genlik spektrumu ve üç farklı impedimetrik yanıt bölgeleri (ilave) basitleştirilmiş elektrik modeli ile açıklanabilir.
- (b) 10^{-2} M KCl çözeltisi içinde 20 Hz ile 100 kHz frekans aralığında bir impedimetrik tepki. Gelen uydurma eğrisi basitleştirilmiş elektrik modeli aynı zamanda $C_{dl} = 15$ nF ve $R_{sol} = 5$ k Ω ile verilir. [2]



Şekil 3.8. a) Proteinlerin epoksi numuneye bağlanması,

b) antikorlarda bağlanma,

c) protein mikroçipleri. [33]

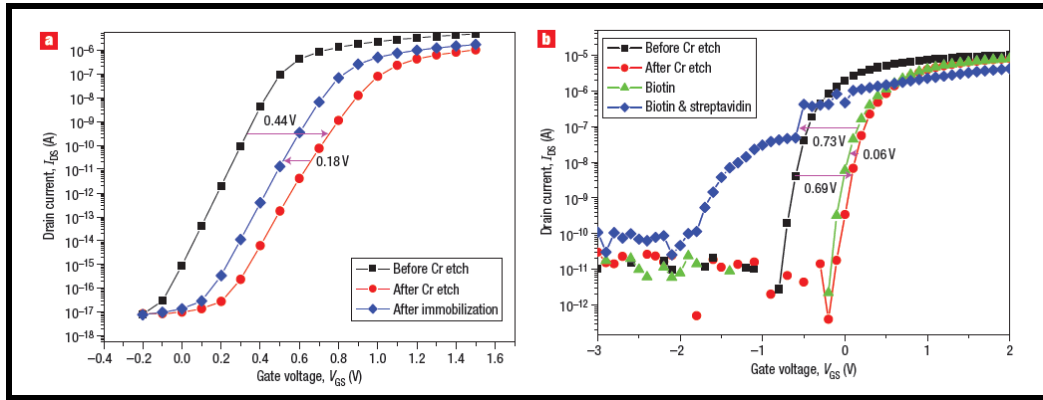


Şekil 3.9. (a) İmpedimetrik tepkisi: (a) proteinin bağlanmalarından önce ve sonra (0.25 mg / ml fare anti-tavşan IgG) ve (b) 100 Hz konsantrasyonlarında farklı fare anti-tavşan IgG karşı göreceli empedans değişim kalibrasyon eğrisi [2]

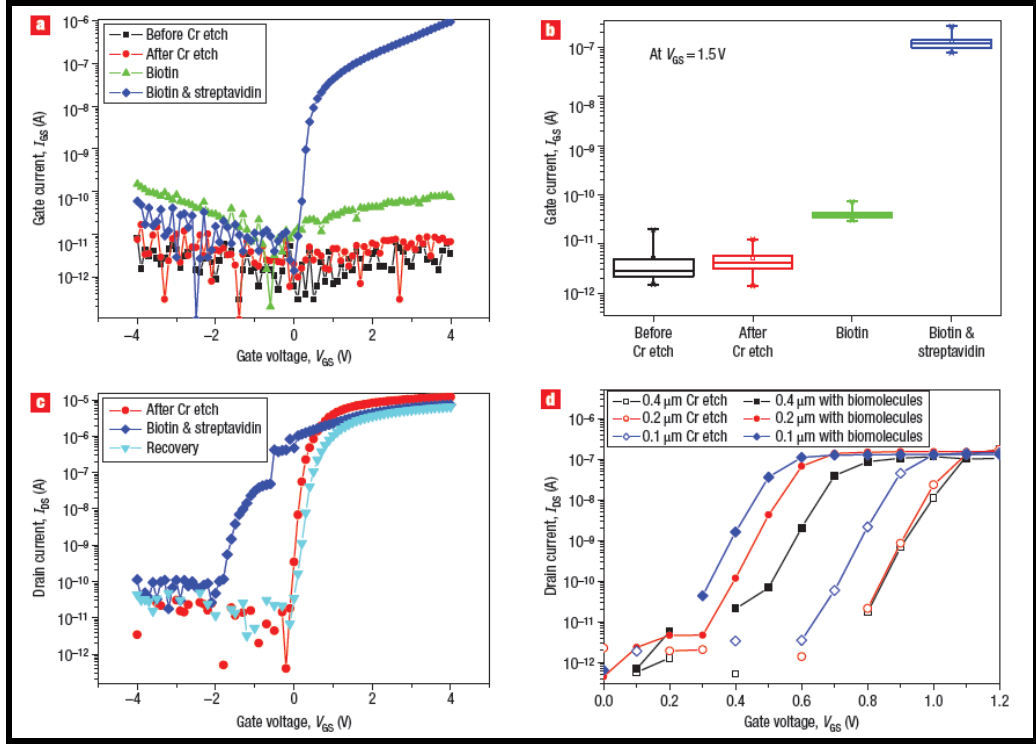
Bu çalışmada, polimer üzerinde yeni bir nano IDA nanaofabrikasyonu yapıldı ve EIS biyosensörler gibi başarılı bir şekilde karakterize edildi. Ölçülen empedans spektrumları KCI çözeltisi kullanarak göstermiştir.

KCI çözeltisi kullanarak, ölçülen empedans spektrumları ile teorik empedans spektrumları tahminleri arasında iyi bir uyum göstermiştir. EIS nano biyosensör ilk test sonuçlarını göstermiştir ki bu nanobiyosensör doğrudan hızlı ve serbest biyomoleküler yapıda ve hücrel analizi için yüksek potansiyele sahiptir. Buna ek olarak, nanosensor kolayca tek polimer lap-on-a-chip ile entegre edilebilir.

Streptavidin bağlanmaları, kapının dielektrik konsantrasyonundaki (empedans) değişikliklere neden olacaktır. FET' in çalışması için eşik voltajı büyük değişimler ile sonuçlanır. Dikey kapı, basit ince film kaplama ve ıslak aşındırma teknikleri ile imal edilir. Bu litografi işlemi gerektiren düzlemsel nanokapı FET ler üzerinde bir avantaj olabilir. Biz inanıyoruz ki Dielektrik modüle FET (DMFET) yönelik yararlı bir yaklaşım sağlar. Biyomoleküler algılama, diğer sistemlerin çoğuna genişletilebilir.



Şekil 3.10. DMFET nanogap cihazın IDS-VGS özellikleri. düşük-k malzemelerle simülasyon, sonuçları. VDS de b Deneysel sonuçlar $\frac{1}{4}$ 0.05 V. [4]

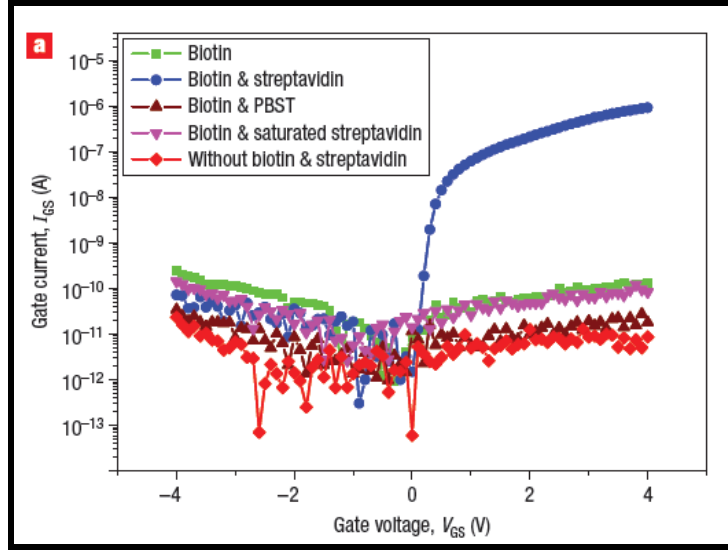


Şekil 3.11. DMFET nanogap cihazın elektriksel özellikleri biyomoleküllerin nanogap immobilizasyonu öncesinde ve sonrasında tayin edilir. [4]

a, IGS-VGS özellikleri in VDS az bir cihaz $\frac{1}{4}$ 0.05 V.

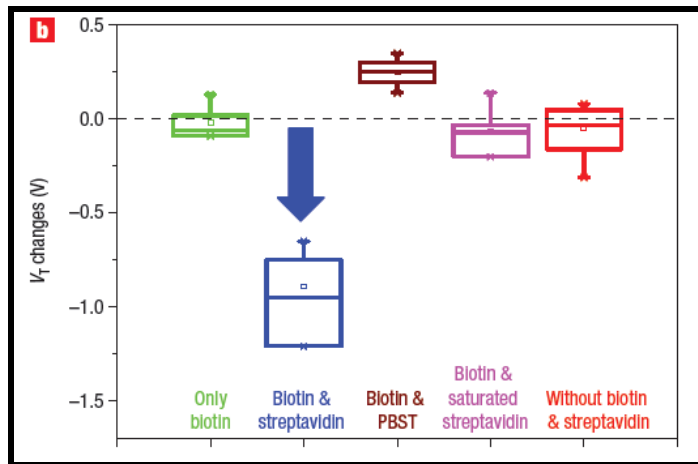
b, Kırdıktan sonra VGS $\frac{1}{4}$ 1,5 V. c, IDS-VGS karakteristik değişiklikler ile 15 farklı cihazlarda ölçülen IGS istatistiki dağılımı VDS = 0.05 V.

d, bağlanmanın biotin-streptavidin, eşik voltajı DMFET nanogap cihazlar yanal olarak kazınmış uzunluğuna bağlıdır.



Şekil 3.12. DMFET elektriksel özelliklerinin karşılaştırılması (I-V).[4]

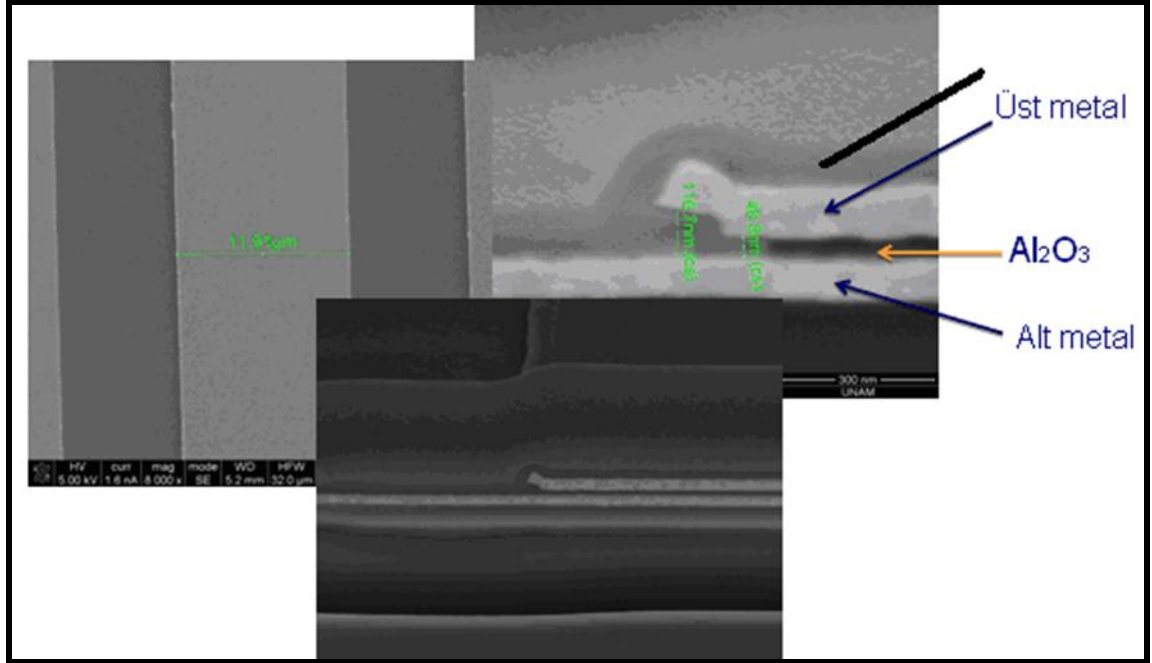
Beş kontrollü olarak; nanogap cihazı (uzunluk, 200 nm boşluk boyutu, 15 nm) deneyler. Tüm cihazlarda eşik voltaj değişiminin, istatistiksel sonuçları. Her bir grup için belirlenen veriler 15 cihazlarından ekstre edilmiştir.



Şekil 3.13. DMFET elektriksel özelliklerinin karşılaştırılması (V-Numune)

b. VDS de IGS-VGS özellikleri ¼ tek bir cihazda 0.05 V. [4]

Oluşturulan nano biyosensörün Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri aşağıda görülmektedir.

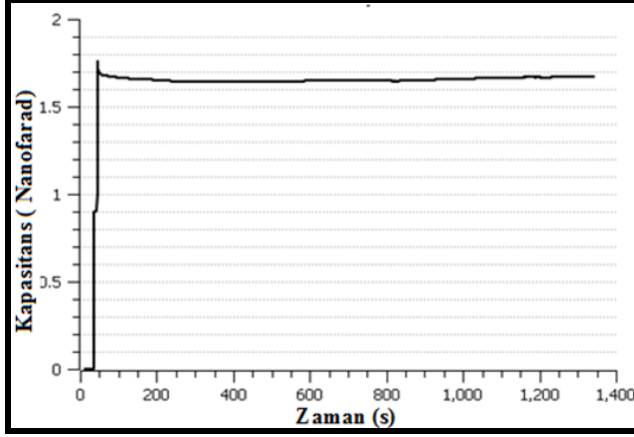


Şekil 3.14. Yapıların odaklandırılmış iyon demeti taramalı elektron mikroskobu (FIB SEM) görüntüleri. [5]

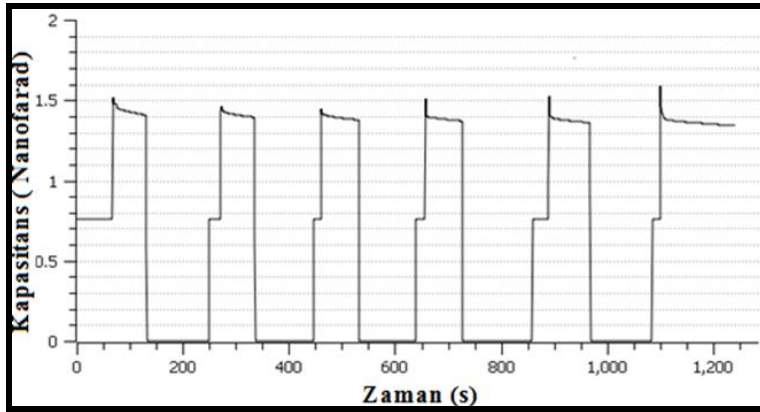
3.2.Kararlılık Testleri

Biyosensörlerden beklenen kararlılık özelliğinin test edilmesi ile üretilen biyosensörün ne kadar kararlı olduğu gözlemlenmiştir. Kapasitans-Zaman grafiğinden de görüleceği üzere zaman içerisindeki kapasitans değişimi beklenen kararlı sonucu vermiştir (Grafik 3.3). Bununla birlikte ölçümler ıslak ve kuru olarak yapılmıştır. Üst üste alınan ıslak ve kuru ölçümlerin Kapasitans-Zaman grafiği elde edilmiştir (Grafik 3.4). Grafikten de anlaşılacağı üzere cihaz ıslak olduğunda yani istenilen moleküller dielektrik katmana bağlandığında kapasitans artışı gözlemlenmektedir, cihaz kuru olduğunda kapasitans artışı görülmemektedir. Tekrarlı ölçümlerle sonuçlar

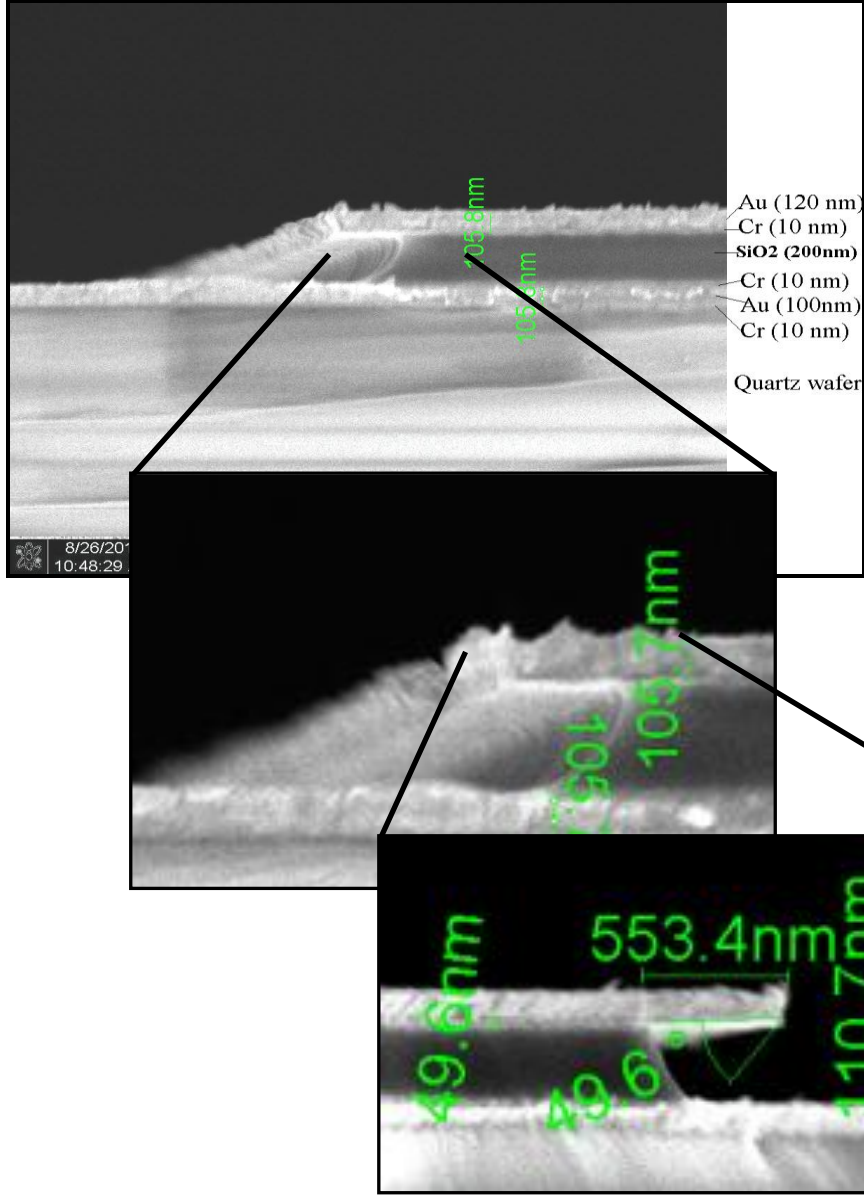
teyit edilmiştir. Elde edilen art arda pikler üretilen cihazın ne kadar kararlı olduğunu bir göstergesidir.



Şekil 3.15. Kararlılık doğrulama için, 50 kHz frekans değerinde 20 dk. boyunca alınan kapasitans (C_p)- zaman değişim grafiği (0-1400 s. aralığı).



Şekil 3.16. Üst üste altı kez alınan kuru ve DI sudaki kapasitans-zaman değişim grafiği. [5]



Şekil 3.17. Bir parmağın ön profilinin SEM görüntüsü. Aşındırma işlemi HF asit ile yapılmıştır. [5]

Şekil 3.17’de de görüldüğü gibi istenen parmak şeklindeki biyosensör aygıt yapısı kuvvetli asit olan HF kullanılarak yapılmaktadır. Bu sayede istenilen ara dielektrik bölge oluşturulmaktadır.

4.SONUÇ-TARTIŞMA

Üretilen nanobiyosensörlerin Streptavidin proteininin biyotin Cr, Ag ve Au gibi yüzeylere bağlanmalarını araştırıldı. Yapılan biyosensör tasarımı ile ilgili literatür taramasında antikorlara aptamer ve biyotinlerin bağlanmaları gözlemlendi. Bu bağlanmalar sonucunda yapılan cihazdaki kapasitans değişimleri ölçümlerini değerlendirdik. Her ölçüm değerlendirmesinde sensörlerden beklenen; duyarlı olması, seçici, tutarlı ve kararlı olma beklentilerine olumlu cevap vermiştir.

Yapılan çalışmada filmler Termal Kaplama Cihazı, ALD ve PECVD yöntemi ile büyütülmüştür. Çalışma prensibi ise, hedef moleküllerin bağlanması ile impedimetrik değişiklikler tespit etmektir. Algılanması istenen yapılar üretilen nano aralıklı oluşturulan biyosensör dizilerindeki elektrik malzemenin bulunduğu bölgeye bağlandığı görülmüştür. Bu dielektrik katman, iki elektrotu birbirinden ayırma ve algılanacak moleküller için bir tutucu görevi görmektedir. Ölçümler saf su içerisinde yapılmaktadır. Hedef moleküller dielektrik bölgeye bağlandığında suyun yerini alarak, aralıklı bölgenin dielektrik sabitini değiştirdiği gözlenmemiştir. Bu şekilde empedans değişikliği ortaya çıktığı görülmüştür. Saf su, yüksek debye uzunluğu sunmasıyla nano boşluğun her yerinde düzgün bir elektrik alanı oluşturulmaktadır. Ayrıca, saf su elektrik çift tabakasının istenmeyen etkilerini ortadan kaldırması etkili ve duyarlı bir ölçüm yapmamıza olanak sağlamıştır.

Çalışmada yapılan biyosensör ile nano aygıttaki empedans değişimlerinden alınan verilerle değerlendirmeler yapılabilmektedir. Bu çalışmaların geliştirilmesi ile yakın bir gelecekte özellikle tıp alanında hastalık teşhisleri, kimya alanında maddelerin yapı analizleri hızlı, güvenilir ve çok küçük numunelerle tespit yapılabilecektir. Bu çalışmalar baz alınarak transistor de yapılırsa algılama verileri çeşitlenecektir. Bu sayede bir cihaz ile birkaç veri aynı anda alınabilecektir.

Bununla birlikte biyosensörler için çözülmesi gereken ömürlerinin kısa olması, hazırlanmasının çok uzun olması, nano seviyede çok küçük hata ve değişimlerin ölçümleri etkilemesi, nano boyutta maddelerin veya molokülerin farklı kimyasal ve fiziksel özellikler kazanması, implante edilen sensörün steril tutulabilme gücü ve de moleküler biyolojik prosesler hakkında yeterli bilgi birikimi olmaması problemleri aşılmaya çalışılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] <http://www.nanotechnology.bilkent.edu.tr/tr/photonic/microdoft%20word%20-%20biyosensor-webpage-tr.pdf> “E-Coli Bakterisine Duyarlı Plazmonik Nano-Biyosensor Tasarımı” (Erişim tarihi:22-02-2013)
- [2] Zhiwei Zou, Junhai Kai, Michael J. Rust, and Chong H. Ahn “A Nano Interdigitated Electrodes Array On Polymer For Disposable Impedimetric Biosensors”, 2006
- [3] Amanda J. Haes, W. Paige Hall, Lei Chang, William L. Klein, Richard P. Van Duyne, “ A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps Toward An Assay For Alzheimer’s Disease”, 2004
- [4] Hyungsoon, Xing-Jiu Huang, Bonsangu and Yang-Kyu Choi, “A Dielectric – Modulated Field – Effect Transistor For Biosensing”, 2007
- [5] Yüksel M., Protein algılamasına yönelik nanobiyosensörlerin yeni malzeme ve tekniklerle geliştirilmesi. Doktora tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2012
- [6] <http://okul.selyam.net/docs/index-36774.html> (Erişim tarihi:13-03-2013)
- [7] <http://www.dersnotu.gen.tr/ders/Okaryot-Hucrede-Hucre-Zarinin-Yapisi598> (Erişim tarihi:13-03-2013)
- [8] http://www.biyolojisisitesi.net/tum%20uniteler/yasam_bilimi_biyoloji/enzimlerin_ozellikleri.html (Erişim tarihi:18-08-2013)
- [9] <http://www.elektrotekno.com/about52304.htm> (Erişim tarihi:27-09-2013)
- [10] <http://www.youtube.com/watch?v=7VIKEw4kKZU> (Erişim tarihi:25-12-2013)
- [11] Agan S., International Semiconductor Science and Technology, ISSTC 2014, 13-15 January 2014
- [12] Agan S., Guler M.T., Yuksel M., Tekinay T., Topal A. E., Okyay A. K., Bayıklı N., Desing, fabriacation and charecterization of İmpedimetrik biyosensors for bacteria dedection. 20 th International Symposium on Metastable, Amorphous and Nanostructured Meterials (ISMANAM 2013) 50 Haziran-5 Temmuz 2013, Torino, İtalya

- [13] Clark, L. C. , Lyons, C. , , Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 102,29-45, 1962
- [14] Updike, S. J. , Hicks, G. P. , The Enzyme Electrode. *Nature*, 214, 986-988,1967
- [15] Bloor, D. , Movaghar, B. , Conducting polymers. *IEEE Proceedings* 130.225-232, 1983
- [16] S. Mousa, Biosensors: the new wave in cancer diagnosis, *Nanotechnology, Science and Applications*, p. 1, Dec. 2010.
- [17] A. P. F. Turner, Biosensors--Sense and Sensitivity, *Science*, vol. 290, no. 5495, pp. 1315–1317, Nov. 2000.
- [18] C. Leaf, Why We're Losing The War On Cancer (And How To Win It), *Fortune*, vol. 149, no. 84, pp. 76–82, 2004.
- [19] S.A. Soper, K. Brown, A. Ellington, B. Frazier, G. Garcia-Manero, V. Gau, S. I. Gutman, D. F. Hayes, B. Korte, J. L. Landers, D. Larson, F. Ligler, A. Majumdar, M. Mascini, D. Nolte, Z. Rosenzweig, J. Wang, and D. Wilson, Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 10, pp. 1932–1942, Apr. 2006.
- [20] I. E. Tothill, Biosensors for cancer markers diagnosis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 55–62, 2009.
- [21] Coulet, P. R. , What is a Biosensor? , Chapter 1; Biosensor principles and Applications, (Editör: Blum, L. J. ,
- [22] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Analytica Chimica Acta*, vol. 620, no. 1–2, pp. 8–26, Jul. 2008.
- [23] M. Tondra, M. Porter, and R. J. Lipert, Model for detection of immobilized superparamagnetic nanosphere assay labels using giant magnetoresistive sensors, *Journal of Vacuum Science Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 18, no. 4, pp. 1125 –1129, Jul. 2000.

- [24] S.-H. Chen, V. C. H. Wu, Y.-C. Chuang, and C.-S. Lin, Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor, *Journal of Microbiological Methods*, vol. 73, no. 1, pp. 7–17, Apr. 2008.
- [25] T. An, K. S. Kim, S. K. Hahn, and G. Lim, Real-time, step-wise, electrical detection of protein molecules using dielectrophoretically aligned SWNTfilm FET aptasensors, *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 16, p. 2052, 2010.
- [26] O. Hanoğlu, Nanogap based label-free impedimetric biosensors for point-of-care and early cancer detection. Yüksek lisans tezi. Bilkent Üniversitesi, Ankara, 2012
- [27] http://freaksnotgeeks.blogspot.com.tr/2008/11/overview-of-adaptive-immunity-antigens_15.html (Erişim tarihi: 20-11-2013)
- [28] <http://www.tus.com/5673/%EF%BB%BF%EF%BB%BFmonoklonal-antikorlar>. (Erişim tarihi: 20-11-2013)
- [29] D. Therriault, “Biosensors: Filling the gap,” *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 7, pp. 393–394, 2007.
- [30] J. S. Daniels ve N. Pourmand, “Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges,” *Electroanalysis*, vol. 19, no. 12, pp. 1239–1257, 2007.
- [31] Ağan S., Nano-Sensör. VIII. Türkiye Nanobilim - Nanoteknoloji Kongresi ve IANM 3rd World Congress 25- 29 Haziran 2012 Ankara. Hacettepe Üniversitesi
- [32] <http://okulsel.net/docs/index-40225.html?page=2> (Erişim tarihi: 23-07-2013)
- [33] www.protein.ege.edu.tr/Konular/PROTEIN%20CHIP.pdf (Erişim tarihi: 02-09-2013)