

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

LAB-ON-A-CHIP İÇERİSİNDE İNSAN-İMMÜNOGLOBULİN G TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Serdar ŞANLI

**OCAK 2014
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

LAB-ON-A-CHIP İÇERİSİNDE İNSAN-İMMÜNOGLOBULİN G TAYİNİ

Kimyager Serdar ŞANLI

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (KİMYA)"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 03.01.2014
Tezin Savunma Tarihi : 24.01.2014**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Celal DURAN

Trabzon 2014

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalında
Serdar ŞANLI tarafından hazırlanan**

LAB-ON-A-CHIP İÇERİSİNDE İNSAN-İMMÜNOGLOBULİN G TAYİNİ

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 07 / 01 / 2014 gün ve 1536 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : (Prof. Dr. H. Basri ŞENTÜRK)

Üye : (Prof. Dr. Hacı DEVECİ)

Üye : (Doç. Dr. Celal DURAN)

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Celal DURAN danışmanlığında tamamlanarak, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans tezimi yöneten ve çalışmamın her safhasında yakın ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Celal DURAN'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tüm çalışmalarım boyunca bana yol gösteren ve yardımını esirgemeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Filiz KURALAY'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamı yürütmek üzere Institut Catala de Nanociencia i Nanotecnologia (Katalan Nanobilimler ve Nanoteknoloji Enstitüsü), Barselona, İspanyadaki grubunda beni ağırlayan ve her türlü çalışma imkanını sunan Prof. Dr. Arben MERKOÇI ve çalışma arkadaşlarım Dr. Sandrine MİSERERE, Dr. Mariana Medina SANCHEZ, Miquel CADEVALL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, tez çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Serdar ŞANLI
Trabzon 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “LAB-ON-A-CHIP İÇERİSİNDE İNSAN-İMMÜNOGLOBULİN G TAYİNİ” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Celal DURAN’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 03/01/2014

Serdar ŞANLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
ÖZET.....	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. Optik Sensörler	1
1.1.2. Elektrokimyasal Sensörler	2
1.1.2.1. Nano Yapılı Metal Oksitler.....	3
1.1.2.2. Kuantum Noktaları.....	3
1.1.2.3. Karbon Nano Tüpler	4
1.1.2.4. Grafen	4
1.1.3. Diğer Tespit Yöntemleri	5
1.2. Lab-on-a-Chip Teknolojisi	5
1.2.1. Mikroakışkanlar ve Nanoakışkanlar	6
1.2.2. Mikro Yapılar ve Üretim Yöntemleri.....	7
1.2.3. Elektrot Fabrikasyon Yöntemleri	8
1.3. Mikroakışkanlar Kullanılarak Kuantum Noktası Tayini	9
1.4. Voltametri ve Voltametrik Yöntemler	10
1.4.1. Kare Dalga Voltametrisi.....	11
1.4.2. Sıyırma Voltametrisi	13
1.4.2.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi	14
1.4.2.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi.....	14
1.4.2.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi	15
1.4.3. Dönüşümlü Voltametri	15
1.5. Antikorlar	17
1.6. Literatür Özeti	20
1.6.1. Anodik Sıyırma Kare Dalga Voltametrisi Çalışmaları	20
1.6.2. Elektrokimyasal Yöntemler Kullanılarak H-IgG Tayini Çalışmaları	22

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR VE BULGULAR	23
2.1.	Kullanılan Kimyasallar.....	23
2.2.	Kullanılan Cihazlar	24
2.3.	Prosedürler	25
2.3.1.	Mikroakışkan Cihazı Tasarımı ve Fabrikasyonu.....	25
2.3.1.1.	Kalıp Fabrikasyonu	25
2.3.1.2.	PDMS Üretimi.....	27
2.3.1.3.	PDMS Kanalı ve Siklik Olefin Kopolimer veya Polyester ile Bağlanması	29
2.3.2.	Elektrokimyasal Dedektörler	30
2.3.3.	Lab-On-a-Chip İçerisinde Dolgu Oluşturulması ve Dolgu Optimizasyonu.....	32
2.3.3.1.	Mikrokanal, Süper Mıknatıs ve Manyetik Parçacık Optimizasyonu.....	32
2.3.4.	H-IgG Tayini	38
2.3.4.1.	Lab-On-a-Chip Hazırlanması	38
2.3.4.2.	H-IgG Önderiştirilmesi ve Ölçümü	39
3.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
4.	KAYNAKLAR.....	56
	ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

LAB-ON-A-CHIP İÇERİSİNDE İNSAN-İMMÜNOGLOBULİN G TAYİNİ

Serdar ŞANLI

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Celal DURAN
2014, 61 Sayfa

Bu çalışmada *Lab-On-a-Chip* (LOC) üzerinde mikro akışkanlar kullanılarak, elektrokimyasal yollarla dolaylı olarak insan immüoglobulin-G (H-IgG) tayini yapıldı. LOC fabrikasyonu için Siklik Olefin Kopolimer (COC) zemin üzerine *Screen Printed Elektrot* (SPE) basıldı. Süper mıknatısların yerleştirileceği yeri ve mikroakışkanların geçeceği kanalı oluşturmak üzere Poli(dimetilsiloksan) (PDMS) kullanıldı. Fabrikasyonu yapılan LOC kanalında, üzerine önceden keçi vücudunda üretilmiş Anti H-IgG antikor inkübe edilmiş manyetik parçacıklardan oluşan ve süper mıknatıslarla sabitlenen bir dolgu oluşturuldu. Oluşturulan dolgu malzemesi optimize edildikten sonra, kanaldan farklı konsantrasyonlarda İnsan-İmmüoglobulin G (H-IgG) geçirilerek dolgu malzemesince tutturuldu. İnkübe edilen H-IgG'lerin tayini için kanaldan Quantum noktaları ile inkübe edilmiş, biyotinli, keçiden elde edilen Anti H-IgG antikor geçirildi. Kuantum noktalarının yapısında bulunan Cd^{2+} , asetat tampon (pH 3,0) çözeltisiyle çözülerek elektrot üzerine yollanırken kare dalga voltametri yöntemiyle kadmiyum tayini üzerinden H-IgG tayin edildi.

Anahtar Kelimeler : Antikor, İnsan İmmüoglobulin G, Kare dalga voltametri,
Lab-On-a-Chip

Master Thesis

SUMMARY

HUMAN-İMMÜNOGLOBULİN G DETEKTİYON İN LAB-ON-A-CHIP

Serdar ŞANLI

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Celal DURAN
2014, 61 Pages

In this study Human-Immunoglobulin G (H-IgG) was detected on *Lab-On-a-Chip* (LOC) by using microfluidics and electrochemical detection techniques. *Screen Printed Electrodes* were printed on Cyclic Olefin Copolymer (COC) for fabrication of LOC. Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) was used to place supermagnets and to fabricate the channel for the flow of microfluidics. Inside the LOC microchannel, a plug formed with magnetic beads, which were incubated initially with Anti H-IgG antibodies (produced on goat) by the supermagnets. After optimization of the plug, different concentrations of HIgG were introduced to channel and were captured by the plug. To obtain complete immunoassay, biotinated Anti H-IgG's, which were incubated with quantum dots were introduced to the channel. HIgG was detected in an indirect way via detection of Cd²⁺ associated with quantum dots, which were dissolved in acetate buffer (pH 3.0) and detected by square wave voltametry.

Key Words : Antibody, Human-Immunoglobulin G, Square wave voltametry, Lab-On-a-Chip

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu	12
Şekil 1.2	Tersinir bir reaksiyon için uyarma sinyaline akım cevabı, i_1 ileri akım; i_2 ters akım; $i_1 - i_2$ akım farkı.....	13
Şekil 1.3	Dönüşümlü voltametrizde uyarma sinyali	16
Şekil 1.4	Dönüşümlü voltametri voltamogramı	16
Şekil 1.5	İnsan-immüoglobulin G (URL 1, 2014).....	18
Şekil 1.6	İnsan-immüoglobulin G yapısı.....	19
Şekil 2.1	a) Silikon yonga tabakası, b)Foto dirençli polimer kaplanması, c)UV maskesi yerleştirilmesi, d)UV uygulanması, e)UV dirençli polimerin yıkanması, f)Tamamlanmış mikrokanal kalıbı	26
Şekil 2.2	Tamamlanmış mikrokanal kalıbı.....	27
Şekil 2.3	a)Mikrokanal, b)Mikrokanal kalıbı üzerinde PDMS üretilmesi, c)PDMS'in kalıptan sökülmesi, d)Kanal giriş, çıkışlarının açılması ve oksijen plazmasıyla bağlanacak yüzeyin aktivasyonu, e)COC yüzey ile PDMS'in birleştirilmesi ..	28
Şekil 2.4	Tamamlanmış Lab-On-a-Chip cihazı.....	29
Şekil 2.5	a)COC yüzeye carbon boya ile elektrot şeklinin basılması, b)Gümüş /gümüş klorür elektrodun basılması, c)COC yüzey üzerine basılmış üçlü elektrot sistemi.....	31
Şekil 2.6	Mikrokanal içerisinde manyetik bilyelerle oluşturulmuş dolgu.....	32
Şekil 2.7	Kanal üzerinde oluşturulacak manyetik alanın simülasyonu a) Kuzey-kuzey kutuplar karşılıklı, b)Kuzey-güney kutuplar karşılıklı	33
Şekil 2.8	Manyetik alan yardımı ile dolgu oluşturulması.....	33
Şekil 2.9	100 μm kanalda dolgu yapma çalışmaları.....	35
Şekil 2.10	200 μm kanalda dolgu yapma çalışmaları.....	36
Şekil 2.11	Floresans mikroskopu ile kanal içerisindeki manyetik bilye dolgusu kontrolü	37
Şekil 2.12	MB'ler ile anti H-IgG inkübasyonu	40
Şekil 2.13	MB+ Anti H-IgG çözeltisi.....	40
Şekil 2.14	Kanaldan geçirilen H-IgG'nin MB+ Anti H-IgG dolgusu tarafından tutulması	41
Şekil 2.15	Biyotinli anti H-IgG'lerin QD'lar ile inkübasyonu	42
Şekil 2.16	Dolgu tarafından tutulan H-IgG'lerin biyotinli QD'ları ile işaretlenmesi.....	42
Şekil 2.17	Kanal içerisindeki dolguda tüm inkübasyonun tamamlanmış hali.....	43
Şekil 2.18	a) Ölçümden önceki inkübasyon durumu, b) Asetat tamponu ile QD'ların çözülüp elektrotlara sürüklenmesi, c) QD'larından çözülen Cd^{2+} iyonlarının çalışma elektrodunda biriktirilmesi	44
Şekil 3.1	Kuzey-Kuzey kutuplar karşılıklı mıknatis konfigürasyonu ile manyetik bilye dolgusu denemesi.....	47
Şekil 3.2	Kuzey-Güney kutuplar karşılıklı mıknatis konfigürasyonu ile manyetik bilye dolgusu denemesi.....	48
Şekil 3.3	Optimize dolgu : 200 μm 'lik kanal, 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla 2.6 μg MB	49
Şekil 3.4	Kare dalga voltametrisi ile Cd^{2+} iyonlarının tespiti.....	50
Şekil 3.5	12 ng/mL üzerine tutunmuş QD'larının içeriğindeki Cd^{2+} iyonlarının kare dalga voltametrisi ile ölçümü ve tekrarlanabilirlik testleri.....	51
Şekil 3.6	LOC içerisinde farklı derişimlerde H-IgG ölçümleri	53
Şekil 3.7	H-IgG kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 3.8	Eski çalışmalardan alınan H-IgG kalibrasyon eğrisi (Sanchez, 2009).....	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Mikrokanallarda manyetik bilye dolgusu oluşturma denemelerinde kullanılan kanal genişlikleri, akış hızları ve manyetik bilye miktarları	34
Tablo 2.2 Dönüşümlü voltametri ölçüm protokolü	39
Tablo 2.3 Kare dalga voltametri ölçüm protokolü	45
Tablo 3.1 Spin kaplayıcının farklı dönüş hızları ile kapladığı polimer tabakalarının kalınlıkları (Sanchez, 2009)	46
Tablo 3.2 Farklı UV uygulama sürelerine karşılık kaplama kalınlığı ölçümlerinin standart sapmaları (Sanchez, 2009)	47

KISALTMALAR DİZİNİ

NP	:	Nanoparçacık
AuNP	:	Altın nanoparçacık
PET	:	Polietilen tereftalat
AgNP	:	Gümüş nanoparçacık
QD	:	Kuantum noktası
CdS QD	:	Kadmiyum sülfür kuantum noktası
SiNPs	:	Silikon nanoparçacık
STM	:	Taramalı tünelleme mikroskobu
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	:	Geçişli elektron mikroskobu
AFM	:	Atomik güç mikroskobu
CNT	:	Karbon nanotüp
ECL	:	Elektrokemilüminesans
SAW	:	Yüzey akustik dalgası
LOC	:	Lab on a chip
μTAS	:	Mikro total analiz sistemi
SOC	:	System on a chip
SPE	:	Screen-printed elektrot
MEMS	:	Mikro-elektro-mekanik sistemler
PDMS	:	Poli(dimetilsiloksan)
PMMS	:	Poli[(3-merkaptopropil)-metilsiloksan]
SU8-50	:	Negatif fotodirenç(Formülasyon 50-100)
SWV	:	Kare dalga voltametri
MWCNT	:	Çok duvarlı karbon nanotüp
NC	:	Nanokristal
IgG	:	İmmünoglobulin G
H-IgG	:	İnsan-İmmünoglobulin G
IgM	:	İmmünoglobulin M
IgE	:	İmmünoglobulin E
IgA	:	İmmünoglobulin A
COC	:	Siklik olefin kopolimer
AdCSV	:	Adsorptif katodik sıyırma voltametri
APTES	:	(3-Aminopropil)trietoksisilan
MB	:	Manyetik parçacıklar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde nanoteknoloji birçok alanda yenilikler getirmektedir. Başlıca kullanım alanları olarak sağlık, elektronik, tekstil, gıda ve otomotiv sektörleri örnek gösterilmektedir.

Nanoteknolojinin sağlık sektöründe kullanımı daha çok biyosensör üretimine dayanmaktadır. Biyosensörler genel olarak çeşitli biyolojik varlıkların ve biyokimyasalların tespitini düşük miktarlarda malzeme ve kimyasal kullanarak, yüksek hassasiyette ölçümüne olanak vermektedir.

Bu bölümde çeşitli sensörler, tespit yöntemleri, bu tespit yöntemlerinde kullanılan bazı kimyasallara ve çalışmasını yaptığımız, insan sağlığı için önem taşıyan antikora yer verilmiştir.

1.1.1. Optik Sensörler

Nanoparçacıkların (NP) gerçek özelliklerinin (UV-görünür bölge, ışın absorpsiyon ve florescence ışımaya özellikleri) yanı sıra sensör yüzeyinin optik özelliklerini değiştirebilmeleri sayesinde birçok analitik uygulamada (DNA, protein, hücre, ağır metal tayinleri, vs) hassas tayine olanak sağlamaktadırlar.

Basit altın nanoparçacıkları (AuNP) kanser hücrelerinin tespitinde ümit vermektedir. El-Sayed ve arkadaşlarına göre spesifik antikorlarla nanoparçacıkların konjugasyonu sayesinde kanser hücrelerinin tespiti sadece basit bir ışık mikroskopuyla mümkün görülmektedir (El-Sayed, 2005).

İlgi çekici son çalışmalardan birisinde kolorimetrik metotla, AuNP'lerin kümelenmesiyle oluşan renk değişiminden yararlanılarak proteinaz tayini gerçekleştirilmiştir. Bu bir araya kümelenme, rengin kırmızıdan mora dönmesiyle gözlemlenmiştir. Araştırmacılar sonraki çalışmalarında ise proteinaz ölçümleri için UV spektroskopisi tabanlı biyosensörler kullanmışlardır (Chuang, 2010).

Alizadeh ve arkadaşları ise AuNP'ların monoazacrown eter gruplarının özel yapısı sayesinde, Pb(II) iyonlarının sulu çözeltide, oda sıcaklığında tayini sırasındaki mekanizmayı anlatmışlardır. Bu modifiye edilmiş AuNP'ları Pb²⁺ iyonlarına spesifiktir. Pb²⁺ iyonlarının varlığında renk, kahverenginden mor renge dönmesiyle seçiciliğini gösterir. Bu yöntemde enzimatik bir reaksiyon veya ışığa duyarlı boya molekülleri kullanılmadığı gibi, zaman isteyen aşamalar ve karmaşık cihazlara da ihtiyaç duymamışlardır (Alizadeh, 2010).

Diğer bir yandan gümüş nano parçacıklı plastik sensörler de geliştirilmiştir. Bu sensörler polietilen tereftalat (PET) filmlerinin gümüş nanoparçacıkları (AgNPs) ile modifiyesi temelli üretilip, hassas bir şekilde protein-protein etkileşimlerini ve biotin-avidin bağlanmasını yüzey fonksiyonundaki değişmelerden gözlemleyebilmektedir (Fan, 2010).

Diğer bir kullanışlı parçacık ise birkaç nanometre boyuna sahip kristal yapıdaki Quantum noktalarıdır (QD). QD'ları uygun şekilde uyarıldıklarında kristal boyutlarına göre ışık yayabilirler (Michalet, 2005). Bu nanoyapıların kanser hücresi tespitinde çok büyük bir potansiyele sahip olduğu söylenilebilir. Quantum Dots Corporation gibi bazı şirketler, kanser teşhisinde kullanılmak üzere bu kristal yapıların ticari üretimini yapmaktadırlar (Algar, 2010).

QD'larının boyutlarına ve yüzey modifikasyonlarına göre değişen optik özellikleri yüksek hassasiyete sahiptir. Son zamanlarda yapılan bir çalışma QDs-dopamin-peptit biyokonjuge çiftleriyle pH sensörleri üzerinedir (Medintz, 2010).

1.1.2. Elektrokimyasal Sensörler

Nanoteknolojinin elektrokimyasal biyosensörlerin tasarımında ve geliştirilmesi sırasında yeni alternatifler kazanmasında büyük etkisi vardır. Nanomalzemeler spesifik tayinler yapılırken kimyasal reaksiyonların oluşmasını desteklemekte ve ölçümün hassasiyetini arttırmaktadırlar (Pumera, 2007). Birçok elektrokimyasal yöntemde (voltametrik, potansiyometrik, kondüktometrik, impedimetrik ve taramalı elektrokimyasal mikroskop temelli metotlar) biyolojik testlerde işaretçi (veya etiket) olarak kullanılan NP'ların hassas tayin edilebilirliğinden faydalanılmıştır (Escosura-Muñiz, 2008).

Farklı ölçüm türleri geliştirmeye yardımcı olabilecek, çeşitli elektriksel özelliklere sahip birçok nanoparçacık ve nanocihaz bulunmaktadır (elektrokimyasal hücreler, alan

etkili transistörler, taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve diğerleri). Örnek olarak biyokonjugasyonla modifiye edilen metalik NP'lar mükemmel elektrokimyasal aktivite sergilemişlerdir. Bu NP'ların geçtiğimiz yıllar içerisinde nano-biyo-sensörler içerisinde etiket olarak kullanımlarında artış gözlenmiştir.

NP tabanlı amplifikasyon düzenekleri biyoelektronik testlerin hassaslığını birkaç kat arttırmaktadırlar. 2001 yılında Wang ve arkadaşları (Wang, 2001) ile Limoges ve arkadaşları (Authier, 2001) AuNP'ları işaretçi olarak kullanarak DNA hibridizasyonunun elektronik tayinin yapılmasına önderlik etmişlerdir. Yöntemleri NP'ların hibridize edilmiş hedefler tarafından yakalanması ve ardından yüksek hassasiyetli anodik sıyırma ile ayrılan metalin elektrokimyasal tayini üzerine kurulmuştur.

Diğer stratejiler çeşitli elektriksel etiketleme olanağı sunan inorganik nanokristallerin kullanımına dayanmaktadır. Üç farklı NP (ZnS, CdS, ve PbS) farklı ssDNAlarının sinyallerini, sandviç hibrid yapılar oluşturulduktan sonra metallerin sıyırılıp voltametrik tayini sayesinde ayrı ayrı tespitinde kullanılmıştır (Wang, 2003).

1.1.2.1. Nano Yapılı Metal Oksitler

Nano yapıdaki metal oksitlerin yüksek mekanik, kimyasal, fiziksel, termal, elektriksel, optik, manyetik ve spesifik yüzey alanı özellikleri bu nano yapıları nanoelektronikler, nanofotonikler, nanobiyomateryaller, nanobiyoetiketler v.b. olarak çok kullanışlı kılmaktadır (Wanekaya, 2006). Bu tür bazı nanoyapılara örnek olarak optik, optikelektronik, kataliz, sensör, aktifleştirici uygulamalarında kullanılan ZnO, TiO₂, ZrO₂, SnO₂, CeO₂, MnO₂, Fe₃O₄ ve SiO₂ verilebilir (Ansari, 2009).

1.1.2.2. Kuantum Noktaları

Kuantum noktası (QD) olarak da bilinen koloidal yarı iletken nanoparçacıklar, boyutlarına bağlı olarak ayarlanabilen dar ve simetrik ışımaya spektrumlu foto-uyarılma ve emisyon özelliklerine sahiptirler. QD'lerinin sentezlenme aşamalarında modifikasyonlarla boyutları ayarlanarak, optik ve elektronik özellikleri değiştirilebilmektedir. Bu büyüklüğe bağlı floresans yarı-iletken nanokristaller, moleküler düzeyde biyolojik sistemlerle etkileşmekte ve çoklu biyomoleküllerin tespitini kolaylaştırmaktadır (Sapsford, 2006).

1.1.2.3. Karbon Nano Tüpler

Karbon nano tüpler (CNT) gibi nanomalzemeler bazı deneylerde taşıyıcı olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin CNT'lerin çeşitli enzim işaretçilerine taşıyıcı olarak kullanımı, DNA ve proteinlerin tespitine olanak vermiştir (Munge, 2006).

CNT'ler lokal ilaç dağıtım sistemlerinde ve kanser tedavisinde mükemmel bir etken madde olmasını sağlayan geniş optik radyasyonları yanında çok önemli taşıma ve kimyasal fonksiyonizasyon özellikleri göstermektedir. Karbon temelli materyallerin elektrokimyasal özellikleri büyük ölçüde, yüzeyde elektron transfer oranını arttıran spesifik fonksiyonel gruplar oluşturulması (özellikle oksijen içeren gruplar) gibi yüzey özelliklerine bağlıdır. Nanomalzemelerin bütün bu özellikleri sensör ve biyosensörlerde çok yönlü kullanılmasına olanak sağlamışlardır (Hu, 2009).

Son çalışmalarda CNT'ler nörotransmitterler, hidrojen peroksit, askorbik ve ürik asit, sitokrom c, hidrazinler, hidrojen sülfür, aminoasitler ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi geniş bir bileşik aralığı için elektrokatalitik aktivite göstermekte olduğu görülmüştür. Yüksek iletkenlikleri sebebiyle de CNT'lerin elektrokimyasal ve biyosensörlerde kullanıldıkları da bilinmektedir (Pérez, 2009).

1.1.2.4. Grafen

En yeni gelişmelerden birisi olarak da tek atom kalınlığında ve iki boyutlu biçimlenmiş olan grafen nanomalzeme ortaya çıkmıştır. Grafen, birçok uygulamada kullanılabilen çeşitli özellikleri ile biyosensörlerde CNT'lere alternatif olmak konusunda büyük bir ilgi görmektedir. Örnek olarak, glikoz veya glutamat moleküllerininin, transistör platformundaki grafenin iletkenliğindeki istisnai elektronik değişimlerle tespit edildiği glikoz sensörü gösterilebilir (Huang, 2010). Bazı grafenle modifiye edilmiş transistörlü sensör platformları çeşitlerinde sinyalin arttırabildiği ve gürültünün azaltabildiği gözlenmiştir (Cheng, 2010).

Nanoyapıdaki iletken polimerler, ayarlanabilir gözenekli yapı, yüksek yüzey alanı, düşük enerjili optik geçişler, düşük iyonlaşma potansiyeli, yüksek elektron ilgisi ve iletkenlik özellikleri gibi karakteristik özelliklere sahiptirler (Rajesh, 2009). Ek olarak polimerler, diğer malzemelere nazaran çeşitli ucuz yöntemlerle, istenilen optik, elektronik ve mekanik özellikleri elde etmek için ve fonksiyonize edilebilirler ve biyouyumluluk

sergilemektedirler. Kendine özgü özellikleri ile nanoyapıdaki bu malzemeler birçok araştırmacının çalıştığı analitik bilimlerin geniş bir alanında ve biyosensör cihazlarının kullanımında yenilikler getirmektedirler (Chen, 2009).

1.1.3. Diğer Tespit Yöntemleri

Bu bölümde farklı analitleri tespit için kullanılan bazı alternatif yöntemlerden bahsedilecektir.

Elektrokemilüminesans (ELC) materyalin belirli bir elektrik akımına veya alanına bağlı olarak ışık yaydığı, optik ve elektriksel olgudur. Bir önemli ELC uygulaması, kadmiyum sülfür nanokristal (CdS NC) çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT) yüzeyinde üretilmesi temel alınan enzim biyosensörleridir. MWCNT-CdS ile H₂O₂ nötr çözelti içerisinde etkileşim güçlü ve kararlı ECL emisyonu üretebilir. (Wang, 2009). Aynı prosedürleri kullanarak, H₂O₂ tespitinde 5 µM dan 1 mM a kadar ve 1.7 µM tayin limitiyle kabul edilebilir lineer sonuçlar veren CdS-grafen tabanlı biyosensörler üretilmiştir (Wang, 2010).

Elektromekanik tespit bir diğer önemli tekniktir. Bu teknik rezonans frekansında elektrik sinyaliyle uyarılan pizelektrik katıların yüzeyinde oluşan mekanik titreşimleri ölçen yüzey akustik dalga sensörleri (SAW) üzerinedir. SAW hızı aktif alanda uygulanan materyalin viskozitesine, aktif alandaki kütle değişimlerine ve yüzeydeki sıcaklık değişimlerine karşın hassasiyet gösterir (Arruda, 2009).

1.2. Lab-on-a-Chip Teknolojisi

Analitik kimyanın ilgi alanlarından biri de analitik sistemlerin minyatürize edilmesi, entegre edilmesi ve otomatikleştirilmesidir. İçeriğinde filtrasyon, ekstraksiyon, karıştırma, ayırma ve tayin gibi klasik yöntemleri gerçekleştirebilen sistemler Lab-On-a-Chip sistemleri (LOC) ya da Toplam Analiz Mikrosistemleri (µTAS) olarak adlandırılmaktadır (Dittrich, 2006).

Transistör ve silikon teknolojileri oluşturulduğundan beri, minyatürize sistemlerin geliştirilmesinde hızlı ilerlemeler olmuştur. Başlangıçta, elektronik alanındaki bu teknoloji, farklı türlerde giriş, uygulama ünitesi ve çıkış bulunduran sistemler dizayn etmek

ve geliştirmek için üretilmiştir. Mikroelektronik teknoloji geniş çaplı tespit ve veri işleme cihazları geliştirmeye olanak sunmaktadır.

İlk LOC'ler Stanford Üniveristesinde, 1975 yılında, S.C. Terry tarafından icat edilen gaz kromatografi sistemleridir (Terry, 1975). Fakat, asıl büyük gelişmeler, mikro pompaların ve akış sensörlerinin üretimi ile entegre sistemler konseptinin, yöntemin bütün adımlarını entegre etmesi, ayırma, örneğın temizlenmesi ve tüm analizin tek bir cihazdan alınması konularını derinlemesine incelemesi sonrasında 90'lı yıllarda olmuştur (Manz, 1990).

Mikro toplam analiz sistemlerinin (μ TAS) önemli avantajları, örnek ve reaktiflerin hacimlerinin kullanımını pikolitrelere kadar düşürmek ve moleküler difüzyon gibi reaksiyonların süresini mikrokanalların boyutlarına bağlı olarak azaltma imkanını sunmalarıdır. Bir diğer avantaj ise mikro akışkanlara uygunluğundan dolayı yüzeye bağlı deneylerde imkanlar sağlayan geniş yüzey-hacim oranıdır.

En fazla kullanılan mikro akışkan sistem cihazları düz plastik veya cam substratlar üzerine yapılan mikrokanal ağlarının bir araya getirilmesiyle oluşmaktadır.

1.2.1. Mikroakışkanlar ve Nanoakışkanlar

Mikroakışkan teknolojileri son yıllarda hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Mikro akışkanların teknik bilgileri biyoteknoloji, çevre, tıp ve ilaç sanayisi gibi farklı alanlarda çözümler ve yeni ürünler geliştirmek için yönlendirilmiştir (Haeberle, 2007).

Mikromakineleşmedeki yenilikler ve mikroelektronik teknolojilerinin kullanımı ve deneysel mikroakışkanlar alanındaki ilerlemelere olanak sağlamıştır. Bu ilerlemeler sayesinde diğer elektronik cihazlar, uyarıcılar ve sensörleri bir araya getirme fikri de mümkün olmuştur. Diğer taraftan mikroakışkanların kullanımını kontrol edilebilen yapılar, geometriler ve etkileşimlerle özėün yapılar oluşturmak gereklidir. Özėün yapıların geliştirilmesi, ölçümdeki hassasiyetin artması, veri işleme ve depolama birimlerinin teknolojik açıdan gelişmesi ile mikro akışkan kullanımı nanoakışkan kullanımına doğru kaymaktadır (Mitajovic, 2005).

Nanoakışkan çalışmaları, bir veya daha fazla yönde 100 nm den daha küçük hacimli kanallar içerisindeki akışkanların hareketlerini inceler. Bu konu, DNA ayrımları için kullanılan katı malzemeler yerine polimer jellerin kullanılmasıyla yaygınlığını artırmıştır. Herhangi bir uygulama gereksinimine cevap vermek, yeni nanofabrikasyon teknikleri

geliştirmek veya nano ölçüde akışkan davranışlarını anlamak ve araştırmak için nanoakışkan cihazlar tasarlanabilmektedir (Sparreboom, 2009).

1.2.2. Mikro Yapılar ve Üretim Yöntemleri

60'lı yıllardan bu yana endüstri ve araştırmacılar, çok sayıda transistörü olabildiğince küçük bir alanda içeren ve bu sayede hacim ve maliyeti düşürürken performans ve fonksiyonlarını artıran entegre çipler geliştirmeye çalışmaktadırlar (Lyschevski, 2001). 80'lerde MEMS (mikro-elektromekanik sistemler), yeni mekanik sistemlere yön vermek için oldukça önem kazanmıştır. MEMS uygulamaları genellikle yüzeysel ve iki boyutlu veya daha kompleks geometriler oluşturmak üzere üretilmesine bağlı olarak ikiye ayrılabilir. MEMS uygulamaları, nano ve biyotest uygulamaları için özel ilgi alanı kabul edilebilir. Pek çok mikro üretim teknikleri aşağıda tanımlandığı gibi geliştirilmekte ve çip dokusu için uygulanmaktadır (Levinson, 2001).

Fotolitografi bir deseni substrat üzerine transfer etmek için kullanılan optik bir yöntemdir. Litografik yazdırma da yine benzer temellere dayanan bir yöntemdir. Bu teknik bir substratın yüzeyine bir fotomaske yardımı ile Üç Boyutlu (3D) bir desenin transferini gerçekleştirir. Bu yöntemin kullanılmasıyla üretilen 3D yapılar, MEMS sensörlerine, optik cihazlara ve mikro akışkan uygulamalarına girmişlerdir (Grayson, 2004).

Soft Litografi uygun fotomaskler kalıplar ve elastomerleri kullanan bir üretim tekniğidir. Soft olarak adlandırılmasının sebebi, elastomerik materyal olarak özellikle poli(dimetilsiloksan) (PDMS) ve yakın zamanlarda poli[(3-merkaptopropil)-metilsiloksan] (PMMS) gibi mikrometreden başlayarak, 100 nm skalanın altına kadar başarılı çoğaltma tekniklerini gösteren malzemelerin kullanılmasıdır (Campos, 2009). Genellikle mikro ve nano ölçekteki cihazların üretiminde kullanılır. Bu yöntem kapiler içinde mikrotransfer, mikro baskılama aracılığıyla baskılama, kopyalama yöntemiyle baskılama ve mikro kontakt yöntemi gibi etkileyici bir teknolojiyi kapsamaktadır (Lomas, 2009).

Mikro üretim önceden tanımlanan malzeme geometrilerini elde etmek için çelik bir kesme aletin kullanımına dayalıdır (Shiu, 2010). Buna rağmen bu teknik yöntemle elde edilen boyutlar, *Lithography* kullanılmasıyla elde edilen boyutlar kadar küçük değildir. Daha küçük cihazlarla birleşmesi için platformun yapısına izin verir.

Mikro akışkan sistemleri oluşturmak için kullanılan diğer yöntemler: *X-Rays Lithography* (Mongpraneet, 2009), *yüksek duyarlılıkta baskılama*, *sıcak kabartma* (Greener,

2009), *mikro-enjeksiyon baskılama* (Choi, 2009), “*roll to roll*” *kabartma* (Yeo, 2009). Bu teknolojiler çok çeşitli malzemeler ile üç boyutlu kompleks yapıların oluşumuna olanak sağlamaktadırlar. Sonuç olarak, tüm bu yöntemlerle birlikte PDMS, fleksopolimer gibi malzemeler ve camla birleştiklerinde oluşturdukları 3D mikro ve nano yapıların kullanımı son zamanlarda yaygın bir alan oluşturmaktadır (Sayah, 2009).

Ink Printing Technology; Başlangıçta bu teknoloji dekorasyon nesnelere ve bilgisayar bilimi için kullanılmaktaydı. Şu anda yaygın bir şekilde farklı yüzeyler üzerinde, örneğin alüminyum, cam, plastik ve kağıt gibi yüzeyler üzerine yazdırmak için kullanılmaktadır. Şu sıralar grafit mürekkepler, gümüş, karbon nanotüp mürekkepleri, polimer mürekkepler ve benzerleri gibi özel mürekkepler kullanılmaktadır. Bu teknik ve mürekkepler, herhangi bir maskeleyim olmaksızın üç boyutlu yapılarını meydana getirmek için kesin bir kalınlık ve pürüzsüzlükle geometrilerin çizilmesine olanak sağlar (Roy, 2007).

Prototyping, hedeflenen tasarımın bir bilgisayar aracılığıyla tabaka tabaka üretiminin yapıldığı bir tekniktir. Biriktirilen reçine, bir lazer yardımı ile polimerize edilirken katılaştırılarak şekil verilir. Katılaştıran bu polimer ile üç boyutlu yapıların oluşumuna olanak sağlanır (Nath, 2010).

1.2.3. Elektrot Fabrikasyon Yöntemleri

Screen-Printed Teknolojisi (SPE) iletken veya iletken olmayan özel mürekkeplerin istenilen geometride üretilmiş bir maske aracılığıyla inert substratlar üzerine art arda transferine dayalıdır. Son zamanlarda screen-print fabrikasyon teknolojisi, yaygın bir şekilde biyolojik ya da kimyasal sensörlerin üretiminde kullanılan kalın film elektrotlarının imalatında kullanılmaktadır (Fanjul-Bolado, 2008). SPE bu teknolojinin yüksek imalat verimi ve düşük maliyetinden dolayı en önemli ürünlerinin birini temsil eder.

Genellikle screen-printed fabrikasyonunda kullanılan inert substratlar seramik ya da polimeriktirler. Polimerik substratlardan poliester substratlar, çoğunlukla dirençliliği, berraklığı termal ve hidroskopik kararlılığı ve sertliği için kullanılmaktadırlar. Baskı mürekkeplerinin gerçek kompozisyonunu ticari ve patenli olduklarından dolayı tam olarak bilmek mümkün değildir.

1.3. Mikroakışkanlar Kullanılarak Kuantum Noktası Tayini

Yarı iletken parçacıklar olarak da bilinen kuantum noktaları (QD) nanometrik ölçülerde kristal kümeler halindedirler (Murphy, 2002). Kullanıldıkları en önemli alanlardan ikisi, etiket olarak görüntüleme ve biyosensörlerdir. Diğer etiketlerle karşılaştırıldıklarında daha kararlı ve ucuzdurlar. İmmün testler, DNA analizleri gibi birçok multi analizde diğer etiketlere oranla daha esnek ve hızlı bağlanma kinetikleri, yüksek hassasiyet ve yüksek reaksiyon oranları sergilerler.

Diğer floresans etiketlerden farklı olarak QD'ları özel optik özellikleri sayesinde moleküler, hücresel ve canlı ortamında görüntüleme uygulamalarında yeni bir sınıf oluştururlar (Empedocles, 1999 - Kuno, 1997). QD'ları büyüklüğe bağlı ve dar bir emisyon spektrumu sergilerler (Norris, 1994). Geniş absorpsiyon profiline ve üstün fotokararlılığa sahip olan QD'ları kimyasal bozulmalara ve floresan boyalara göre foto bozulmalara karşı mükemmel direnç göstermektedir.

QD'ları elektrokimyasal özellikleri için de çalışmalarda kullanılmaktadırlar. QD'ları direkt olarak (Merkoçi, 2007) veya HNO_3 ile çözülüp, içeriğinden çözeltiye geçen metal iyonlarının elektrokimyasal yolla tespitiyle dolaylı yoldan tayin edilebilirler (Wang, 2003). Kendine has elektrokimyasal özelliklere sahip QD'ları DNA ve protein tayinlerinde etiket olarak kullanılabilirlerdir (Liu, 2003).

Mikroakışkan platformların kullanıldığı birçok çalışmada şimdiden kuantum noktalarının konjugasyon ve tespiti yapılmaktadır. Genelde QD'larının optik özelliklerinin kullanılmasına odaklanılmıştır. Örneğin biyosensörlerin mikroakışkan platformlarına uygulanmasındaki ve tasarımlarındaki bazı ilerlemeler, nanoparçacıklar ve hücreler arasındaki etkileşimlerin tespitini mümkün kılmıştır. Bununla birlikte bu platformların sensör yüzeyindeki ligandların varlığını, akışkanın akması esnasında yarattığı kayma gerilmesi ve bunun in vitro ortamda hedeflenen verimi nasıl etkilediğini gösterecek çalışmalara da odaklanılmıştır. Parçacık büyüklüğünü ve parçacık yüzeyindeki ligand yoğunluğunu tespit etmek için, aynı zamanda akış şartlarında hedeflenen hücrelere bağlanma çalışmalarında kullanılabilirlerdir (Farokhzad, 2005).

Diğer bir ilginç çalışma ise özgün quantum noktalarını izole etmek, tespit etmek ve tanımlamakta kullanılan mikrometre altı akışkan kanalı üretimidir. Tüm kanal boyunca akışan ve floresans özellik gösteren QD'larının hızlı tespiti neredeyse tüm immün sistem

testleri veya farklı hibritleşme deneyleri için de kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Stavis, 2005).

Bu yolla çok yönlü belirlemeler için nano-biyo cipler geliştirilmektedir. Biyomarkerlerin miktarı için modüler mikroakışkan biyosensörlerin içine doğru QD entegrasyonunun bir örneğidir. Bu yöntem, hem serum hem de tüm vücut salgıları türleri için kullanılmaktadır (Jokerst, 2009). Viric DNA analizleri için diğer mikroakışkan platform pratik serum ekstraktlarından HBV genotiplerinin belirlenmesi için geliştirilmiştir. Bu mikroakışkan cihaz, örneklendirme mikroakışkanı ve dizilendirilmiş bölmelerle bir fonksiyonel bölgeyi oluşturmak için farklı cip yapısı ve kanal derinlikleriyle iki PDMS kalın dilimlerinin kullanılmasıyla bir araya getirilmiştir (Zhang, 2010).

Diğer çalışmalar nanopartiküllerin toksikliğini analiz etmek için yönlendirilmektedir. Maruz kalınan şartların lokalize edilmesi esnasında neron-like PC12 hücreleri üzerinde modifiye edilen QD'ları yüzeyinin sitotoksik etkisinin araştırılmasına açık bir örnektir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; QD'larının yüzeylerindeki ligandların yüzeyindeki kararlılığına bağlı olan nöronların toksikliğine neden olabilmektedir (Mahto, 2010). Buna ek olarak diğer çalışmalar, bu potansiyel toksikliği minimize ederek onların fotofiziksel özelliklerinin avantajlı olmasını sağlamaya çalışmaktadır ve ışımaya yapan kuantum noktalarının kullanımı ile duyarlı ince filmlerin yapısına odaklanılmıştır. Örnek bir çalışmada CdSe/ZnS yapısını elde etmek için floresans kuantum noktalarını ince foto elektrolit filmlerinin iç tabakalarına ve moleküler floroforları ince katman yüzeyine yerleştirmişlerdir. (Crivat, 2010).

1.4. Voltametri ve Voltametrik Yöntemler

Elektrot potansiyelinin değişmesi ile elektrolitik hücreden geçen akımın ölçülmesine dayanan elektroanalitik yöntemlerin geneline voltametrik yöntemler adı verilir.

Voltametri bir elektrokimyasal hücre içerisinde derişim polarizasyonu şartları altında oluşan akımın ölçülmesi esasına dayanır.

Voltametrik ölçümlerde üçlü elektrot sistemleri kullanılmaktadır. Ölçümler sırasında potansiyeli zamanla değiştirilen elektrot, çalışma elektrodu (indikatör elektrot) olarak adlandırılır. Potansiyeli deney süresince sabit kalan elektrot referans elektrot, üçüncü elektrot ise karşıt veya yardımcı elektrot ismini alır. Çalışma elektrotlarına civa, platin, altın, paladyum, karbon elektrot (grafit, karbon pasta elektrot, camsı karbon elektrot,

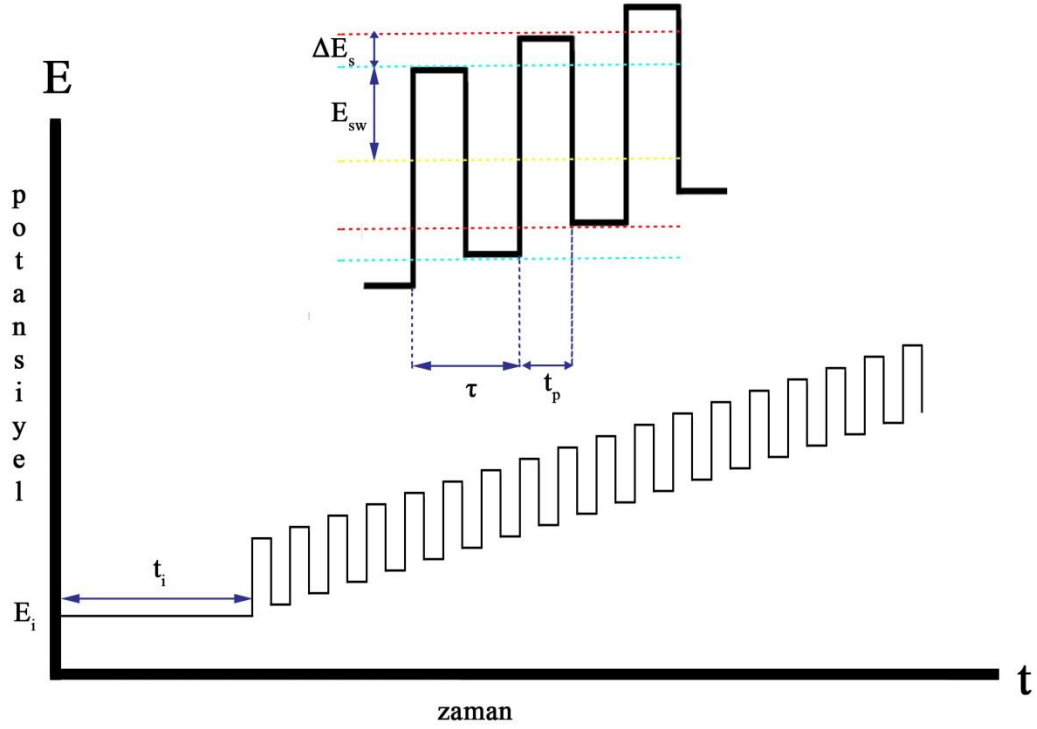
karbon cloth elektrot) örnek verilebilir. Çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrot kullanılması durumunda elektrokimyasal yöntem polarografi adını alır. Referans elektrotlar için genellikle Ag/AgCl veya kalomel elektrot kullanılırken karşıt elektrot için Pt tel veya karbon elektrot kullanılabilir.

Elektroaktif maddelerin tayini, yükseltgenme, indirgenme tepkimeleri, elektrot yüzeyinde oluşan adsorpsiyon ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde meydana gelen elektron aktarım mekanizmalarının incelenmesi gibi bir çok alanda voltametrik ve polarografik yöntemler kullanılmaktadır (Zuman, 1962, Zuman, 1992).

1.4.1. Kare Dalga Voltametri

Bu yöntem son derece hızlı ve duyarlı olmasından dolayı diğer yöntemlere üstünlük sağlamıştır. 10ms'den daha az sürede voltamogramın tamamı elde edilebilir.

Sekil 1.1'de bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu görülmektedir. Kare dalga voltametri ölçümlerinde her bir kare dalga pulsu uygulanmadan önce ve pulsun bitiği anda akım ölçülür. Yani kare dalganın anodik ve katodik bölgesindeki iki noktaya ait akım değerleri ölçülür. Ölçülen pik akımı katodik ve anodik bölgelerde tespit edilen pik akımlarının toplamına eşit olur ve böylece duyarlılık artmış olur (Tural, 2003).

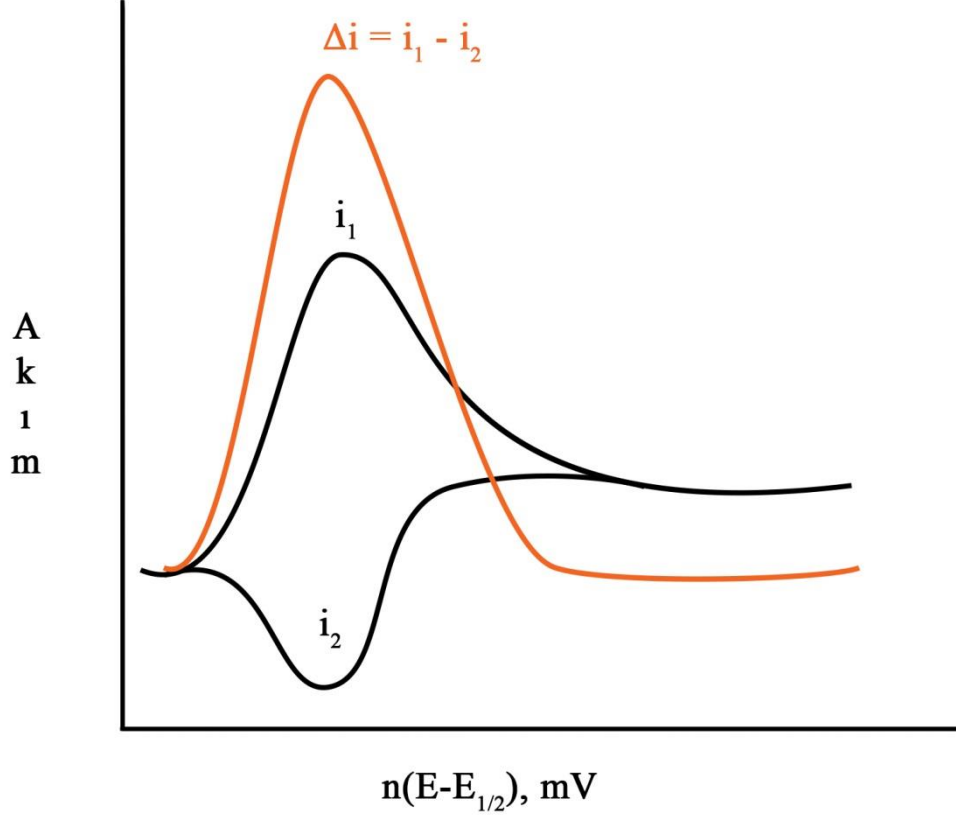


Şekil 1.1 Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu

Bir kare dalganın tamamlanma süresi olan periyod, τ ile gösterilir. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına basamaklı adım yüksekliği adı verilir ve ΔE_s ile gösterilir. Kare dalga genliği (E_{sw}), her bir dalganın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısına eşittir. Puls genişliği (t_p), $\tau/2$ 'ye eşittir. Genellikle periyod yerine $1/\tau$ a eşit olan frekans (f) kullanılır. Frekansın artması ve buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve hassasiyet artar. Kare dalga voltametrisinde deneysel parametreler belirli aralıklarda seçilir. Deneylerde frekans genellikle $10 \leq f \leq 1000$ Hz veya periyod $1 \leq \tau \leq 100$ ms aralığında olmalıdır. Basamaklı adım yüksekliği ise aktarılan elektron sayısına (n) bağlı olarak $\Delta E_s = 10/n$ mV eşitliğinden bulunur. E_{sw} ise genelde $50/n$ mV'dur (Skoog, 1996).

Kare dalga voltametrisinde akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalganın net akımı $\Delta i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir ve ileri fark akımı

olarak adlandırılır. Δi farkı potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde voltamogram, Şekil 1.2'den de görüldüğü gibi tek pik şeklinde elde edilir (Skoog, 1996).



Şekil 1.2 Tersinir bir reaksiyon için uyarma sinyaline akım cevabı, i_1 ileri akım; i_2 ters akım; $i_1 - i_2$ akım farkı

Δi farkı konsantrasyonla doğru orantılı olarak değiştiğinden dolayı kare dalga voltametri kantitatif tayinlerde kullanılan bir metottür.

Kare dalga voltametrisinin en önemli avantajı son derece hızlı ve duyarlı bir yöntem olmasıdır (Skoog, 1996). Ayrıca kare dalga voltametri, bir sıvı kromatografisinden alınan bileşiklerin saptanmasında da kullanılabilir (Aycan, 1994).

1.4.2. Sıyırma Voltametri

Son 20 yıl içerisinde özellikle eser elementlerin analizinde veya tayini yapılacak örneğin derişiminin çok düşük olması durumunda elektroanalitik yöntemlerin yetersiz kalmasından dolayı yeni ve duyarlılığı yüksek olan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktaydı. Bu nedenle duyarlılığı daha yüksek olan sıyırma voltametri teknikleri geliştirilmiştir. Bu

yöntemler farklı analitlerin bir arada tayini, cihazların ucuz olması ve ölçüm kolaylığı sebebiyle üzerinde sıklıkla çalışılan yöntemler olmuşlardır.

Sıyırma voltametri yönteminin genelinde analiti elektrot üzerinde biriktirme ve ardından çözülüp sıyırılması sırasında alınan ölçümlere dayanır. Sıyırma voltametri analiti ön deriştirmenin niteliği ve sıyırma aşamasında potansiyelin taranma yönüne göre üçe ayrılır.

- Anodik Sıyırma Voltametri
- Katodik Sıyırma Voltametri
- Adsorptif Sıyırma Voltametri

1.4.2.1. Anodik Sıyırma Voltametri

Anodik sıyırma voltametrisinde analit çözeltisindeki metal iyonlarını elektrot yüzeyinde önderiştirilir. Bu önderiştirme için çalışma elektroduna negatif potansiyel uygulanır.

Yüzeyde metalik halde biriken metal iyonlarının sıyırılması aşamasında ise elektrot potansiyeli anodik yönde doğrusal veya diğer tekniklerle taranır ve böylelikle yüzeyde metalik olarak toplanan türün yükseltgenmesi ve çözeltiye geri difüzyonu gerçekleşir (Zuman, 1992). Elde edilen sıyırma voltamogramındaki yükseltgenme pikinin şekli ve konumu biriktirilen analitin türüne ilişkin kalitatif ve kantitatif bilgi verir.

1.4.2.2. Katodik Sıyırma Voltametri

Potansiyel tarama yönü anodik sıyırma voltametrisinden farklı olarak katodik yönde ilerletilen bu yöntemde öncelikle çalışma elektrodu olarak kullanılan metalik civa elektrodu yüzeyinde civa ve analitin çözünürlüğü az olan bir tuzunun oluşması sağlanır. Sıyırma esnasında ise potansiyel negatif yönde taranarak, az çözünen tuzun bileşimindeki metal iyonunun indirgenmesi izlenir.

Analitin uzun süre biriktirmeye çalışılması veya yüksek analit derişimlerinde çalışmak elektrot yüzeyinde doygunluğa sebep olabilir. Doygunlaşan elektrot yüzeyinden alınan ölçümlerdeki pikler güvenilir değildir. Katodik sıyırmada elde edilen pik potansiyelleri ile de kantitatif analiz gerçekleştirilebilir.

1.4.2.3. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi

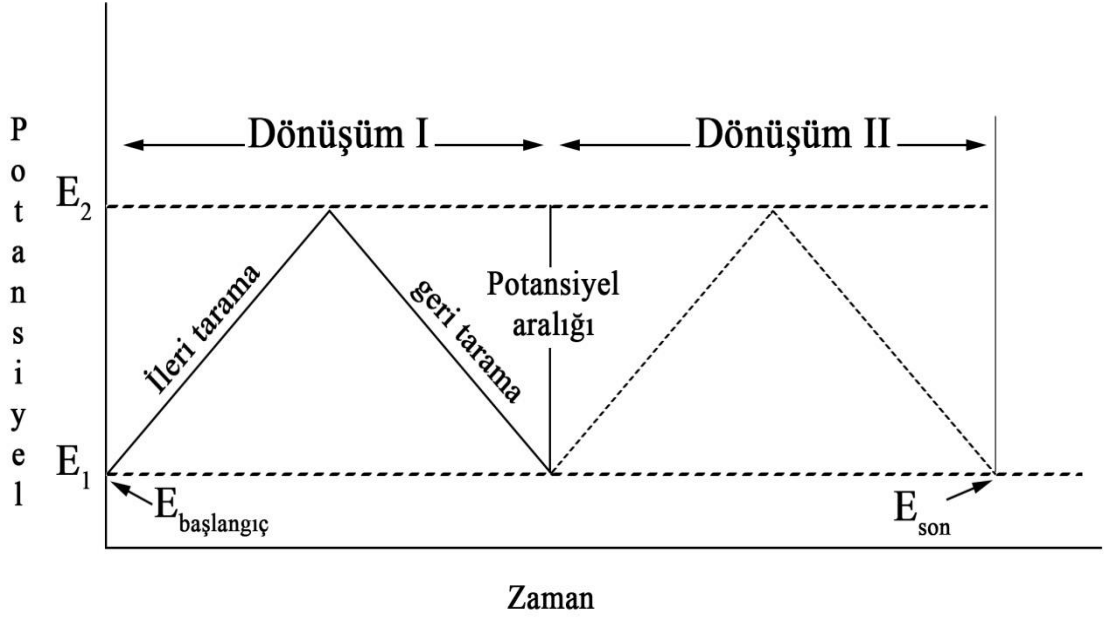
Bu yöntemde önderiştirme, karıştırılan bir çözeltilde elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla sağlanır. Bu yolla elektroaktif ve yüzey aktif özellikte birçok önemli bileşik hassas olarak tayin edilebilmektedir.

Bu yöntemle hazırlanan kalibrasyon grafiğinin doğrusal aralığı önderiştirme yapılan analitin büyüklüğüne, hidrofobik özelliğine ve elektrot yüzeyine yönelimine göre değişir. Genellikle de seyreltik çözeltilerde ve kısa sürelerde biriktirme uygulanır. Adsorptif sıyırma voltametrisi katodik ve anodik olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Ancak daha çok Adsorptif katodik sıyırma voltametrisi (AdCSV) kullanılmaktadır (Skoog, 1996).

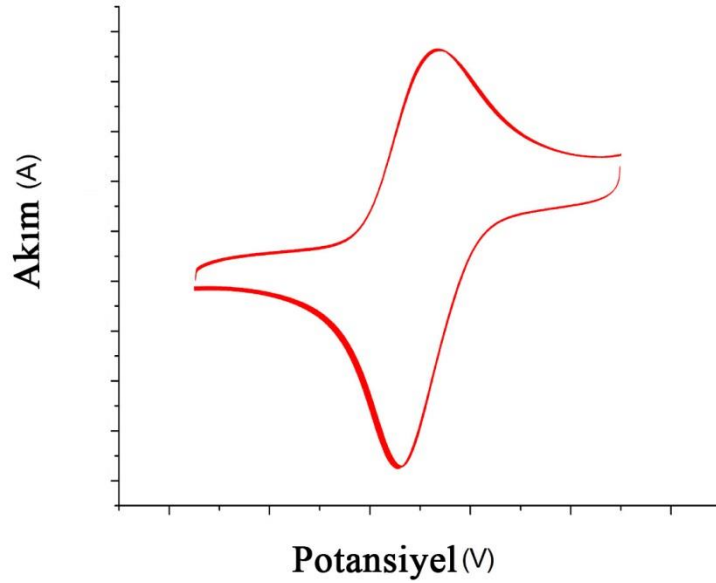
1.4.3. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV), çözeltilde ve çözelti elektrot arayüzeyinde elektroaktif türlerin incelenmesi açısından en uygun elektroanalitik tekniklerden birisidir. Bu teknikte sabit bir elektrota çok hızlı potansiyel taramaları uygulanır.

Dönüşümlü voltametrde elektroaktif tür içeren durgun bir çözeltilde bir elektrota bir başlangıç potansiyelinden (başlangıç potansiyel, E_{bas}) başlayarak belirli bir tarama hızında doğrusal olarak artan bir potansiyel uygulanır ve uygulanan potansiyel belirlenen bir değere ulaştıktan sonra (ara potansiyel, E_{ara}) yine doğrusal olarak azalacak şekilde belirli potansiyel değerine (bitiş potansiyeli, E_{son}) kadar ters yöne çevrilir. Başlangıç potansiyeli değeri ile bitiş potansiyel değeri aynı olabildiği gibi farklı da olabilir. İleri ve geri tarama işlemi (döngü, cycle) yapılan çalışmaya göre bir veya birkaç kez yapılabilir (Tural, 2003). Potansiyel tarama sırasında analit ve elektrot arasında gerçekleşen indirgenme yükseltgenme tepkimelerinden kaynaklanan akım ölçülür. Elde edilen akım-potansiyel eğrisine döngüsel voltamogram denir. Dönüşümlü voltametrde potansiyel-zaman ilişkisi, potansiyel-akım ilişkisi ve elde edilen voltamogramlar Şekil 1.3 ve Şekil 1.4'de verilmiştir.



Şekil 1.3 Dönüşümlü voltametri de uyarma sinyali



Şekil 1.4 Dönüşümlü voltametri voltamogramı

Dönüşümlü voltametri de genellikle tarama hızı 100 mV s^{-1} den 1000 V s^{-1} ye kadar değiştirilebilir. Dönüşümlü voltametri de tarama hızı değiştirilerek pik akımlarının tarama hızı ile değişmesinden adsorbsiyon, difüzyon ve elektron aktarım reaksiyonuna eşlik eden kimyasal reaksiyon olaylarının varlığı belirlenebilir. Ayrıca ileri ve geri tarama piklerinden reaksiyon mekanizması hakkında fikir edinilebilir, kinetik veriler bulunabilir.

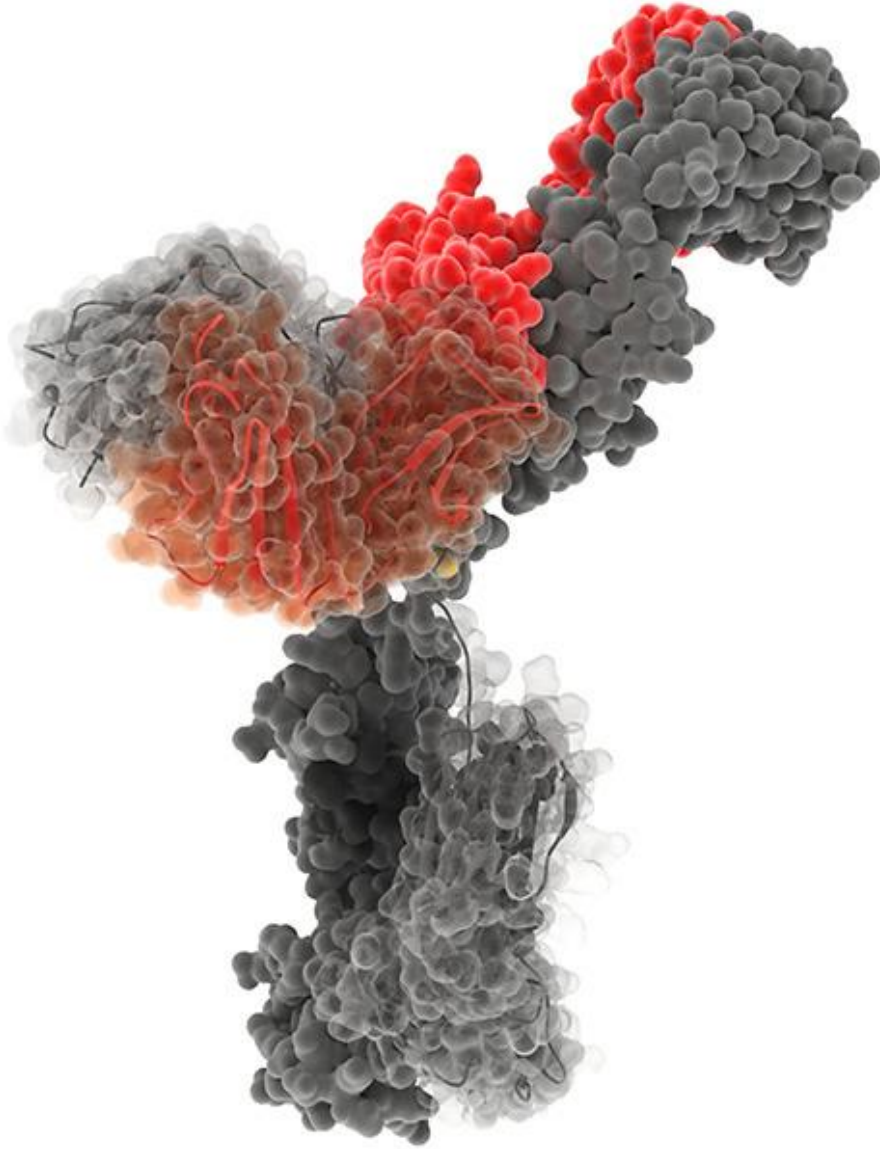
1.5. Antikorlar

Antikorlar insan savunma sistemi (immün sistem) hastalıklara sebep olan bakterilerin, mantarların, protozoaların ve virüslerin tanınmasını sağlar ve yok edilmelerini sağlayacak yolları tetiklerler.

Kan dolaşımında yabancı bir madde (antijen) varlığında vücut o antijene özgün antikor üretir ve üretilen antikorlar antijeni tanıyıp ona sıkıca bağlanırlar. İnsan vücudunda yapı ve görevlerine göre antikorlar 5'e ayrılırlar. Bu antikorlardan biri olan İmmunoglobulin M (IgM) kan dolaşımına giren antijeni ilk tanıma ve yok etme sürecini başlatır. On gün sonra kanda IgM azalırken eş zamanlı olarak İmmunoglobulin G (IgG) üretimi başlar. IgG üretimi birincil savunma yanıtı olarak adlandırılır. Aynı antijenin yıllar sonra bile olsa kana tekrar karışması durumunda savunma sisteminin hızlı ve yüksek miktarda o antijene özgü IgG üretimine geçmesi ise ikincil savunma sistemi olarak adlandırılır (Hames, 2010).

Antikorların ikinci görevi olan dolaşımdaki antijen veya patojenin yok edilme işlemini gerçekleştirecek olan kompleman sistemini aktive etmektir. Kompleman sistem yabancı mikroorganizmanın zarında delikler açarak sonunda parçalanmasına sebep olan 20 kadar çözünebilen proteinden oluşur.

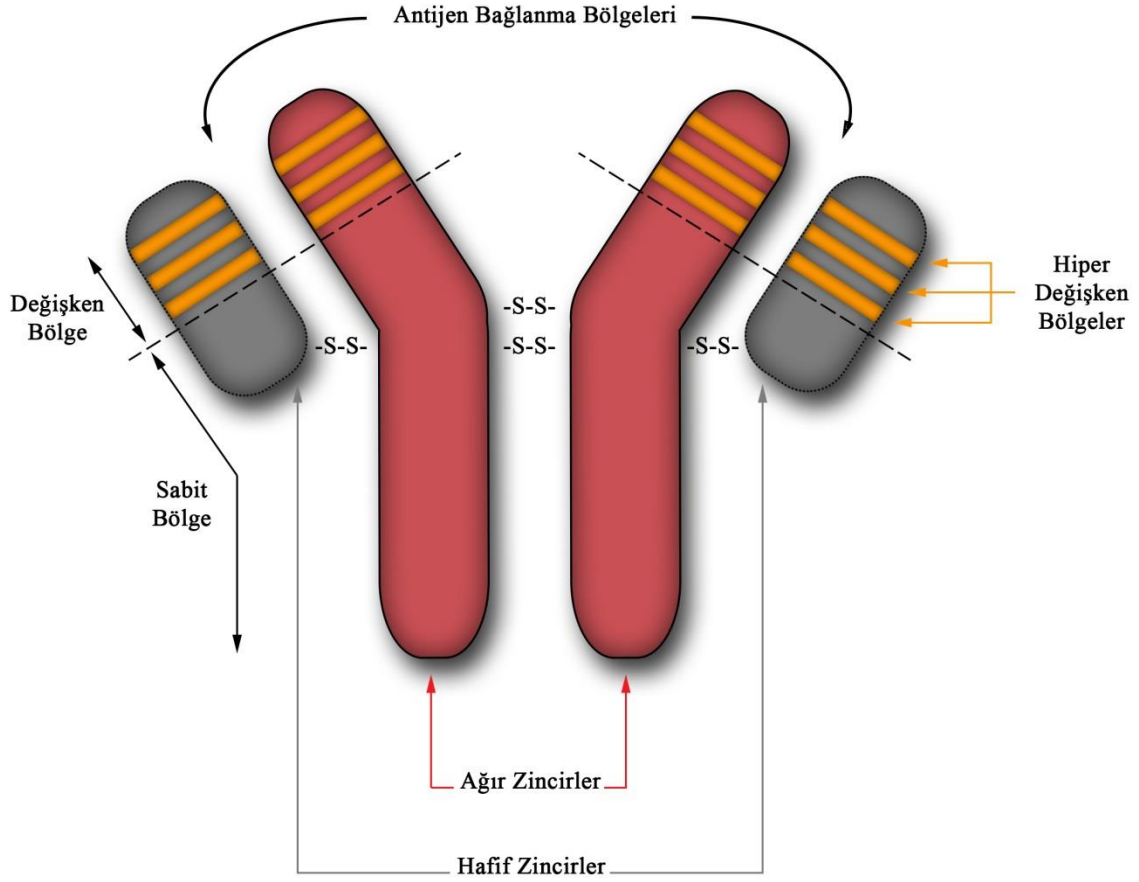
Kompleman sistemler sadece antijene bağlı antikorlar tarafından aktive edilebilirler. Bağlı olmayan çözünmüş durumdaki antikorlar kompleman sistemi aktive edebilme özelliğinden yoksundurlar.



Şekil 1.5 İnsan-immünoglobulin G (URL 1, 2014)

Her IgG Y şeklindedir(Şekil 1.5). 440 adet aminoasitten oluşan iki adet ağır zincir ve 220 adet aminoasitten oluşan iki adet hafif zincirlerin birbirine disülfür bağlarıyla bağlanması ile oluşurlar (Hames, 2010).

İnsan-immünoglobulin G (H-IgG)'ler iki adet antijen bağlanma noktasına sahiptirler. Her bir antijen bağlantı noktası bir hafif bir ağır zincirin hiper değişken bölgelerinin bir araya gelmesiyle oluşur (Şekil 1.6). Bu bağlantı noktaları tamamen antijene özgün ve seçicidir. Her bir antikörün iki adet bağlantı noktasına sahip olması sayesinde bir antikör iki antijeni bağlayarak antijenlerin yoğunlaşmasını sağlayabilir.



Şekil 1.6 İnsan-immünoglobulin G yapısı

İnsan kanında bulunan 5 farklı tip antikorlar İmmünoglobulin A (IgA), İmmünoglobulin D (IgD), İmmünoglobulin E (IgE), İmmünoglobulin G (IgG), İmmünoglobulin M (IgM) olarak adlandırılırlar ve sırasıyla, yapı ve görev açısından farklılık gösteren α , δ , ϵ , γ ve μ ağır zincirlerine sahiptirler. IgG, γ tipi ağır zincirinin kendi içinde γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 şeklinde 4 alt gruba ayrılması ile bu ağır zincirlere sahip IgG'ler de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ şeklinde 4 alt gruba ayrılır.

İmmünoglobulin yapısındaki bu farklı ağır zincirler, İmmünoglobulinlerin farklı görevleri üstlenmesinden sorumludurlar. Örnek olarak İmmünoglobulin M kanda yabancı bir madde ile karşılaşılması durumunda ilk sentezlenen antikordur. Makrofajları uyararak fagositozu da uyarır.

IgA gözyaşı, tükürük, bağırsak salgılarında ve akciğerde bulunan esas antikordur. Enfeksiyona karşı vücudun ilk korumasıdır.

IgE beyaz kan hücrelerini aktive ederek parazitlerin öldürülmesinde rol oynar.

IgG birincil savunmanın geç dönemlerinde ve ikinci savunmada rol oynar. Kompleman sistemleri uyarabilir ve makrofajları tetikleyebilir. Vücut salgılarında bulunmamakla birlikte kandan plesentaya geçebilme özelliği sebebiyle anne karnındaki bebeğin immünolojik korunmasından sorumludur. Anne sütünden de salgılanıp, bağırsaktan emilimi sayesinde doğumdan sonra da bebeğin bağışıklığının sağlanmasına olanak verir.

Özgün antikorlar biyolojik örneklerdeki hedef antijenlerin miktarını tayin etmek için kullanılabilir. Bu konu ile ilgili pek çok immünolojik yöntemden en çok bilinenlerden biri de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) olarak bilinir. ELISA testlerinde bir yüzeye tutturulan spesifik antikor, biyolojik numunedeki hedef antijene bağlanır ve onu immobilize eder. Tutulan antijenlerin tespit edilebilmesi için örnek üzerine floresans, renk veya elektrokimyasal bir işaretçi bağlanmış ikinci bir özgün antikor tutturulur. Bağlanmış antijenler tarafından tutulmayan fazlalık işaretçi antikorlar çözeltiden yıkanarak uzaklaştırılır. Son olarak yakalanmış antijenlere bağlanan işaretçi antikorlar, floresans mikroskobu veya elektrokimyasal yöntemlerle tespit edilebilir. İşaretçilerin miktarı antijen miktarı ile doğru orantılı olacağından, dolaylı yoldan antijen miktarı tespit edilebilir (Hames, 2010).

1.6. Literatür Özeti

1.6.1. Anodik Sıyırma Kare Dalga Voltametri Çalışmaları

Lv ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Hidroksipropil-siklodekstrin grafen oksit hibrit nanoyapılar sentezleyip, bu nanoyapıları bizmut filmler üzerine yerleştirerek bizmut filmleri modifiye etmişlerdir. Modifiye edilen bizmut filmler Pb^{2+} , Cd^{2+} iyonlarını birlikte anodik sıyırma voltametri ile tayin etmek için kullanılmıştır. 120 saniye boyunca -1,3 V potansiyel uygulanarak hücredeki iyonların bizmut filmler üzerine tutulması sağlanmıştır. Asetat tamponu (pH 4,5) kullanılarak -1.5 V tan 0 V a doğru potansiyel uygulanarak 25 Hz frekans, 5 mV dalga genliği ve 5 mV potansiyel atlama aralıklarıyla anodik sıyırma kare dalga voltametri ölçümleri yapılmıştır. Pb^{2+} yaklaşık -0,60 V ve Cd^{2+} yaklaşık -0,83 V

potansiyelinde gözlenmiştir. 5×10^{-10} - 9×10^{-9} mol L⁻¹ derişim aralığında Cd²⁺iyonu için yapılan kalibrasyon eğrisinde $y=0,281x-0,086$ regresyon eşitliği (x: derişim/nmol L⁻¹; y: akım/ μ A) elde edilmiştir ve dedeksiyon sınırı $6,73 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹ olarak bulunmuştur (Lv, 2013).

İlluminati ve arkadaşları şarap örneklerindeki Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺ iyonlarının tespiti için anodik sıyırma kare dalga voltametrisini kullanmışlardır. Çalışma elektrodu olarak Ag/AgCl/3 M KCl elektrot seçilmiştir. Şaraplardaki Pb²⁺, Cu²⁺ iyonlarının derişimlerinin yüksek olması sebebiyle Cd²⁺ iyonundan farklı bir prosedürle ölçülmüşlerdir. Cd²⁺ iyonu için şarap öncelikle oksidatif-UV ışığına maruz bırakılmış ve ardından -950 mV ile iyonlar elektrot üzerinde 15 dk boyunca biriktirilmiştir. Biriktirilen iyonlar sıyırma kare dalga voltametrisi ile -950 mV'tan başlayarak +10 mV'a kadar 100 Hz frekans 250 mV dalga genliği, 165 ms'de 8 mV potansiyel atlama aralığı ile taranarak ölçülmüştür. 10 kez seyreltilmiş şarap örnekleri için kalibrasyon grafiğinden Cd²⁺ iyonları için elde edilen verilerle, $y=8,39x$ regresyon eşitliğini, Cd²⁺ gözlenebilme sınırı $3,5 \pm 0,9$ ngL⁻¹ ve şarap örneklerindeki Cd²⁺ derişimi genellikle 0,1–1,0 μ gL⁻¹ aralığında tespit edilmiştir. Fakat bazı örneklerde 15 μ gL⁻¹ derişimine kadar çıkabildiği gözlemlenmiştir (İlluminati, 2013).

Luo J. ve arkadaşları çalışmalarında bizmut modifiyeli çok duvarlı karbon nanotüp katkılı karbon pastası elektrodu kullanarak, anodik sıyırma kare dalga voltametrisi ile Cd²⁺ iyonu tayini yapmışlardır. Farklı birçok anodik sıyırma kare dalga voltametrisi parametresi kullanarak tekrarlanan deneyler sonucunda 1,0 μ gL⁻¹- 60 μ gL⁻¹ derişim aralığındaki Cd²⁺ iyonları için 0,3 μ gL⁻¹ gözlenebilme sınırı elde etmişlerdir (Luo, 2013).

Zhu L. ve arkadaşları çalışmalarında altın nanoparçacıkları-grafen-sistein kompozitle modifiye edilmiş bizmut film elektrot kullanılarak Cd²⁺ ve Pb²⁺ tayini gerçekleştirmişlerdir. İyonların biriktirilmesi 800 saniye boyunca -1,2 V potansiyel uygulanarak yapılmıştır. Potansiyel taraması -1,0 V ile -0,4 V arasında 15 Hz frekans, 25 mV dalga genliği ve 4 mV potansiyel atlama aralığı ile yapılmıştır. Derişimleri 0,50 μ gL⁻¹ ile 40 μ gL⁻¹ arasındaki iyon derişimleri için Cd²⁺ gözlenebilme sınırı 0,10 μ gL⁻¹ bulunmuştur (Zhu, 2014).

1.6.2. Elektrokimyasal Yöntemler Kullanılarak H-IgG Tayini Çalışmaları

Zarei H. ve arkadaşları anti H-IgG/COOH çok duvarlı karbon nanotüp/Fe₃O₄ manyetik nanokompoziti kullanarak geliştirilen platform üzerinde H-IgG tayini gerçekleştirmişlerdir. Elektrokimyasal ölçümler dönüşümlü voltametri ile yapılmıştır. 30 ngmL⁻¹ ile 1000 ngmL⁻¹ derişimleri arasını çalışma aralığı olarak belirlemişlerdir ve $y=0,054x+5,593$ (y: μ A, x: ngmL⁻¹) regresyon eşitliğini elde etmişlerdir. Gözlenebilme sınırı 25 ngmL⁻¹ bulunmuştur (Zarei, 2012).

Campanella L. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada potansiyometrik bir sensörle ve iki farklı yöntemle H-IgG ve anti H-IgG tayini yapmışlardır. Kullanılan yöntemlerden birinde H-IgG'nin, Pall-Biodyne membran üzerinde tutunması sağlanırken diğerinde İmmobilon membran üzerinde tutunması sağlanmıştır. İki farklı yöntemin de birbirlerine hemen hemen aynı duyarlılıkla ölçtüğünü farklı şartlar altında tespit etmişlerdir. Kullanılan bu yöntemlerin gerçek üre numunelerine uygulanmasıyla son olarak membranlar üzerinde ve farklı üre numulerinde $1,3 \times 10^{-10}$ molL⁻¹, $3,3 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹, $6,7 \times 10^{-10}$ molL⁻¹, $3,0 \times 10^{-10}$ molL⁻¹ H-IgG derişimi tespit etmişlerdir (Campanella, 2008).

Tian D. ve arkadaşları çalışmalarında ultra duyarlılıklı elektrokemilüminesans sensörü kullanılarak ve luminol bağlanmış altın nanoparçacıkları ile etiketleme yardımıyla H-IgG tayini yapmışlardır. Çalışma aralıkları 7.5 pgmL⁻¹ ile 100 pgmL⁻¹ olup regresyon eşitliği olarak $I=31,49+42,08C$ (I: elektrokemilüminesans hassasiyeti, C: H-IgG derişimi, pgmL⁻¹) bulmuşlardır. Dedeksiyon sınır olarak $1,0$ pgmL⁻¹ sonucunu bulmuşlardır (Tian, 2010).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR VE BULGULAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

- 4" silikon yonga tablaları Silicon Inc.'den temin edildi
- SU 8-50 negatif foto direnç ve yıkama çözeltisi
- Poli(dimetilsiloksan) oligomeri (PDMS) ve çapraz bağlama ajanı (SYLGARD 184) Microchem'den temin edildi
- (3-Aminopropil)trioksilan (Aptes) çözeltisi Sigma-Aldrich'ten temin edildi
- COC ve Polyester sayfalar Autostat HT5 McDermid Autotype'dan temin edildi
- Acheson karbon mürekkep (Electrodag PF407C) ve Acheson gümüş/gümüş klorür mürekkep (Electrodag 6037SS) Acheson firmasından temin edildi
- 1 µm Invitrogen Dynabeads Myone Tosylactivated
- 2,8 µm Invitrogen Dynabeads Tosylactivated
- 1 µm Invitrogen Dynabeads Myone Tosylactivated
- 2,8 µm Invitrogen Dynabeads Tosylactivated
- Anti-Human IgG (Sigma Aldrich, ref: I1886)
- Sigma Aldrich HIgG I2511-10MG
- Sigma Aldrich B1140-1ML Anti-Human IgG (γ-chain specific)-biotin
- Life Technologies Q10021MP Qdot 655 ITK Streptavidin
- Asetat tamponu pH 3
- PBS (Fosfat tuzu tamponu pH 9,5)
- PBS-tween (Fosfat tuzu tamponu pH 9,5 + tween 20 %0.05)
- Süt çözeltisi (0,05g süt tozu+ 100µL PBST+ 900µL PBS)
- BSA (0,05g bovin serum albumin + 100µL PBST+ 900µL PBS)
- Borat Tamponu (pH 9,5)

2.2. Kullanılan Cihazlar

- Spin kaplama işlemiyle SU 8-50 negatif foto direnç 4 inç silikon yonga tablası üzerine spin coater (spin kaplayıcı) kullanılarak kaplandı
- Tüm pişirme aşamaları Kottermann fırın içerisinde gerçekleştirildi
- Fotolitografi, Süss Microtec marka maskeyle gerçekleştirildi
- Oluşturulan kalıp üzerindeki kanal yapıları KLA Tencor marka profilometre ve Olympus marka mikroskopla değerlendirildi
- Tüm mikrofabrikasyon aşamaları Laboratori d'ambient controllat of UAB bünyesindeki tozsuz oda (clean room) koşullarında gerçekleştirildi
- Üretilen mikrokanalları karakterize etmek için Hitachi L.D. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve JEOL JEM-2011 marka Geçirimli Elektron Mikroskopu TEM kullanılmıştır
- PDMS kanalı ve substratı birleştirirken Harrick Plasma marka plazma temizleyici kullanılmıştır
- Screen printed elektrotlar yarı otomatik screen printing makinesi DEK248 ile basıldı
- Şırınga pompası
- Süper mıknatıslar 15x4x4 mm 1,47T model NdFeB blok süper mıknatıs
- Olympus marka floresans mikroskobu
- Dizayn edilen Lab-On-a-Chip cihazı
- Autolab marka voltametri cihazı
- 100µL Hamilton marka cam şırınga
- Nipro şırınga
- Manyetik ayırıcı
- Biosan ısıtıcılı çalkalayıcı

2.3. Prosedürler

H-IgG tayini yapabilmek için önce mikroakışkan cihazı tasarımı ve fabrikasyonu, elektrokimyasal dedektörlerin fabrikasyonu, Lab-On-a-Chip içerisinde dolgu oluşturulması denemeleri yapıldı. Kullanılabilir bir Lab-On-a-Chip üretildikten sonra içerisinde H-IgG tayini çalışmaları yapıldı.

2.3.1. Mikroakışkan Cihazı Tasarımı ve Fabrikasyonu

PDMS mikrocihaz fabrikasyonunu

-Fotolitografi teknikleri kullanarak kalıp fabrikasyonu

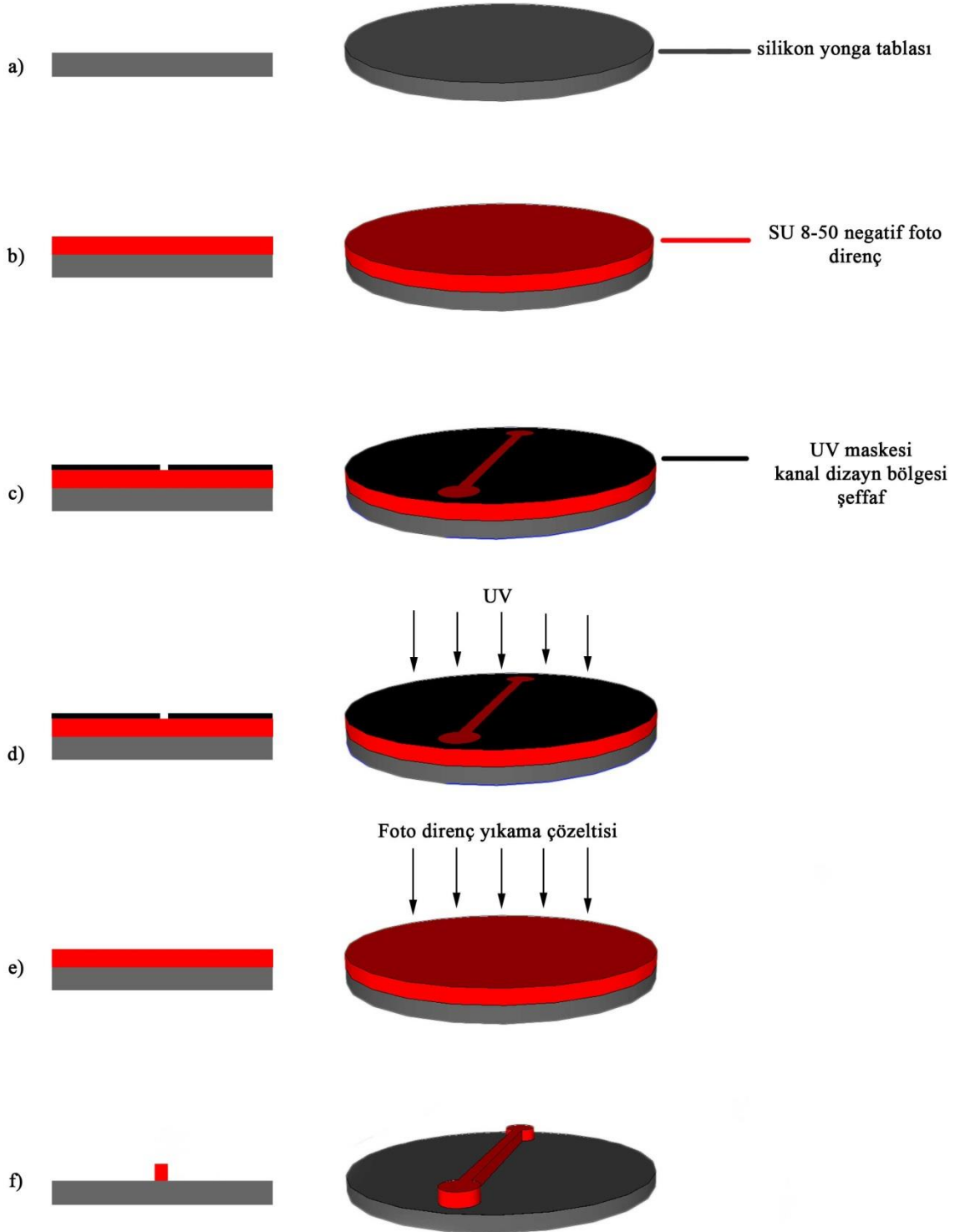
-PDMS kullanarak mikrokanal üretimi

-Birleştirme işlemi

olarak sıralanabilecek üç basamak altında incelenebilir.

2.3.1.1. Kalıp Fabrikasyonu

Şekil 2.1 a ve b’de 5 mL, SU 8-50 negatif foto dirençli polimerin silikon yonga tablası üzerine kaplanması gösterilmektedir. Silikon tabla deiyonize su içerisinde 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda temizlendi (silikon tablaların paketleri ilk defa açıldıklarında tozsuz oda şartlarında bulunmaktalarsa bu temizlik işlemine gerek duyulmamaktadır. SU 8-50 negatif foto dirençli polimer, farklı kalınlıklar elde etmek için farklı “spin coater” hızları ve çevirme süreleri denenerek 4 inç silikon tablalar üzerine kaplandı (bkz. Tablo2.1). Kaplanılan Su 8-50 negatif foto dirençli polimer 95°C de 40 dakikalık ön fırınlama işleminden sonra istenilen dizayndaki negatif polyester maske kullanılarak 60 saniye boyunca UV (UV: 7,9 mW/cm²) ışığa tabi tutuldu (Şekil 2.1 c ve d). Son fırınlama işlemi 95°C de 30 dakika uygulandı. Son olarak silikon taban kalan monomerlerden arındırılmak için 3 kez 90 saniye monomer yıkayıcısı içerisinde çalkalandıktan sonra aseton ve izopropanol ile temizlendi (Şekil 2.1 e ve f). Azot gazı yardımı ile kurulandı.

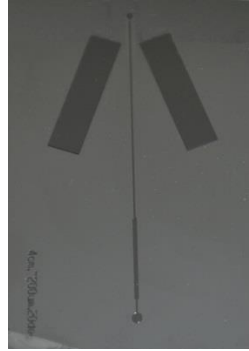


Şekil 2.1a) Silikon yonga tabakası, b)Foto dirençli polimer kaplanması, c)UV maskesi yerleştirilmesi, d)UV uygulanması, e)UV dirençli polimerin yıkanması, f)Tamamlanmış mikrokanal kalıbı

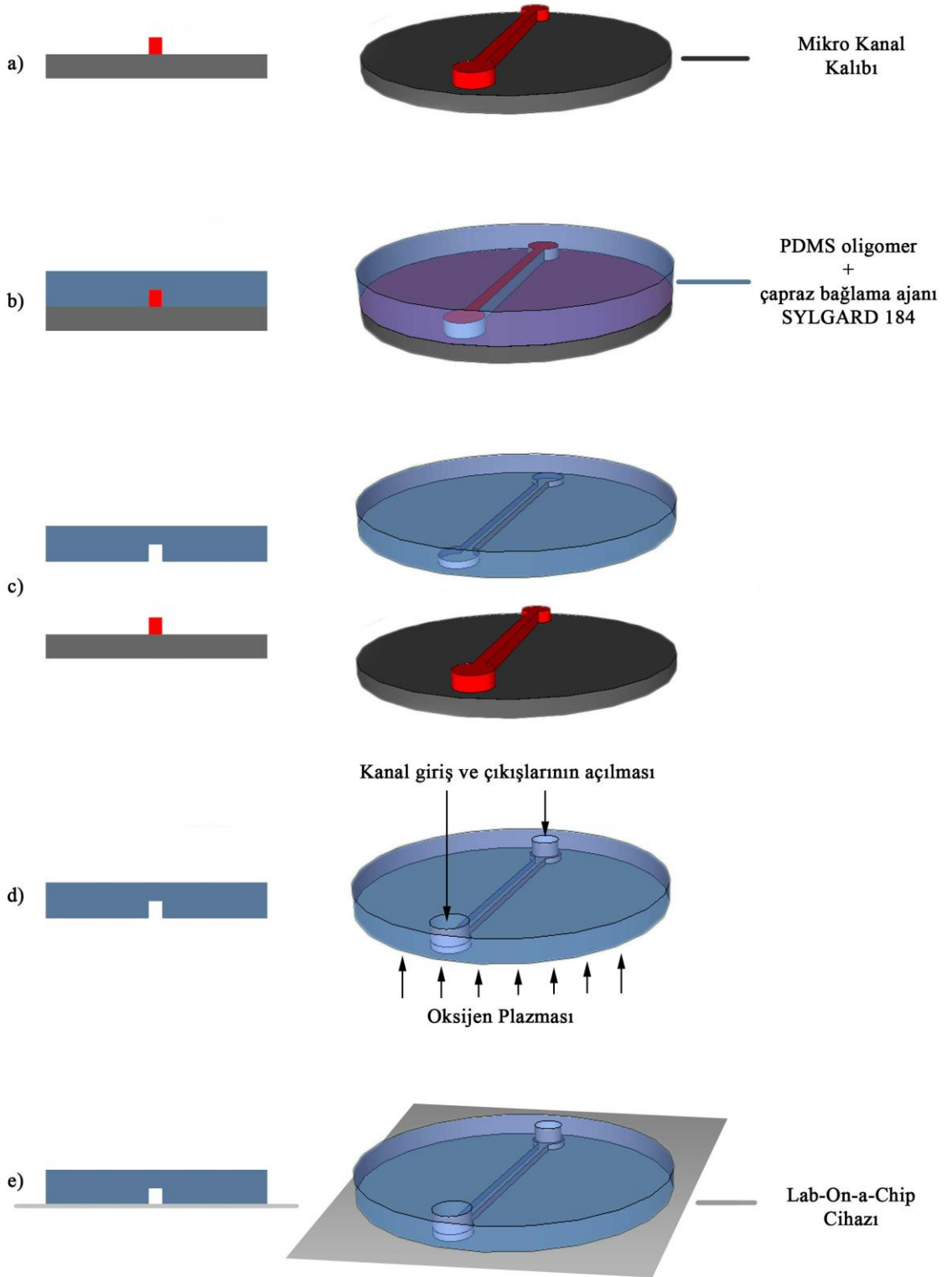
2.3.1.2. PDMS Üretimi

Oluşturulacak PDMS mikrokanalının son halinide tozlardan kaynaklanabilecek deformasyonu önlemek için silikon kalıp yüzeyi sırasıyla; aseton, izopropanol ve son olarak etanol ile yıkandıktan sonra nitrojen gazı ile kurutulmasıyla tamamlandı. Kalıp üzerinde nem birikmiş olma ihtimaline karşın fırında 10 dakika boyunca yaklaşık 110°C’de bekletildi.

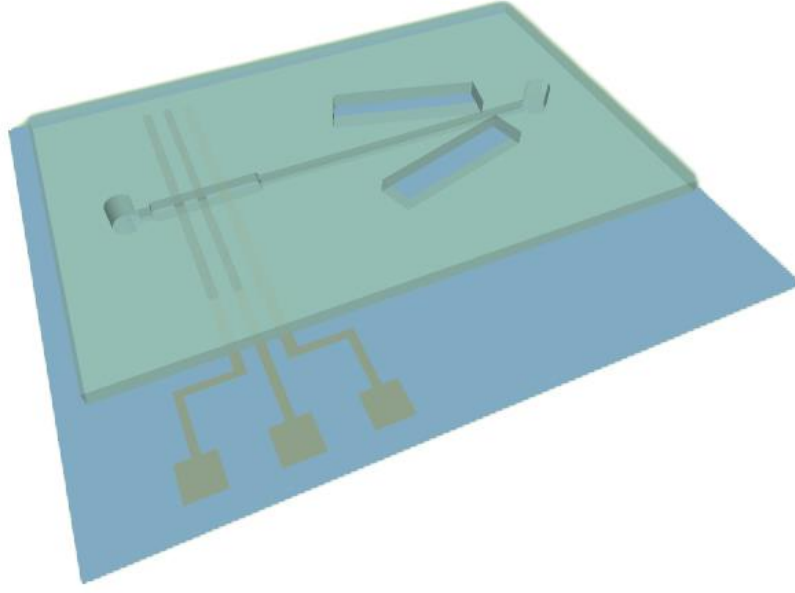
PDMS oligomer ve çapraz bağlama ajanı SYLGARD 184, 10:1 oranda karıştırıldı ve önceden temizlenen silikon kalıp üzerine döküldü (Şekil 2.3 a ve b). Vakum altında silikon kalıbın yüzeyinde kalmış olabilecek baloncuklar uzaklaştırıldı. PDMS katmanı elde etmek için oligomer ve çapraz bağlama ajanı SYLGARD 184 karışımı 65°C ‘de 4 saat boyunca fırında bekletildi. Çapraz bağlanan oligomerin oluşturduğu PDMS katmanı, silikon kalıp üzerinden dikkatlice sıyrılarak ayrılmasıyla oluşturuldu (Şekil 2.3 c) . Kanal giriş ve çıkışlarını oluşturmak için PDMS katman üzerine delikler açıldı (Şekil 2.3 d). Süper miknatısların PDMS üzerindeki duruşlarının önceden optimize edilen açılarda olması için, dizaynda fotolitografi sırasında işaretlenen yerler PDMS katmanından kesilip çıkartıldı. Tüm dizaynı içinde barındıran PDMS boyutu 5 cm x 3cm olarak belirlendi.



Şekil 2.2 Tamamlanmış mikrokanal kalıbı



Şekil 2.3 a) Mikrokanal, b) Mikrokanal kalıbı üzerinde PDMS üretilmesi, c) PDMS'in kalıptan sökülmesi, d) Kanal giriş, çıkışlarının açılması ve oksijen plazmasıyla bağlanacak yüzeyin aktivasyonu, e) COC yüzey ile PDMS'in birleştirilmesi



Şekil 2.4 Tamamlanmış Lab-On-a-Chip cihazı

2.3.1.3. PDMS Kanalı ve Siklik Olefin Kopolimer veya Polyester ile Bağlanması

100 μm ve 200 μm genişlikte hazırlanan mikro PDMS kanalı katmanları manyetik bileyelerin (MB) optimizasyonu için elektrot basılmamış siklik olefin kopolimer (COC) üzerine bağ yapmaları sağlandı. Aynı PDMS mikrokanallı katmanlar, H-IgG tayini için üzerine önceden gümüş/gümüş klorür ve karbon elektrotlar basılmış polyester substrat üzerine bağ yapmaları sağlandı.

COC veya polyester substratın bağ yapacak yüzeyi (elektrot basılısın veya basılmasın) temizlemek amacıyla önce su ve sonra etanolden geçirildi. Bağ yapacak substrat yüzeyini aktive etmek için %2'lik (3-Aminopropil)trietoksisilan (APTES) içeren çözeltide 30 dakika kadar bekletildi ve azot gazı ile kurutuldu. Bu esnada PDMS katmanı, üzerinde kanal oluşturulan yüzeyi yukarı gelecek şekilde plazma temizleyiciye yerleştirildi. Plazma temizleyici içerisinde 3 dakika vakuma tabi tutulan PDMS katmanı daha sonra 50-60 saniye kadar yüksek enerjili plazma ile aktifleştirildi. Aktifleştirilen PDMS yüzeyi ve substrat yüzeyi (COC veya polyester) aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde birleştirildi. Birleştirme sırasında polyester yüzeydeki elektrotlar mikrokanala dik ve ölçüm için oluşturulan mikrokanalın 500 μm genişliğindeki kısmının üzerine gelecek şekilde

yerleştirildi. İki yüzey arasında kalan hava kabarcıklarını gidermek için ortadan kenarlara doğru elle nazikçe basınç uygulandı. Oluşan bağın daha kuvvetli olması ve PDMS ile substratın deney sırasında ayrılmaması için 60 °C-70 °C arasında 60 dakika boyunca fırımlandı. Sonuç olarak tamamlanmış Lab-On-a-Chip cihazı elde edildi (Şekil 2.4).

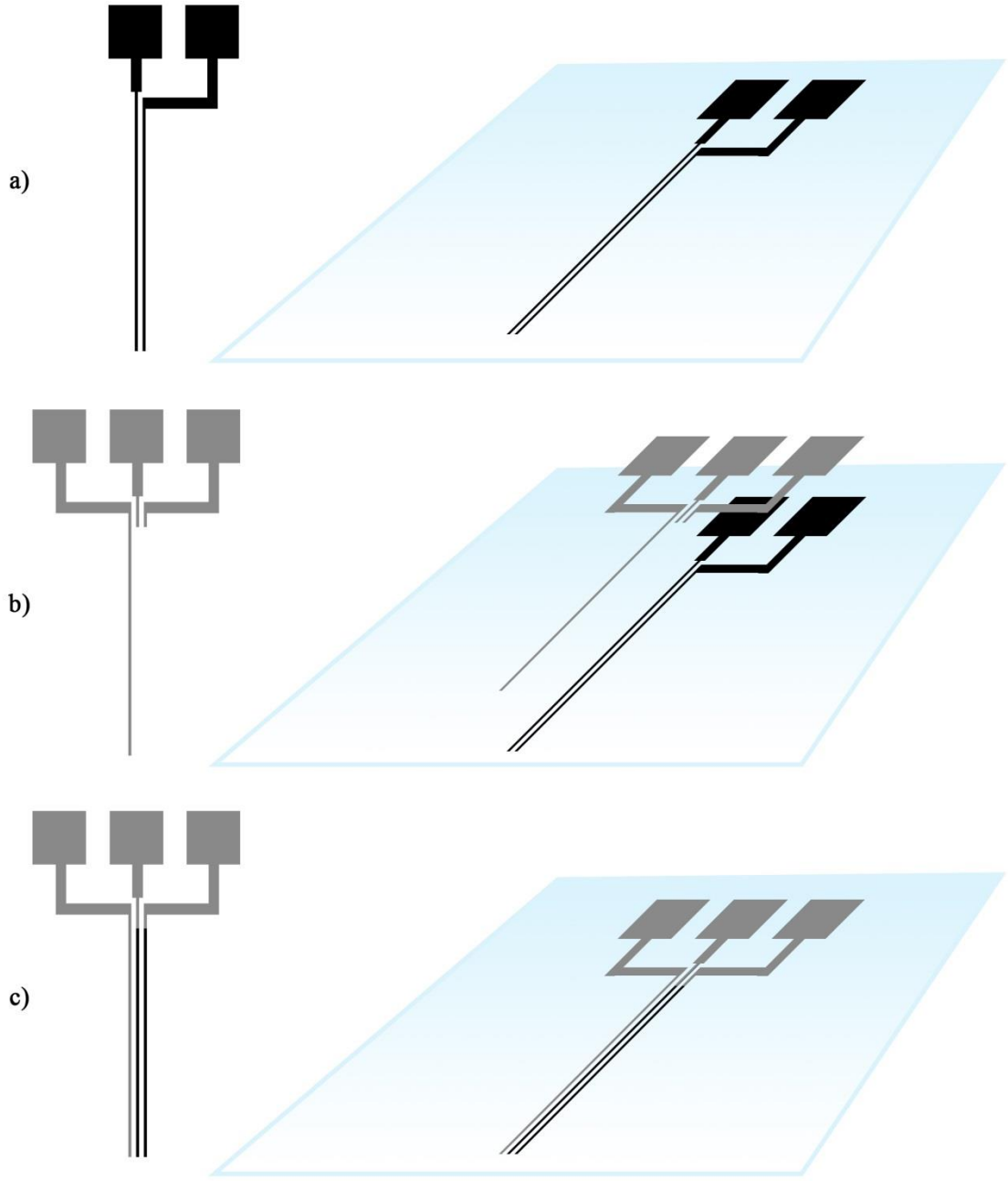
2.3.2. Elektrokimyasal Dedektörler

“Screen printed elektrotlar” karbon ve gümüş/gümüş klorür boyaların polyester veya COC substrat üzerine basılmasıyla oluşturuldu. Çalışma elektrodu, karşıt elektrot ve referans elektrot elektrokimyasal tespiti mümkün kılmak için çözeltiye temas edecek şekilde mikro kanal üzerine yerleştirildi.

Referans elektrot olarak gümüş/gümüş klorür elektrot, çalışma ve karşıt elektrot olarak karbon elektrot kullanılması kararlaştırıldı.

Birinci adımda “screen printing” makinesi kullanılarak, polyester üzerine karbon elektrodun önceden belirlenmiş dizaynındaki kalıplar kullanılarak karbon katmanı basıldı (Şekil 2.5 a). Basılan elektrotlar 15 dakika 95 °C de kurumaya bırakıldı.

İkinci adımda makinenin grafit için olan kalıbı yerine gümüş/ gümüş klorür elektrodu kalıbı kullanılarak kuruyan polyesterler üzerine gümüş /gümüş klorür boya katmanı basıldı (Şekil 2.5 b). Basılan gümüş /gümüş klorür elektrodun kuruması için polyester tekrar 95 °C’de 15 dakika bekletildi (Şekil 2.5 c).



Şekil 2.5 a)COC yüzeye carbon boya ile elektrot şeklinin basılması, b)Gümüş /gümüş klorür elektrodun basılması, c)COC yüzey üzerine basılmış üçlü elektrot sistemi

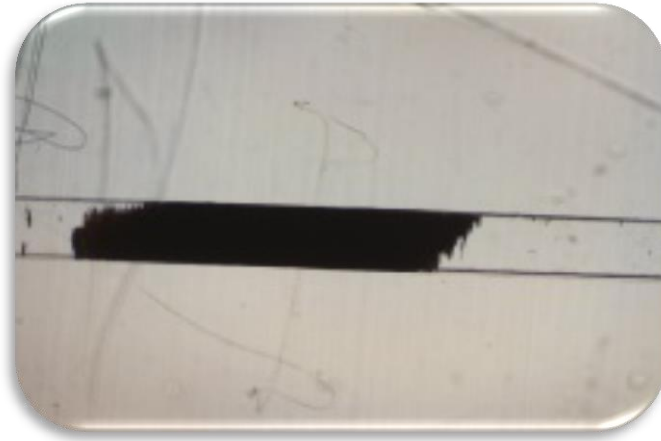
2.3.3. Lab-On-a-Chip İçerisinde Dolgu Oluşturulması ve Dolgu Optimizasyonu

Deneyle sırasında kullanılacak en uygun çipi belirlemek için farklı genişliklerde üretilen mikro kanalların optimizasyonu, kullanılacak manyetik parçacıkların optimizasyonu ve süper mıknatısların optimizasyonu yapıldı. Yapılan optimizasyonlarla en uygun dolgu tespit edildi.

2.3.3.1. Mikrokanal, Süper Mıknatıs ve Manyetik Parçacık Optimizasyonu

Çözeltideki H-IgG'lerin tespiti ve miktar tayini için mikrokanal içerisinde seçici geçirgen bir dolgu üzerinde önderiştirilmesi hedeflendi.

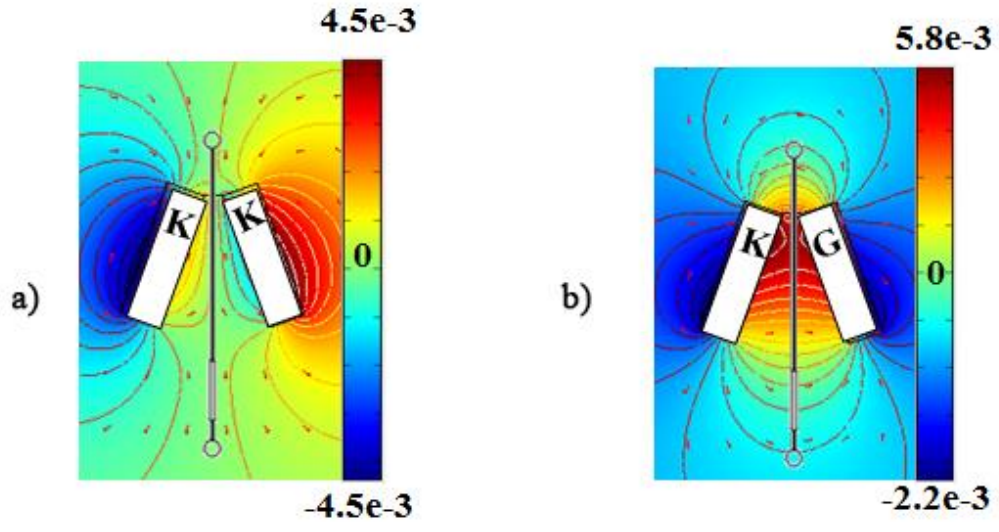
Öncelikle dolgu oluşturmak için mikro kanal içerisinde bir manyetik alan yaratmak ve uygulanan bu güçlü manyetik alandan etkilenecek mikro kanal içerisinde birikerek dolgu oluşturabilecek manyetik parçacıklar (manyetik bilyeler, MB) kullanılmasına karar verildi (Şekil 2.6). 1 μm ve 2,8 μm boyutlarındaki MB'ler denenmek üzere seçildi.



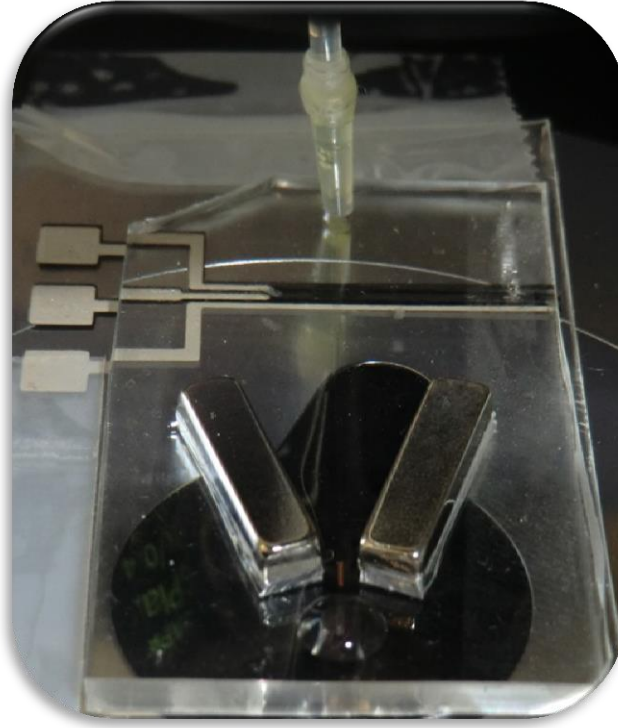
Şekil 2.6 Mikrokanal içerisinde manyetik bilyelerle oluşturulmuş dolgu

Oluşturulacak manyetik alan için alınan 15x4x4 mm boyutlarında 1.47T model NdFeB blok süper mıknatıslar “ChenYang Technologies GmbH & Co. KG” şirketinden temin edildi. Dikey olarak kuzey ve güney kutuplarına bölünmüş olan süper mıknatıslar kanala zarar vermeyecek maksimum yakınlıkta dolgu oluşturmak üzere denendi.

Önce oluşturulacak manyetik alan için süper mıknatısların kutupları kanalın iki farklı cephesinden karşılıklı olarak kuzey-kuzey, güney-güney, kuzey-güney olacak şekilde önce simülasyonlarda (Şekil 2.7 a ve b) ve ardından deneysel olarak denendi (Şekil 2.8).



Şekil 2.7 Kanal üzerinde oluşturulacak manyetik alanın simülasyonu a) Kuzey-kuzey kutuplar karşılıklı, b)Kuzey-güney kutuplar karşılıklı



Şekil 2.8 Manyetik alan yardımı ile dolgu oluşturulması

Yapılan simülasyonlarda en kuvvetli ve kullanıma uygun manyetik alanı oluşturmak üzere farklı açılar denendi.

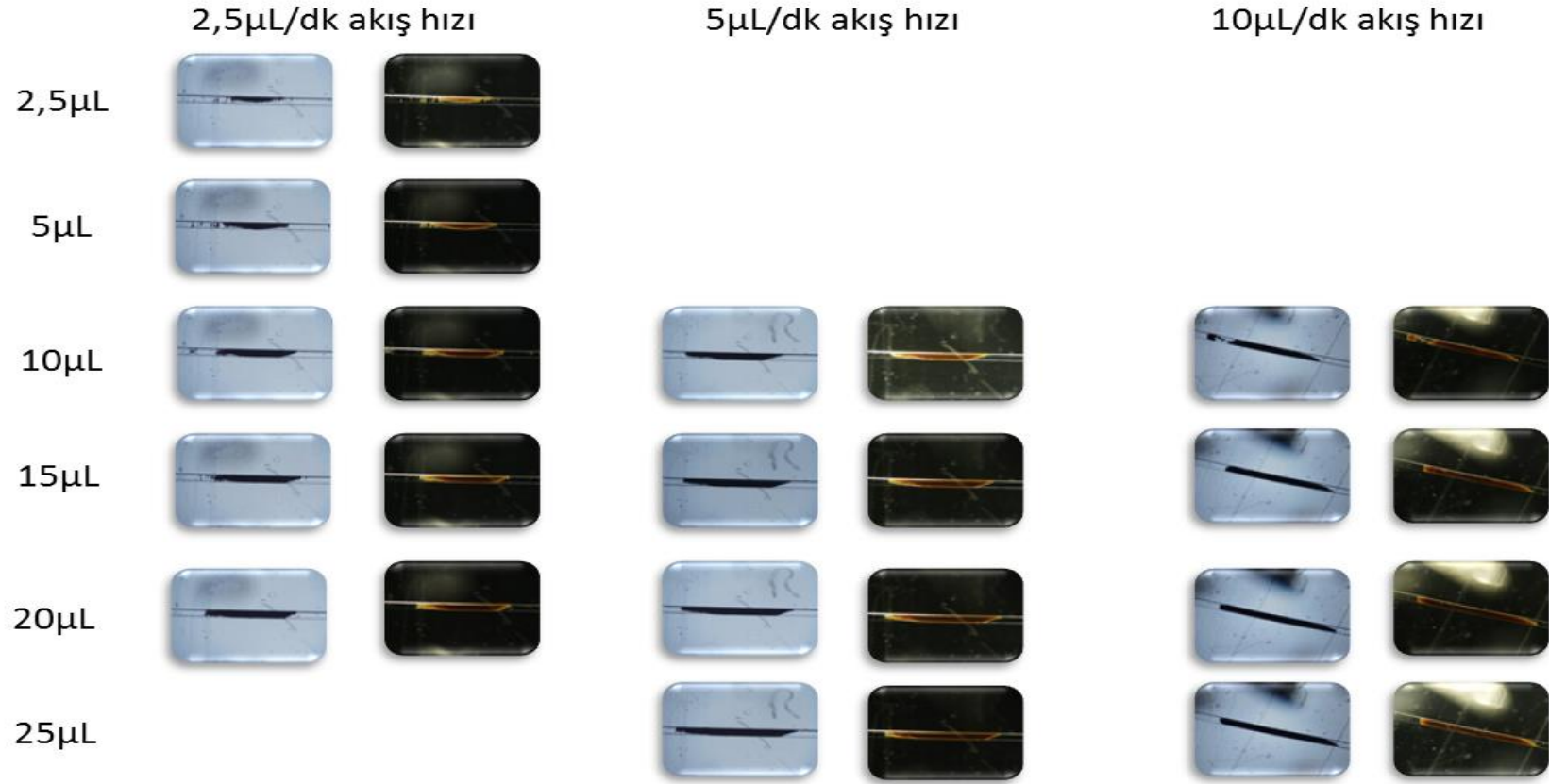
Oluşturulacak dolgu için en uygun süper mıknatıs konfigürasyonu ve açısı belirlendikten sonra 2,8 μm 'lik tosil-aktif manyetik bilyeler ve 1 μm 'lik tosil-aktif manyetik bilyeler kullanılarak oluşturulan dolguların kullanılabilirliği incelendi.

Süper mıknatısların konumu, konfigürasyonu ve manyetik bilyelerin boyutuna karar verildikten sonra 100 μm 'lik ve 200 μm lik genişlikteki kanallarda 0,65 μg , 1,3 μg , 2,6 μg , 3,9 μg , 5,2 μg , 6,5 μg miktarlarında manyetik bilyeler 2,5 $\mu\text{L}/\text{dk}$, 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$, 10 $\mu\text{L}/\text{dk}$, 15 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızlarıyla verilerek en kararlı ve çalışmaya uygun dolgu tespit edildi (Tablo 2.1, Şekil 2.9 ve 2.10).

Tablo 2.1 Mikrokanallarda manyetik bilye dolgusu oluşturma denemelerinde kullanılan kanal genişlikleri, akış hızları ve manyetik bilye miktarları

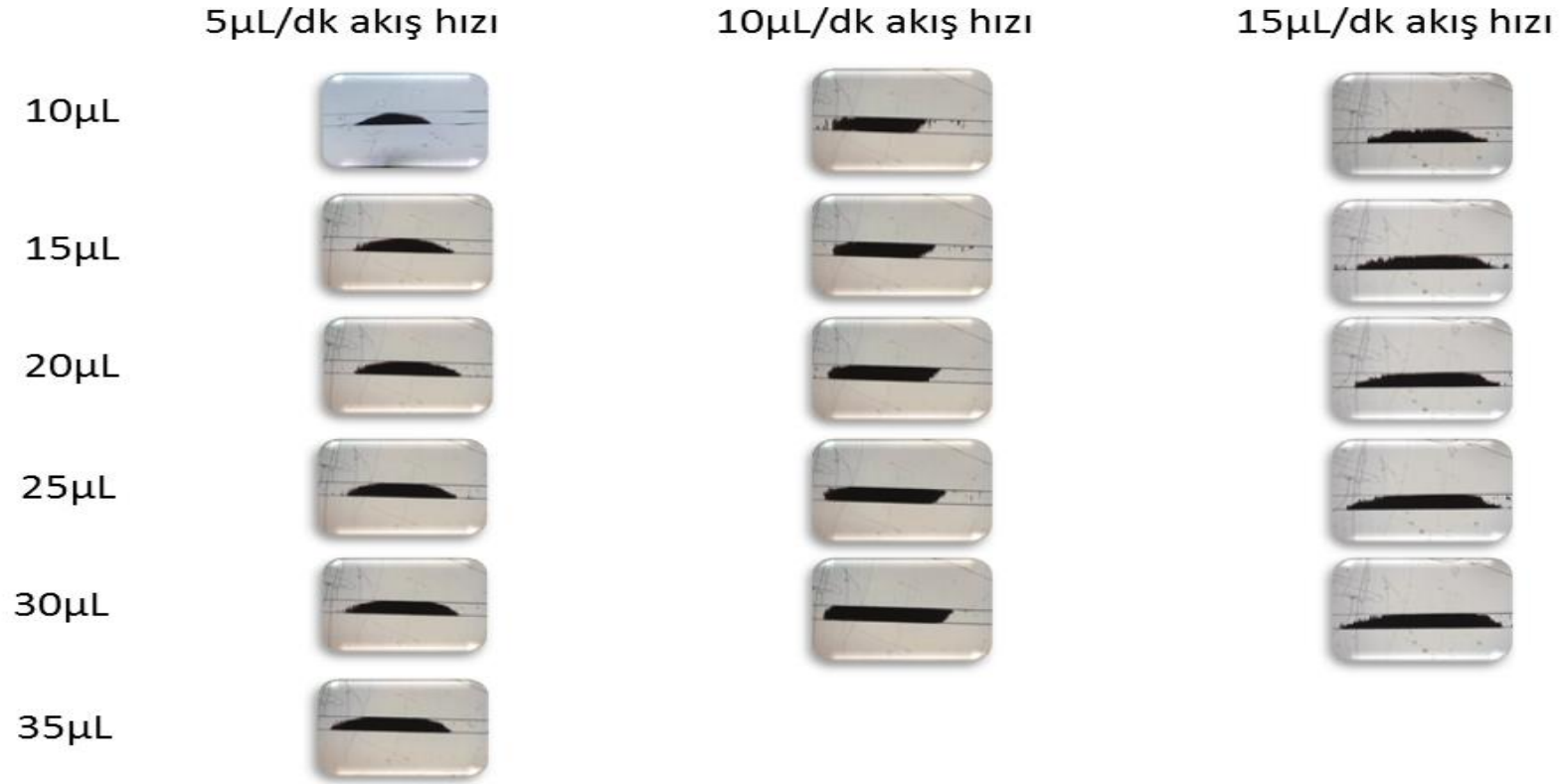
Kanal genişliği	Akış hızı	MB miktarı
• 100 μm	2,5 $\mu\text{L}/\text{dk}$	2,5 μL , 5 μL , 10 μL , 15 μL , 20 μL , 25 μL 0,65 μg , 1,3 μg , 2,6 μg , 3,9 μg , 5,2 μg , 6,5 μg
	5 $\mu\text{L}/\text{dk}$	
	10 $\mu\text{L}/\text{dk}$	
• 200 μm	5 $\mu\text{L}/\text{dk}$	10 μL , 15 μL , 20 μL , 25 μL , 30 μL 2,6 μg , 3,9 μg , 5,2 μg , 6,5 μg , 7,8 μg
	10 $\mu\text{L}/\text{dk}$	
	15 $\mu\text{L}/\text{dk}$	

100 μ m Kanal



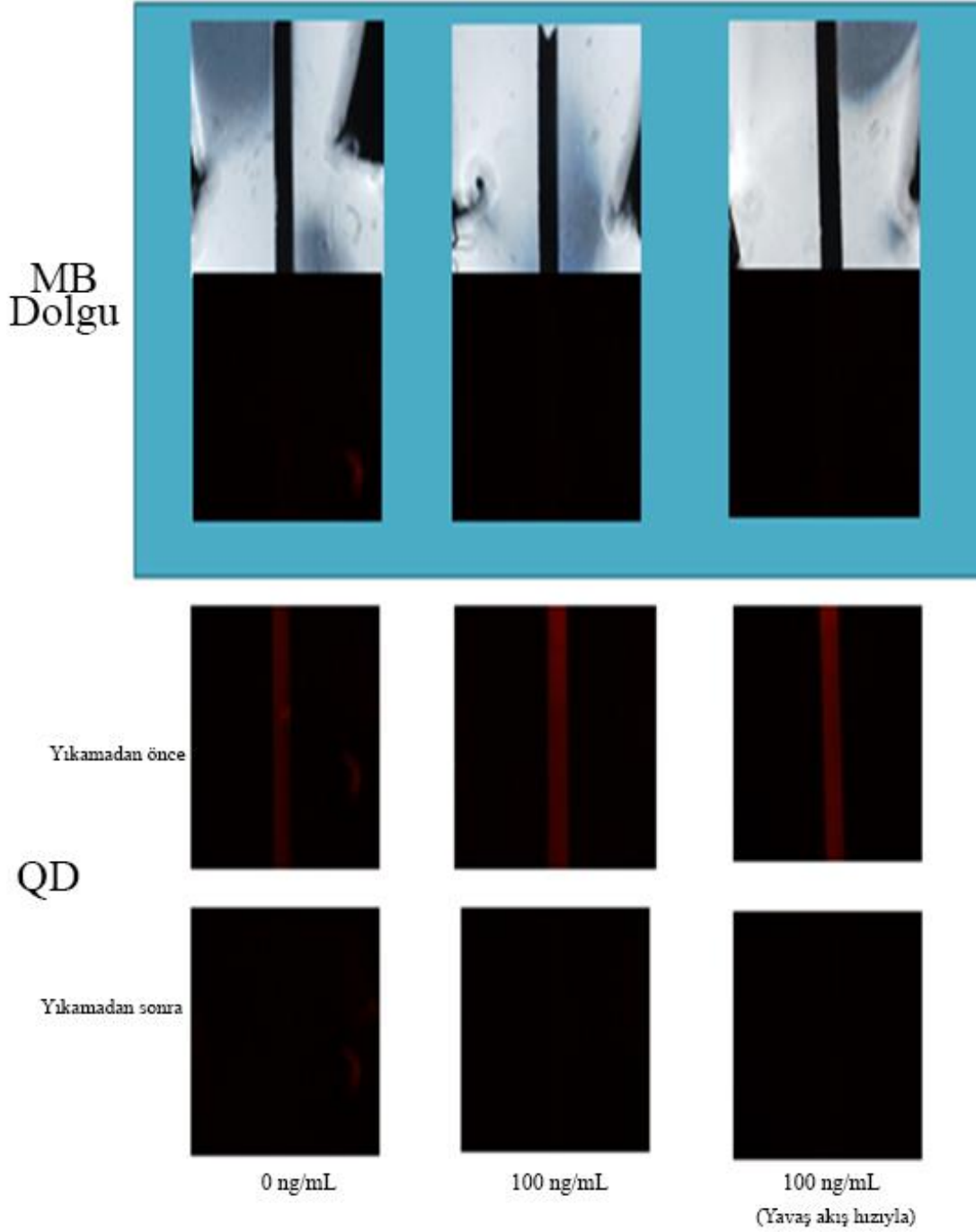
Şekil 2.9 100 μ m kanalda dolgu yapma çalışmaları

200 μ m Kanal



Şekil 2.10 200 μ m kanalda dolgu yapma çalışmaları

Uygun dolgu belirlendikten sonra dolgu içerisinde kuantum noktaları geçirilerek floresans mikroskobu ile dolgu içerisinde boşluk olup olmadığı incelendi (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Floresans mikroskobu ile kanal içerisindeki manyetik bilye dolgusu kontrolü

2.3.4. H-IgG Tayini

Kanal içerisinde oluşturulan, manyetik bilye üzerine inkübe edilmiş Anti H-IgG (Anti insan immünoglobülin G) ile oluşturulan dolgu üzerinde farklı derişimlerde H-IgG adsorbe edildi. Tutulan H-IgG üzerine elektrokimyasal etiket olarak Anti H-IgG üzerine inkübe edilmiş kuantum noktaları gönderildi.

Kuantum noktaları asetat tampon çözeltisi (pH 3,4) ile parçalanıp yapısındaki Cd²⁺ iyonları çözeltiye geçirildi. Çalışma elektrodu üzerine potansiyel uygulanarak Cd²⁺ iyonları çalışma elektrodu üzerine tutturuldu. Sıyrırmalı kare dalga voltametri ile farklı derişimler için ölçümler alındı.

2.3.4.1. Lab-On-a-Chip Hazırlanması

Çip öncelikle olası safsızlıklardan arındırmak amaçlı olarak PBS-Tween çözeltisi ile 5µL/dk akış hızıyla 10 dakika yıkandı. Kanal içersinde oluşabilecek istenmeyen adsorpsiyonları önlemek amacıyla kanalın iç duvarları süt proteinleri ile kaplandı. Bunun için PBS-Tween ile yıkanan kanal içersine 5 µL/dk akış hızıyla 10 dakika boyunca süt çözeltisi (0,05 g sigma aldrich süt tozu + 100 µL PBS-Tween + 900 µL PBS) verildi. Çipin fazla süt çözeltisinden arındırılması için kanal 5µL/dk akış hızıyla 10 dakika boyunca PBS-Tween çözeltisi ile yıkandı.

Elektrotların aktive edilmesi ve elektrotlar üzerinde kalmış olabilecek APTES çözeltisinin kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla kanaldan 5 µL/dk akış hızıyla PBS çözeltisi geçirilirken aynı zamanda 10 taramalık dönüşümlü voltametri (CV , cyclic voltametry) çekildi (Tablo 2.2).

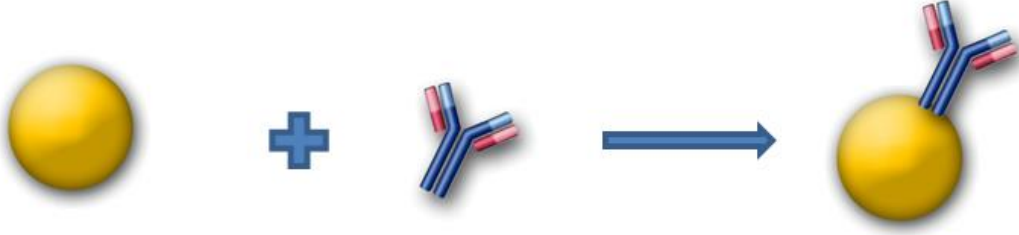
Tablo 2.2 Dönüşümlü voltametri ölçüm protokolü

<u>Ön Deriştirme</u>	
Başlangıç potansiyeli (V) :	0
Ön deriştirme süresi (s) :	0
Dengeye gelme süresi (s) :	0
<u>Ölçüm</u>	
Tarama sayısı :	10
Ölçüm sonrası hücre kapalı :	X
Ölçüm sonrası potansiyeli (V) :	0
<u>Potansiyeller</u>	
Başlangıç potansiyeli (V) :	-0,8
İlk tepe potansiyeli (V) :	0,8
İkinci tepe noktası potansiyeli (V) :	-0,8
Potansiyel artışı (V) :	0,05
Tarama hızı (V/s) :	0,1

2.3.4.2. H-IgG Önderiştirilmesi ve Ölçümü

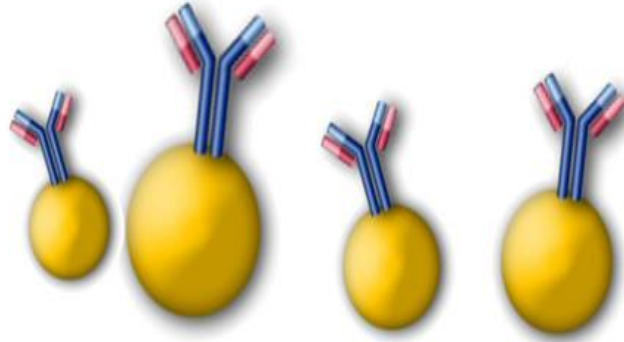
4 µL invitrogen Dynabeads MyOne Tosil-aktif manyetik bilyeler, PBS-T (fosfat tuzu tamponu pH: 9,5 + Tween 20 %0.05) çözeltisi ile eppendorf içerisinde 3 kez yıkanıp manyetik ayırıcı ile ayrıldı.

Sigma Aldrich I1886 Anti Human – IgG stok çözeltisinden (3,0 mg/mL) 2,5µL alınarak borat tamponu (pH 9,5) içerisinde 150 µL'ye tamamlanarak hazırlanan çözeltinin, eppendorf içerisinde yıkanmış olan manyetik bilyelere inkübe olmak üzere Biosan marka ısıtıcılı çalkalayıcıya konuldu. İnkübasyonun tamamlanması için eppendorflar thermo shaker içerisinde 750 dev/dak'da, 37°C'de 19 saat bekletildi (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 MB'ler ile anti H-IgG inkübasyonu

MB'ler üzerine Anti İnsan-IgG'ler inkübe olduktan sonra çözeltide fazlalık kalan Anti İnsan-IgG'leri uzaklaştırma amacıyla MB+Anti H-IgG çözeltisi üç kez PBS-Tween çözeltisi ile yıkayıp manyetik karıştırıcı yardımı ile çözeltiden uzaklaştırıldı.



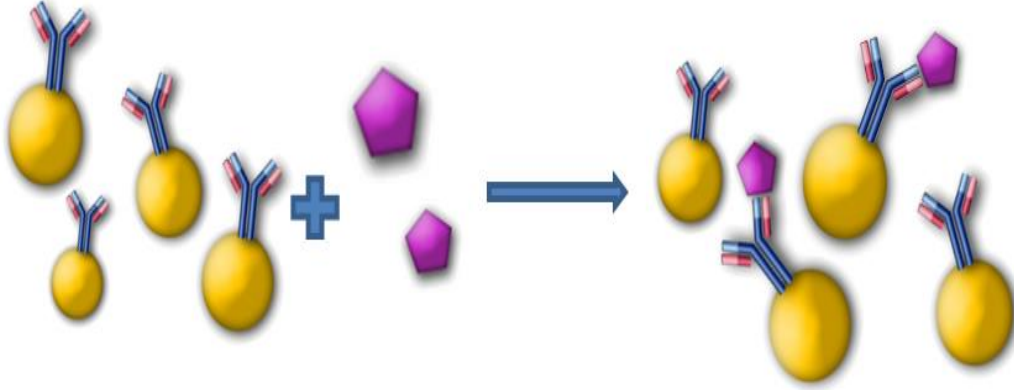
Şekil 2.13 MB+ Anti H-IgG çözeltisi

MB'lerin yüzeylerindeki girinti ve çıkıntıları doldurarak bağ yapmamış yüzeylerde oluşabilecek istenmeyen adsorpsiyonları engellemek için MB+Anti H-IgG çözeltisi 150 μ L BSA çözeltisi (0,05 g bovine serum albumin + 100 μ L PBS-Tween + 900 μ L PBS) ile ısıtıcılı çalkalayıcı içerisinde 750 dev/dak'da, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi.

Mıknatıslar yerlerine iyice oturacak şekilde çipe yerleştirildi. MB+Anti H-IgG çözeltisi kanala 5 μ L/dk hızla 2 dakika boyunca verilerek ve dolgu oluşturuldu (Şekil 2.13).

Kanalda fazlalık kalan MB+Anti H-IgG çözeltisini temizlemek amacıyla kanal PBS-Tween çözeltisiyle 5 μ L/dk akış hızıyla 10 dakika yıkandı.

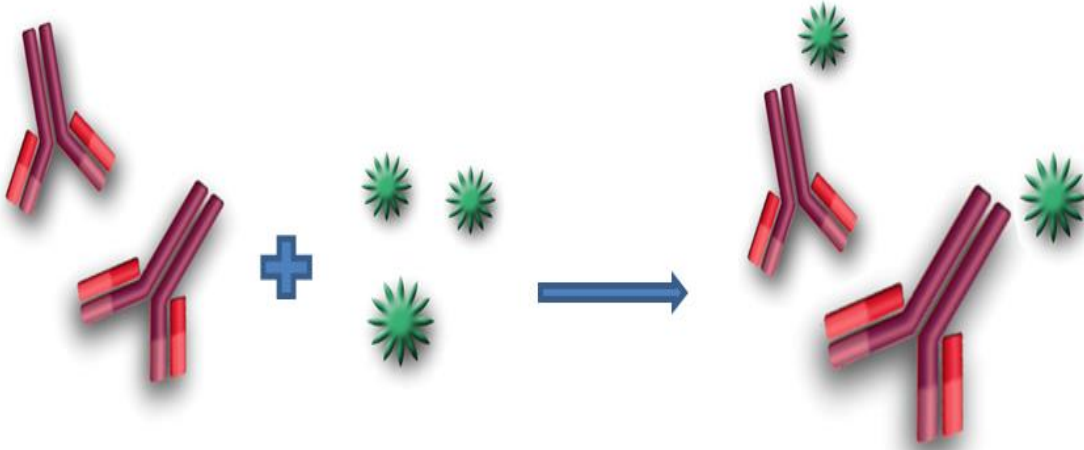
Her denemede farklı konsantrasyonda olmak üzere (6 ng/mL, 12 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL) H-IgG çözeltisi oluşturulan dolguda önderiştirilmek üzere kanala 0,55 $\mu\text{L}/\text{min}$ (550 nl/min) akış hızıyla 100 μL 'lik Hamilton şırıngası yardımıyla 20 dakika boyunca verildi (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Kanaldan geçirilen H-IgG'nin MB+Anti H-IgG dolgusu tarafından tutulması

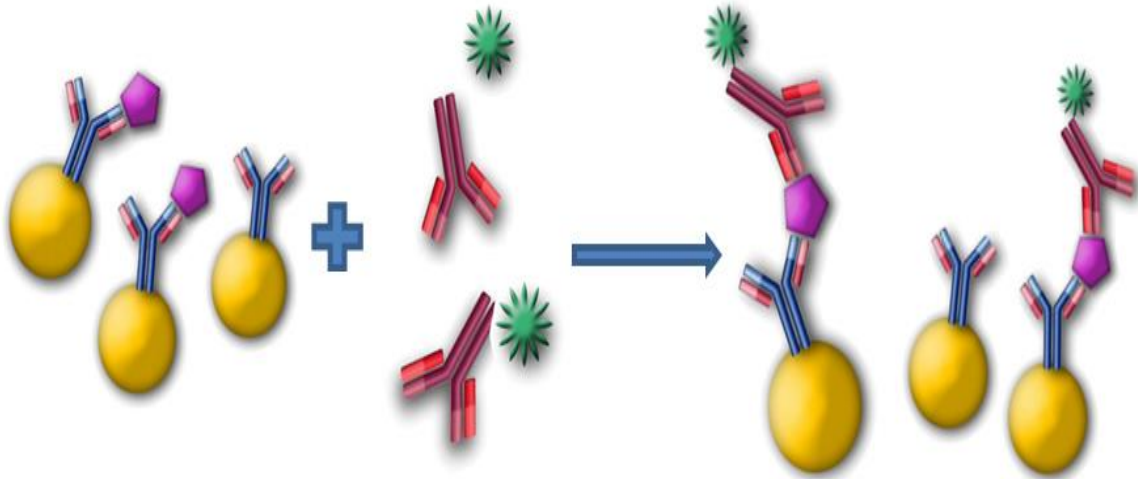
Lab-On-a-Chip kanalı içerisinde fazlalık olarak kalmış olabilecek H-IgG'leri uzaklaştırmak amacıyla kanal PBS-Tween çözeltisiyle 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla 10 dakika yıkandı.

Ön deriştirilen H-IgG'leri elektrokimyasal olarak etiketlemek amacıyla Life Technologies Q10021MP Qdot 655ITK Streptavidinli kuantum noktası 2 μM 'lık stok çözeltisinden 2 μL alınarak 150 μL kendi ticari inkübasyon tampon çözeltisi (50 mM borat tamponu pH 8,3, 0,05 %sodyum azide) içerisinde seyreltildi. 15 μL Sigma Aldrich B1140-1ML Anti H-IgG (γ -halkası spesifik)-biyotin ile 750 rpm, 25°C'de 2 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 2.15).



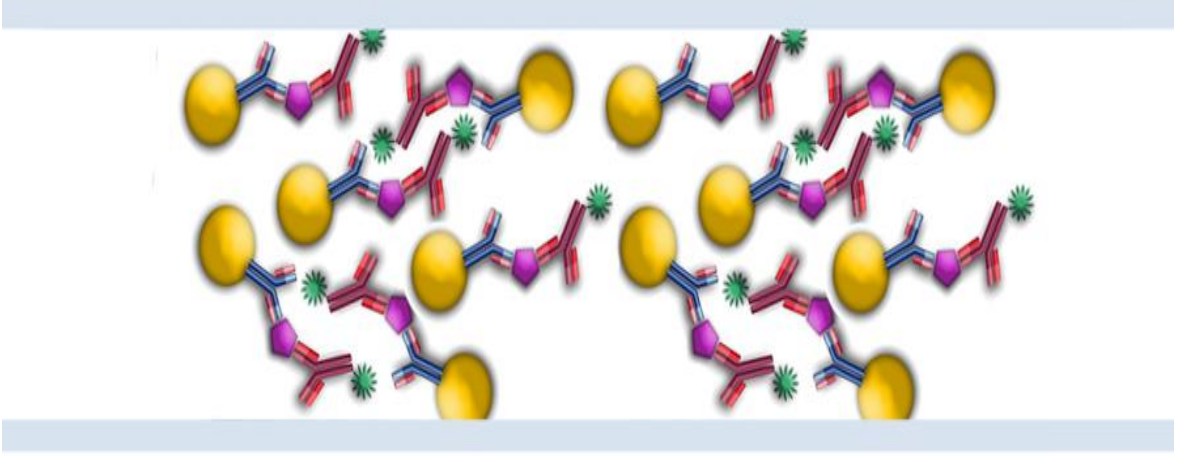
Şekil 2.15 Biotinli anti H-IgG'lerin QD'lar ile inkübasyonu

İnkübe edilen Anti H-IgG + Qdot çözeltisi Lab-On-a-Chip kanalı içerisine 0,55 $\mu\text{L}/\text{dk}$ (550 nL/dk) akış hızıyla 20 dakika boyunca 100 μL 'lik Hamilton şırıngasıyla verildi (Şekil 2.16).



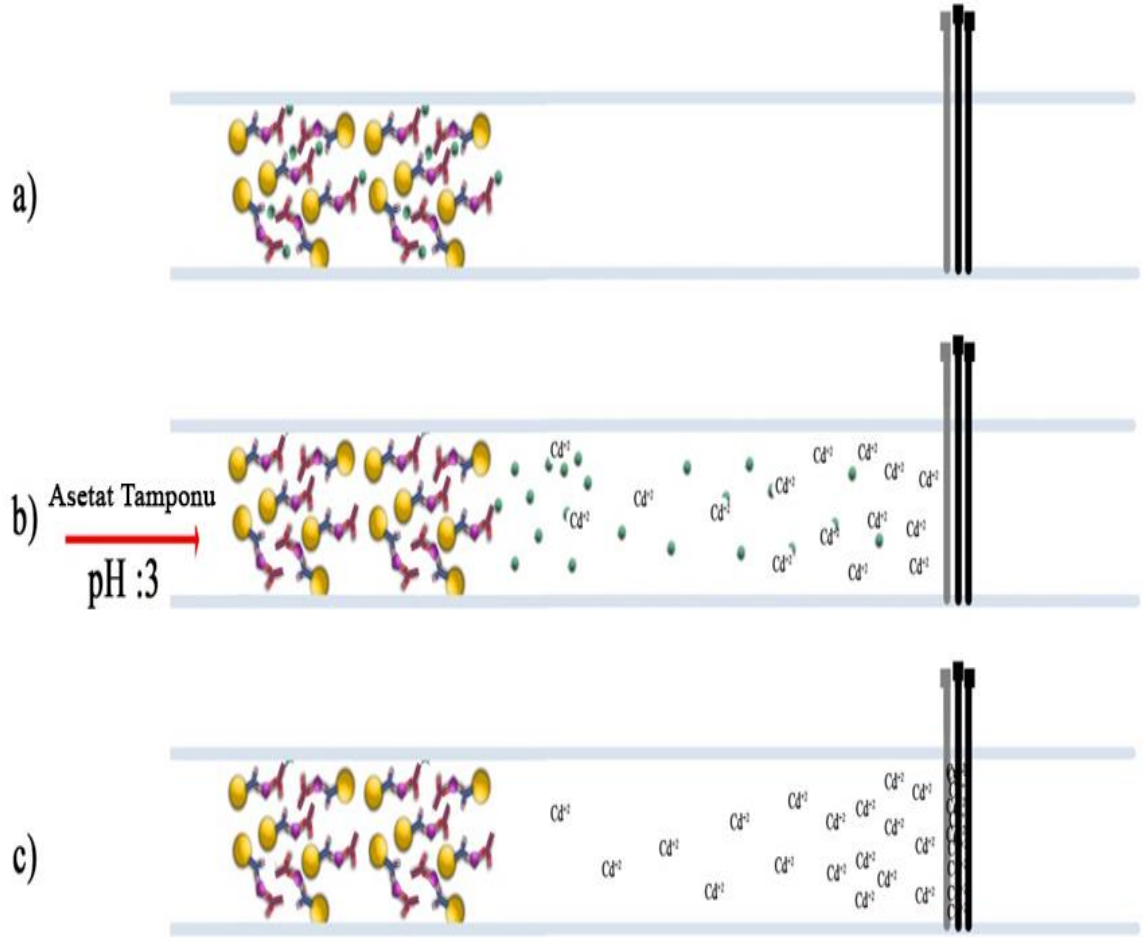
Şekil 2.16 Dolgu tarafından tutulan H-IgG'lerin biyotinli QD'ları ile işaretlenmesi

Lab-On-a-Chip kanalı içerisinde fazlalık olarak kalmış olabilecek Anti H-IgG + Qdot çözeltisini uzaklaştırmak amacıyla kanal PBS-Tween çözeltisiyle 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla 10 dakika yıkandı. Sonuç olarak mikrokanal içerisinde tüm inkübasyonun tamamlanmış hali kaldı (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Kanal içerisindeki dolguda tüm inkübasyonun tamamlanmış hali

Ölçüm aşamasında kanala 100 μL 'lik Hamilton şırıngası ve 0,05 $\mu\text{L}/\text{dk}$ (50 nL/dk)akış hızıyla 600 saniye boyunca asetat tamponu (pH 3) verilerek Qdot'larının içeriğindeki Cd^{2+} çözülerek kanalda elektrotlara doğru yol alması sağlandı. Çalışma elektroduna negatif potansiyel uygulanarak biriktirilen Cd^{2+} iyonları, sıyrılmalı kare dalga voltametri ile ölçüldü (Şekil 2.18 a, b ve c),(Tablo 2.3).



Şekil 2.18 a) Ölçümden önceki inkübasyon durumu, b) Asetat tamponu ile QD'ların çözülüp elektrotlara sürüklenmesi, c) QD'larından çözülen Cd^{2+} iyonlarının çalışma elektrodunda biriktirilmesi

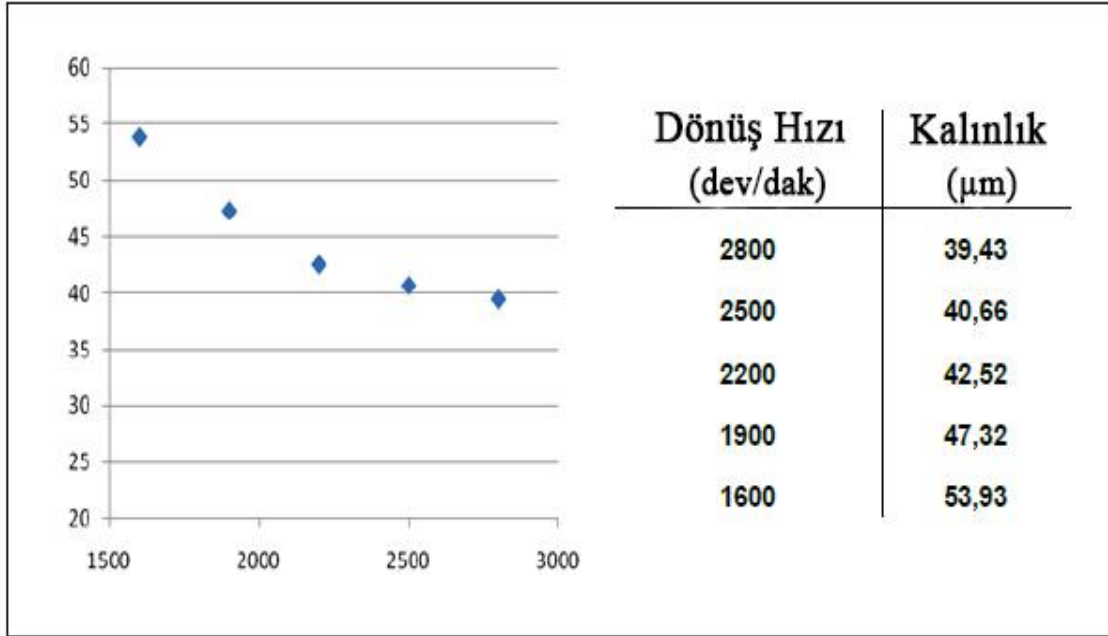
Tablo 2.3 Kare dalga voltametrisi ölçüm protokolü

<u>Ön Deriştirme</u>	
Başlangıç potansiyeli (V) :	-0,15
Başlangıç süresi (s) :	0
Önderiştirme potansiyeli (V):	-1,1
Ön deriştirme süresi (s) :	300
Dengeye gelme süresi (s) :	5
<u>Ölçüm</u>	
Ölçüm sonrası hücre kapalı :	X
Frekans (8-2000 Hz) :	25
<u>Potansiyeller</u>	
Başlangıç potansiyeli (V) :	-0,8
Bitiş potansiyeli (V) :	-0,15
Potansiyel artışı (V) :	0,005
Genlik (V) :	0,028
Bekleme potansiyeli (V) :	-0,15

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Farklı hızlarda ve farklı süreler boyunca çevirilen spin kaplayıcı, silikon yonga tablasının, SU 8-50 negatif foto dirençli polimer ile farklı kalınlıklarda kaplamasını sağlar. Uygun bir kalınlık elde etmek için farklı süreler ve spin coater dönüş hızları önceki çalışmalardan alındı (Tablo 3.1). Uygun kaplama kalınlığı (100 μm 'lik) için seçilen spin coater hızı 1000 rpm, 50 saniye boyunca uygulandı (Sanchez,2009).

Tablo 3.1 Spin kaplayıcının farklı dönüş hızları ile kapladığı polimer tabakalarının kalınlıkları (Sanchez, 2009)

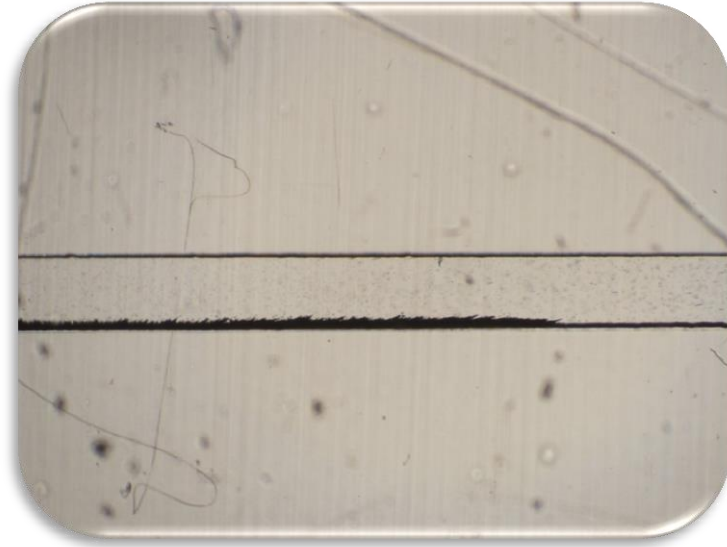


7,9 mW/cm² gücündeki UV ışık 100 μm 'lik kalınlıktaki foto dirence farklı süreler boyunca uygulandı. 60 saniyelik sürenin foto dirençli polimerin çapraz bağlanmasına yeterli olduğu önceki çalışma sonuçlarından edinildi (Tablo 3.2) (Sánchez, 2009).

Tablo 3.2 Farklı UV uygulama sürelerine karşılık kaplama kalınlığı ölçümlerinin standart sapmaları (Sanchez, 2009)

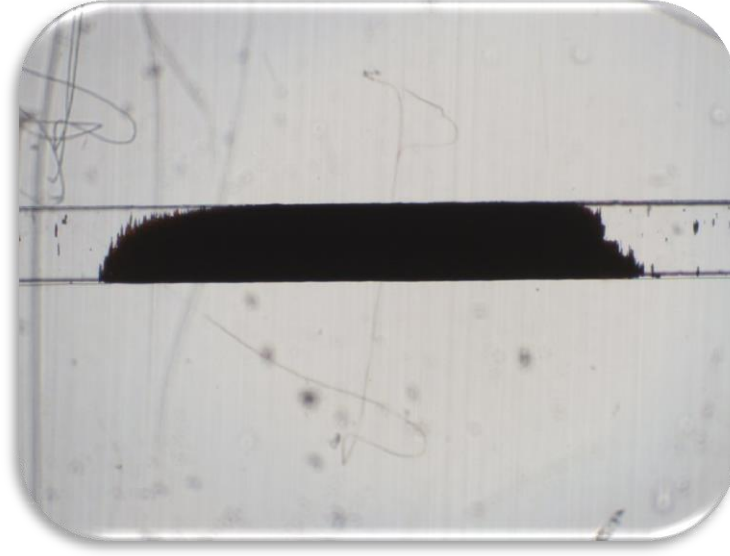
UV uygulanma süresi (s)	Mikrokanal genişliği (μm)	Kanal yüksekliği denemeleri standart sapmaları
5	100	6.26%
10	100	0.27%
15	100	0.29%
20	100	0.15%
25	100	0.10%
60	100	0.06%

Süper mıknatısların dolgu oluşturma denemelerinde mıknatısların kuzey-kuzey veya güney-güney kutupların karşı karşıya geldiği konfigürasyonları sırasında mikro kanal çeperlerinde MB birikmesi gözlemlendi fakat dolgu oluşturulamadı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Kuzey-Kuzey kutuplar karşılıklı mıknatıs konfigürasyonu ile manyetik bilye dolgusu denemesi

Süper mıknatısların kuzey-güney kutuplarının karşı karşıya gelmesiyle ise kısa sürede dolgu oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Kuzey-Güney kutuplar karşılıklı mıknatıs konfigürasyonu ile manyetik bilye dolgusu denemesi

2,8 μm ve 1 μm çaplarında tosil-aktif manyetik bilyeler dolgu oluşturmak için denendi. 2,8 μm çapındaki MB'lerin çok çabuk çökmeleri sebebiyle 1 μm çapındaki tosil-aktif MB'ler kullanılmasına karar verildi.

Kuvvetli ve kullanışlı bir manyetik alanın tespiti için süper mıknatısların mikro kanala göre duruşları simülasyonlarda paralel, dik ve çeşitli açılarla değiştirilerek denendi.

Dik konumda kuvvetli bir manyetik alan elde edilirken, manyetik alanın mikro kanal üzerinde etki eden alanın çok dar olduğu görüldü. Bu konumlandırma deneyler sırasında kısa ve sıkışık bir dolgu oluşmasına sebebiyet verdi.

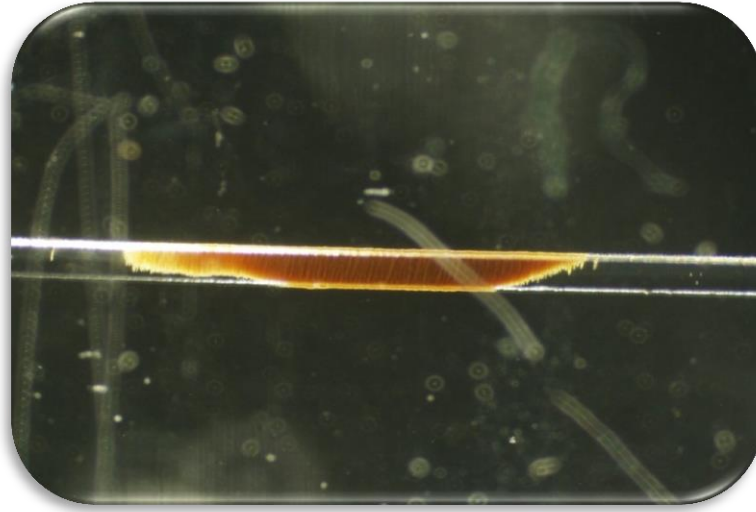
Paralel konumda yerleştirilen mıknatıs iki ayrı kuvvetli manyetik alan oluşturması iki farklı dolgu oluşumuna sebep olduğu görüldü.

Süper mıknatısların 37° 'lik bir açıyla yerleştirilmesi ise ikinci bir dolgunun oluşmasını engellerken aynı zamanda mıknatısların mikro kanala yakın olan kısmında yeterli uzunlukta ve çözelti geçişine elverişli dolgular elde edildi.

Uygun süper mıknatıs konumu, kutupları ve manyetik bilyelerin tespit edilmesinin ardından, iki farklı kanal genişliğinde farklı miktarlardaki MB'leri farklı akış hızları ile kanaldan geçirerek uygun dolgu standart hale getirildi.

Dolgunun standart hale getirilmesi sırasında, dolgunun sabitliği (manyetik alandan kurtulup mikro kanala yayılmaması) ve basınca karşı direnci (çözelti değişikliği sırasında mikro kanal içerisinde oluşabilecek basınç artış ve azalmalarına karşı dolgunun direnci) denendi.

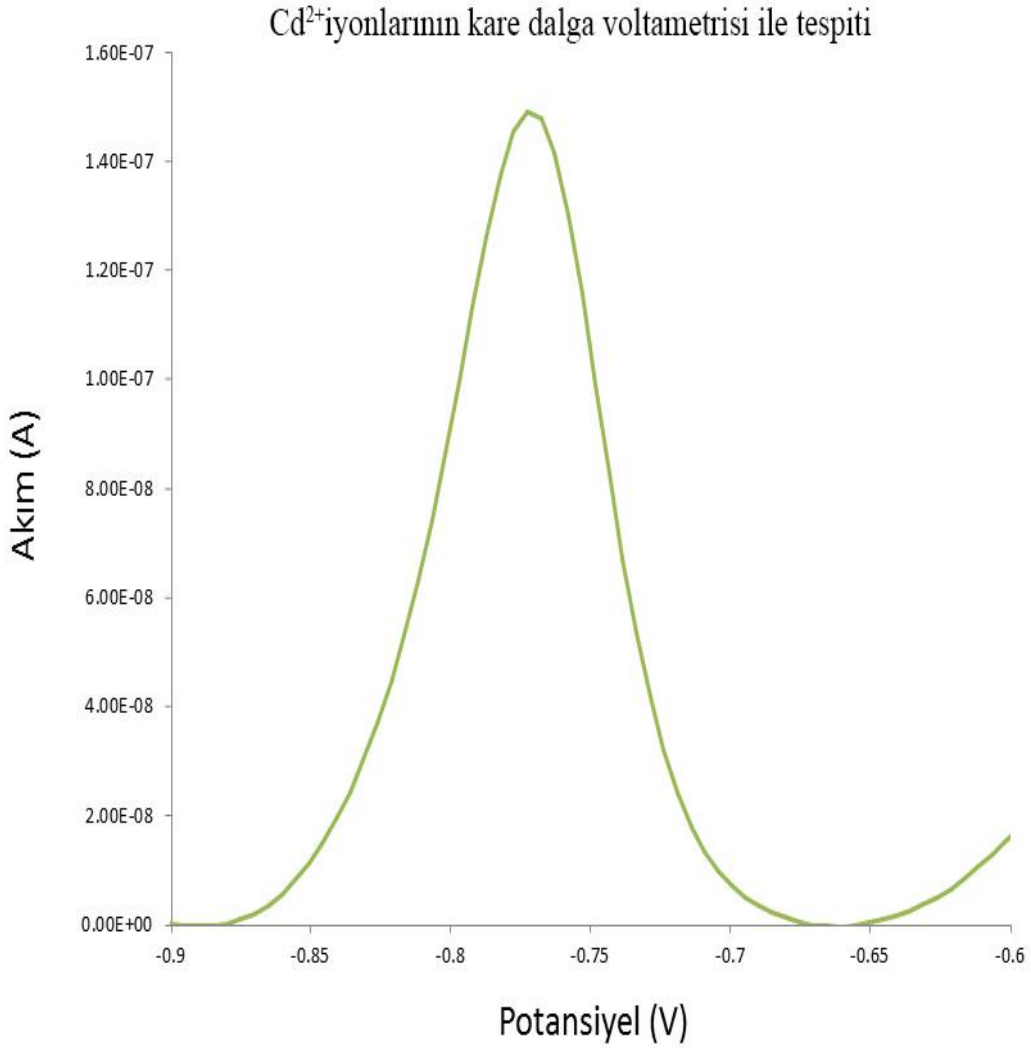
100 μm 'lik kanal içerisindeki akış hızındaki en ufak değişiklikler dahi küçük hacimli bu kanalda büyük etki yarattığından MB dolgusunun yerinde kalamadığı gözlemlendi. 200 μm 'lik kanaldaki dolgunun çok daha kararlı olduğu tespit edildi. 200 μm 'lik kanal üzerinde yapılan denemeler sonucunda optimize değer olarak 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla 2,6 μg MB kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Optimize dolgu: 200 μm 'lik kanal, 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla 2,6 μg MB

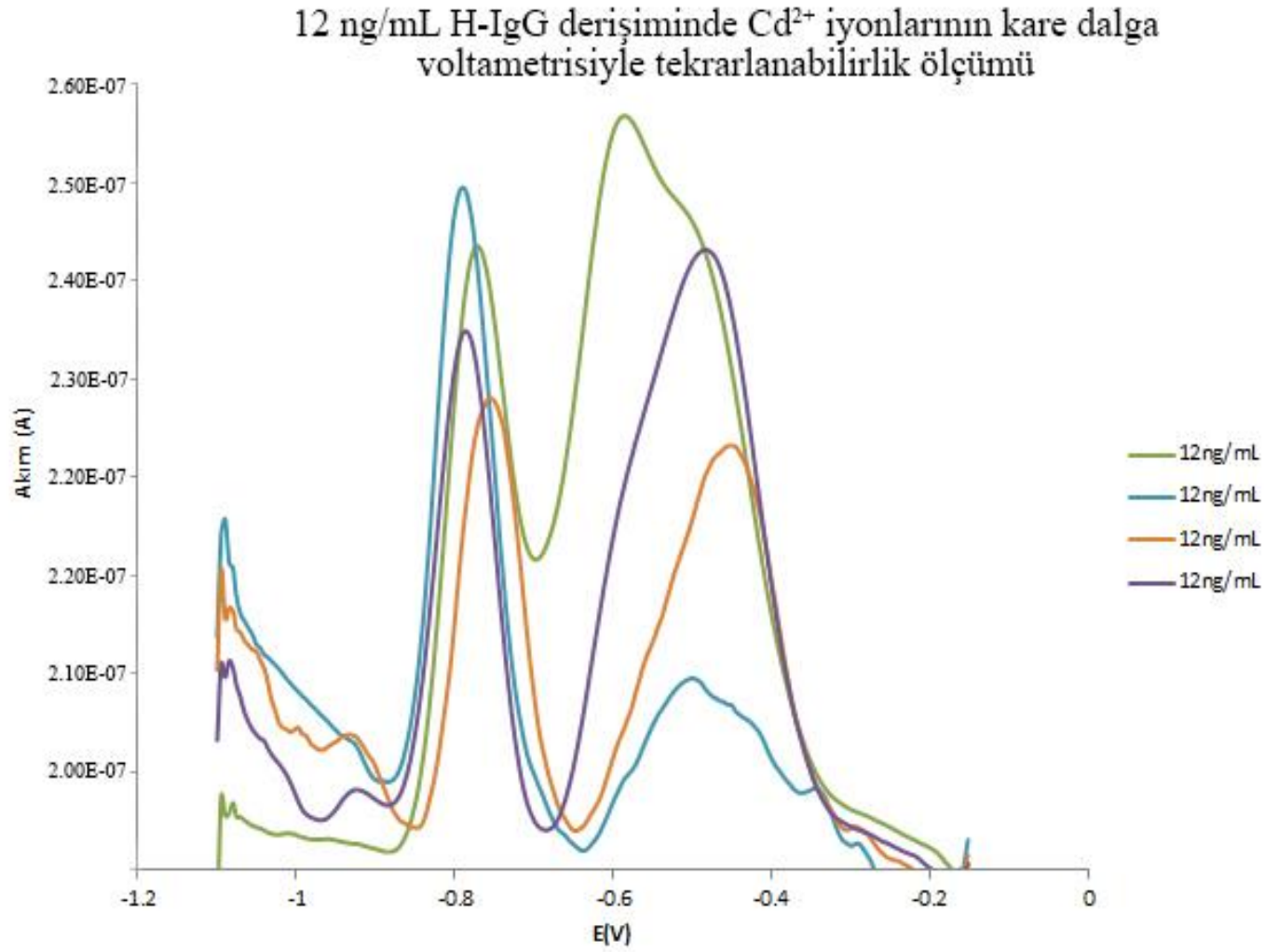
Belirlenen dolgu içerisinde boşluk olup olmadığı, kuantum noktalarının floresan özelliği kullanılarak, floresan mikroskopuyla incelendi ve boşluk olmadığı gözlemlendi.

Ölçüm aşamasına geçildiğinde elektrokimyasal etiket olarak kullanılan QD'lerinin içeriğindeki Cd^{2+} derişimi H-IgG derişimi ile doğru orantılı olması beklenerek Cd^{2+} iyonlarının kare dalga voltametri ile tespitinin yapılması hedeflendi. İlk aşamada yöntemin ve LOC'nin çalışıp çalışmadığını denemek amacıyla, mikrokanal içerisine direkt olarak enjekte edilen Cd^{2+} iyonlarının elektrotta biriktirilmesi ve ölçülmesi denemeleri yapıldı. Cd^{2+} iyonlarının karakteristik pikinin bulunduğu -0,8 V da belirgin pik bulundu (Sanchez, 2009), (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Kare dalga voltametrisi ile Cd²⁺ iyonlarının tespiti

H-IgG ölçüm aşamasında tamamlanmış immünoassay üzerindeki QD'larının yapısında bulunan Cd²⁺ iyonlarının asetat tamponu (pH 3) aracılığı ile çözülüp kanal içerisinde akan çözelti vasıtası ile elektrotlara doğru ilerlemesi sağlandı. Bu esnada çalışma elektroduna negatif potansiyel uygulanarak iyonların elektrot yüzeyinde tutunması sağlandı. Yüksek akış hızlarında iyonların elektrot yüzeyine tutunması sağlanamadığı için akış hızlarının ve süresinin optimizasyonu yapıldı. 0,05 µL/dk (50 nL/dk) akış hızıyla 600 saniye boyunca elektrotta Cd²⁺ iyonlarının biriktirilmesi tekrarlanabilirlik çalışmaları başarılı bulundu (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 12 ng/mL üzerine tutunmuş QD'larının içeriğindeki Cd²⁺ iyonlarının kare dalga voltametriyiyle ölçümü ve tekrarlanabilirlik testleri

Farklı derişimlerde yapılan tekrarların başarılı olmasının ardından bulunan sonuçlarla ortalama değerler elde edildi (Şekil 3.6). Elde edilen H-IgG verileri için kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3.7).

Benzer çalışmalardan farkı olarak LOC içerisinde yapılan çalışmaların diğerlerine oranla daha az kimyasal kullanılarak yaklaşık veya daha duyarlı H-IgG gözlemlenebildiği görülmüştür(Zarei, 2012; Campanella, 2008; Sanchez, 2009).

Önceki çalışmalarda aynı miktarda manyetik bilyeler kullanılmış ve ölçümler sadece Screen Printed Electrode (SPE) üzerinde yapılmıştır (Şekil 3.8). Elde edilen sonuçlara göre LOC mikrokanalı içerisinde ön deriştirme ile miktar olarak daha az kimyasal kullanılmış ve duyarlılık artırılmıştır (Sanchez, 2009).

Kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler:

$$y = 9E-09x + 1E-07 \text{ (y: A, x: ng/mL)}$$

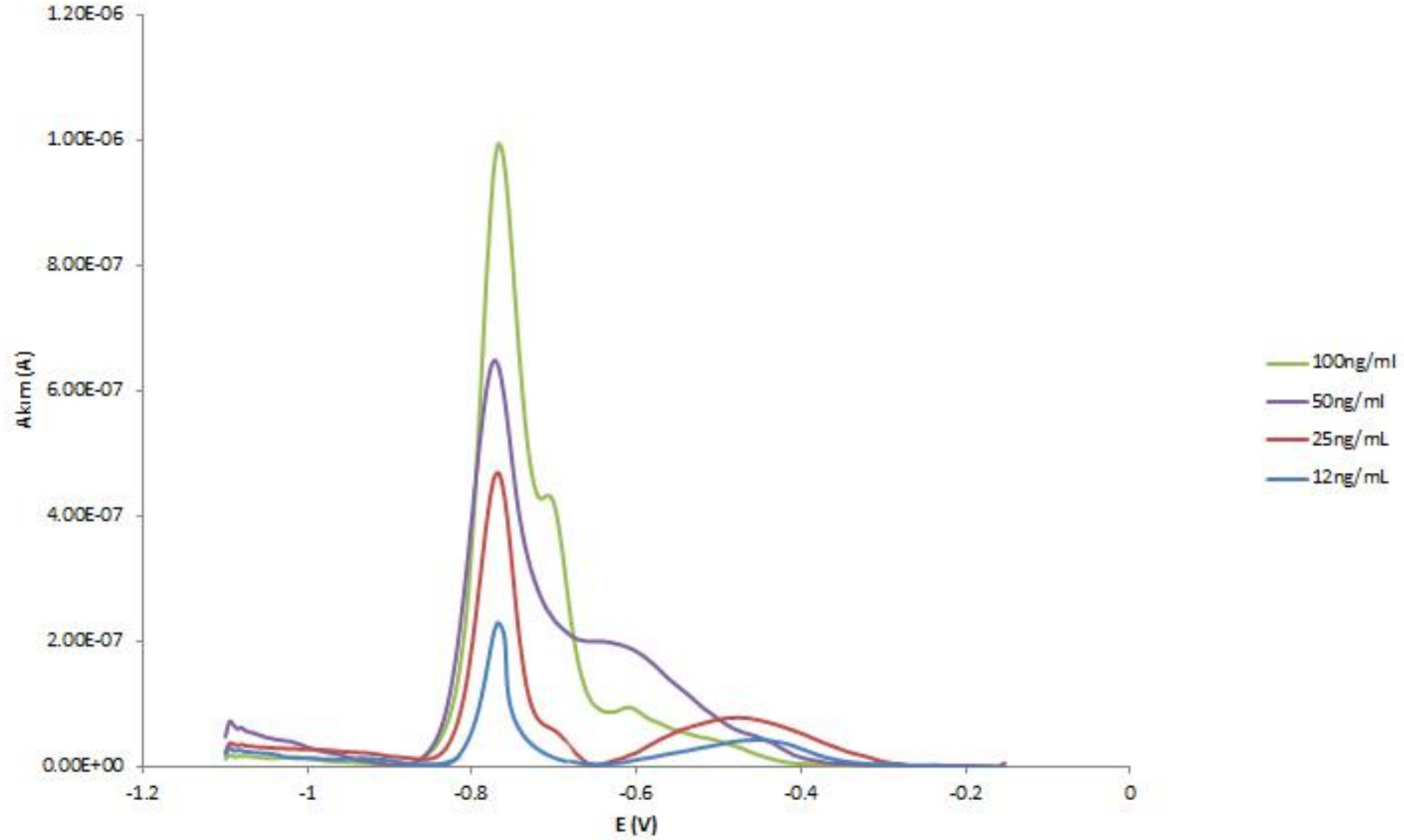
$$R^2 = 0.9649$$

$$\text{LOD} = 9,52E-08 \text{ (Gözlenebilme sınırı, Limit of detection)}$$

$$\text{LOQ} = 1,792E-07 \text{ (Tayin sınırı, Limit of quantitation)}$$

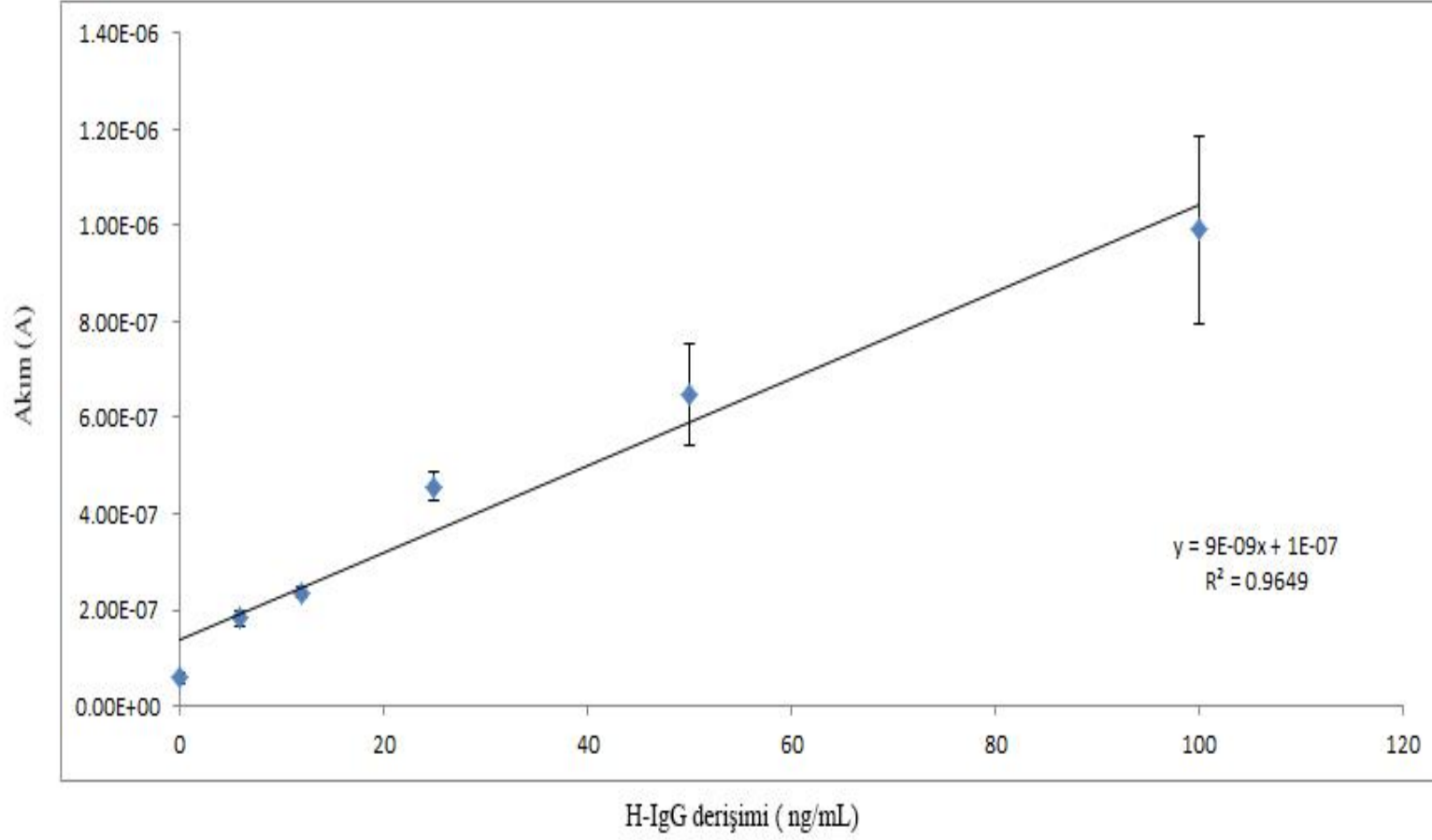
LOC cihazlarının az miktarda kimyasal kullanımı ve duyarlı ölçümü yanında, amaca yönelik dizayn edilebilme özelliği, kolay taşınabilirliği, tekrar kullanılabilirliği ve ucuz fabrikasyonu sayesinde birçok alanda kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanılabilir olduğu söylenilebilir. LOC cihazlarında seçilen substratların elektrokemilüminesans ışığını geçirgen malzemeler seçilmesi durumunda chip içerisinde duyarlılığı daha fazla olan elektrokemilüminesans ölçümlerinin LOC mikrokanalı içerisinde yapılması mümkün kılınabilir (Tian,2010).

Lab-On-a-Chip mikrokanalı içerisinde H-IgG ölçümleri



Şekil 3.6 LOC içerisinde farklı derişimlerde H-IgG ölçümleri

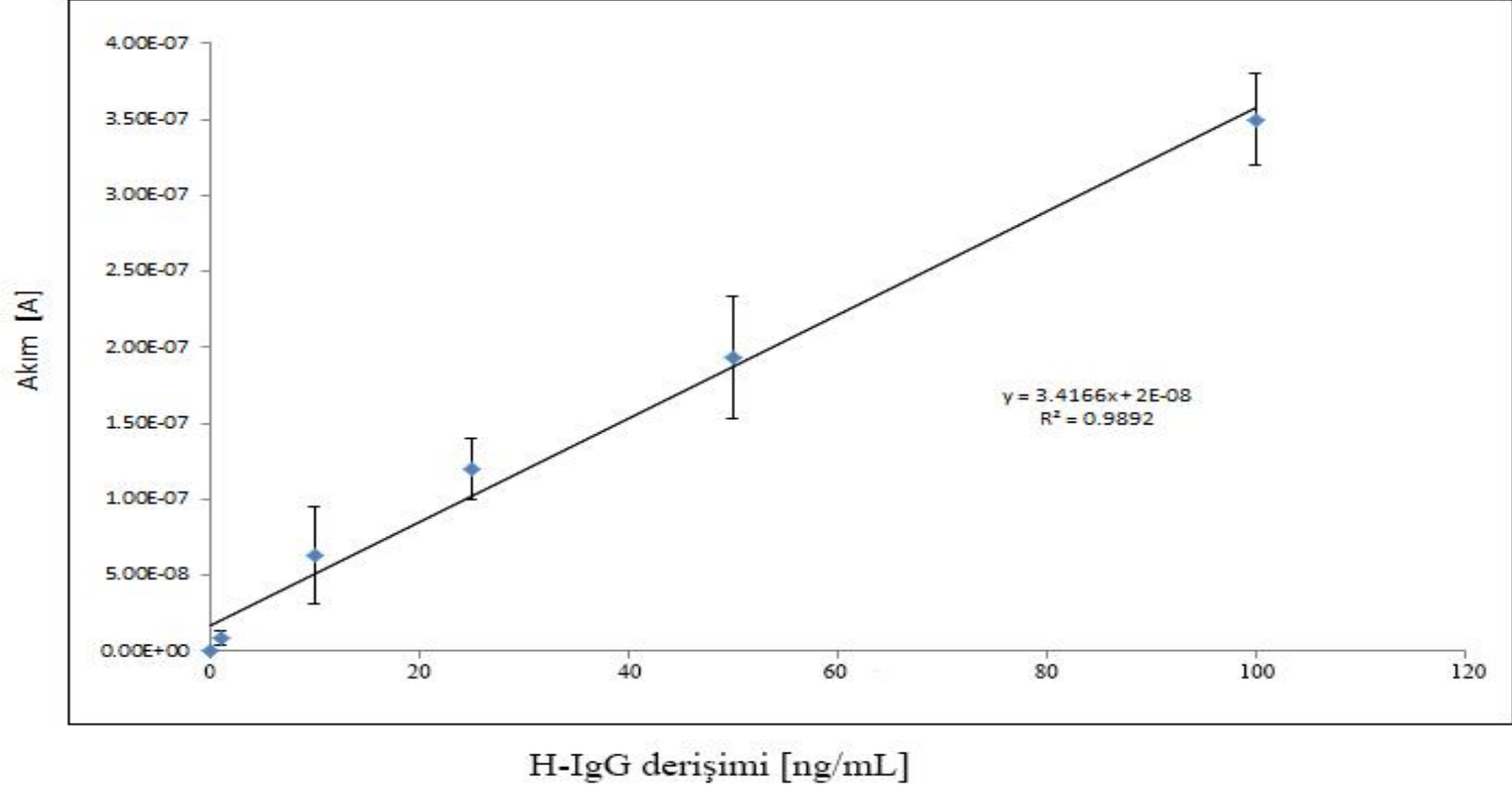
İnsan-immüoglobulin G kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.7 H-IgG kalibrasyon eğrisi

H-IgG Kalibrasyon Eğrisi

(Önceki çalışmalardan elde edilmiş sonuçlar)



Şekil 3.8 Eski çalışmalardan alınan H-IgG kalibrasyon eğrisi (Sanchez, 2009)

4. KAYNAKLAR

- Algar W. R. ve Krull U. J., 2010. New opportunities in multiplexed optical bioanalyses using quantum dots and donor–acceptor interactions, Anal. Bioanal. Chem. DOI 10.1007/s00216-010-3837-y.
- Alizadeh A., Khodaei M. M., Karami Ch., Workentin M. S., Shamsipur M. ve Sadeghi M., 2010. Rapid and selective lead (II) colorimetric sensor based on azacrown ether-functionalized gold nanoparticles, Nanotechnology, 21, 315503-315511.
- Ansari A. A., Solanki P. R., Kaushik A. ve Malhotra B.D., 2009. Recent advances in nanostructured metal oxides based electrochemical biosensors for clinical diagnostics, Nanostructured Materials for Electrochemical Biosensors, Nova Science Publishers, ISBN: 978–1–60741–706–4.
- Arruda D. L., Wilson W. C., Nguyen C., Yao Q. W., Caiazzo Jr R. J., Talpasanu I., Dow D. E. ve Liu B. C-S., 2009. Microelectrical sensors as emerging platforms for protein biomarker detection in point-of-care diagnostics, Expert Rev. Mol. Diagn., 9, 7, 749-755.
- Authier L., Grossiord C. ve Brossier P., 2001. Gold nanoparticle-based quantitative electrochemical detection of amplified human cytomegalovirus DNA using disposable microband electrodes, Anal. Chem., 73,18, 4450–4456.
- Aycan, S.,1994 Polarografik ve Voltammetrik Teknikler, Yıldız Teknik Üniversitesi Yayını No: 293,1.
- Campanella L., Martini E., Tomassetti M., 2008. Determination of HIgG and anti-HIgG using a single potentiometric immunosensor and two different “competitive methods”: Application to the analysis of globulin G in human serum, Sensors and Actuators B, 130, 520–530
- Campos L. M., Truong T. T., Shim D. E., Dimitriou M. D., Shir D., Meinel I., Gerbec J. A., Hahn H. T., Rogers J. A. ve Hawker C. J., 2009. Applications of photocurable PMMS thiol-ene stamps in soft lithography, Chem. Mater., 21, 5319–5326.
- Chen Y. ve Luo Y., 2009. Precisely defined heterogeneous conducting polymer nanowire arrays- fabrication and chemical sensing applications, Adv. Mater., 21, 2040–2044.
- Cheng Z., Li Q., Li Z., Zhou Q. ve Fang Y., 2010. Suspended graphene sensors with improved signal and reduced noise, Nano. Lett., 10, 1864–1868.
- Choi S. H., Kim D. S. ve Kwon T. H., 2009. Microinjection molded disposable microfluidic lab-on-a-chip for efficient detection of agglutination, Microsyst. Technol., 15, 309–316. 28.

- Chuang Y-C., Li J-C., Chen S-H., Liu T-Y., Kuo C-H., Huang W-T. and Lin CS., 2010. An optical biosensing platform for proteinase activity using gold nanoparticles, Biomaterials, 31, 23, 6087-6095.
- Crivat G., Da Silva S. M., Reyes D. R., Locascio L. E., Gaitan M., Rosenzweig N. ve Rosenzweig Z., 2010. Quantum dot FRET-based probes in thin films grown in microfluidic channels, J. Am. Chem. Soc., 132, 1460–1461.
- Dittrich Petra S., Tachikawa K., ve Manz A., 2006. Micro Total Analysis Systems. Latest advancements and trends, Anal. Chem., 78, 3887-3908.
- El-Sayed I. H., Huang X. ve El-Sayed M. A., 2005. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer, Nano Letters, 5, 5, 829–834.
- Empedocles S., Bawendi M., 1999. Spectroscopy of single CdSe Nanocrystallites, Acc. Chem. Res., 32, 389-396.
- De la Escosura-Muñiz A., Ambrosi A. ve Merkoçi A., 2008. Electrochemical analysis with nanoparticle-based biosystems, Trends in Analytical Chemistry, 27, 7, 568-584.
- Fan M., Thompson M., Andrade M. L., ve Brolo A. G., 2010. Silver nanoparticles on a plastic platform for localized surface plasmon resonance biosensing, Anal. Chem., 82, 6350–6352.
- Fanjul-Bolado P., Hernández-Santos D. ve Lamas-Ardisana P. J., 2008. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes, Electrochimica Acta, 53, 3635–3642.
- O Farokhzad.C., Khademhosseini A., Jon S., Hermmann A., Cheng J., Chin C., Kiselyuk A., Teply B., Eng G. ve Langer R., 2005. Microfluidic system for studying the interaction of nanoparticles and microparticles with cells, Anal. Chem., 77, 5453-5459.
- Richards Grayson A. C., Shawgo R. S., Johnson A. M., Flynn N. T., Li Y., Cima M. J. ve Langer R., 2004. A BioMEMS Review: MEMS technology for physiologically integrated devices, Proceedings of the IEEE, 92, 1, 6-21.
- Greener J., Li W., Ren J., Voicu D., Pakharenko V., Tang T. ve Kumacheva E., 2009. Rapid, cost-efficient fabrication of microfluidic reactors in thermoplastic polymers by combining photolithography and hot embossing, Lab Chip, 10, 522–524.
- Haeberle S. ve Zengerle R., 2007. Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications, Lab Chip, 7, 9, 1094-1110.
- Hames, D., Hooper, N., Tutar, Y., Geçkil, H. ve Karataş, M., 2010. Biyokimya, Nobel Yayın, ISBN 978-605-395-288-6.

- Hu C. ve Hu S., 2009. Carbon nanotube-based electrochemical sensors: Principles and applications in biomedical systems, Journal of Sensors, DOI:10.1155/2009/187615.29.
- Huang Y., Dong X., Shi Y., Li C. M., Li L-J. ve Chen P., 2010. Nanoelectronic biosensors based on CVD grown graphene, Nanoscale, 2, 1485–1488.
- Illuminati S., Annibaldi A., Truzzi C., Finale C. ve Scarponi G., 2013. Square-wave anodic-stripping voltammetric determination of Cd, Pb and Cu in wine: Set-up and optimization of sample pre-treatment and instrumental parameters, Electrochimica Acta, 104, 148–161, Italy.
- Jokerst J. V., Raamanathan A., Christodoulides N., Floriano P. N., Pollard A., Simmons G. W., Wong J., Gage C., Furmaga W. B., Redding S. W. ve McDevitt J. T., 2009. Nano-bio-chips for high performance multiplexed protein detection: Determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels, Biosensors and Bioelectronics, 24, 3622–3629.
- Kuno M., Lee J. K., Dabbsosi B.O., Mikulec F. V. ve Bawendi M. G., 1997. The band edge luminescence of surface modified CdSe nanocrystallites: Probing the luminescing state, J. Chem. Phys., 106, 9869-9882.
- Levinson H. J., 2001. Principles of lithography, SPIE- The International Society for Optical Engineering, 1-6. Bellingham, Washington D.C.
- Liu G., Wang J., Kim J. ve Jan M. R., 2003. Electrochemical coding for multiplexed immunoassay of proteins, Anal. Chem. 76, 7126-7130.
- Lomas T., Mongpraneet S., Wisitsoraat A., Jaruwongrunsee K., Sappat A., Maturros T., Chevasuvit F. ve Tuantranont A., 2009. Low cost hot Embossing process for plastics microfluidic chips fabrication, 6th International Conference on Electrical Engineering/Electronics, Computer, Telecommunications and Information Technology, 462 – 464.
- Luo J. H., Jiao X. X., Li N. B. ve Luo H. Q., 2013. Sensitive determination of Cd(II) by square wave anodic stripping voltammetry with in situ bismuth-modified multiwalled carbon nanotubes doped carbon paste electrodes, Journal of Electroanalytical Chemistry, 689, 130–134.
- Lv M., Wang X., Li J., Yang X, Zhang C, Yang J. ve Hu H., 2013. Cyclodextrin-reduced graphene oxide hybrid nanosheets for the simultaneous determination of lead(II) and cadmium(II) using squarewave anodic stripping voltammetry, Electrochimica Acta, 108, 412– 420.
- Lyshevski S. E., 2001. Nano and microelectromechanical systems. Fundamentals of nano and microscience, Engineering, technology and medicine series. CRC Press., 19-20.

- Mahto S. K., Yoon T. H. ve Rhee S. W., 2010. Cytotoxic effects of surface-modified quantum dots on neuron-like PC12 cells cultured inside microfluidic devices, BioChip J. 4, 1, 82-88.
- Manz A., Graber N. ve Widmer H.M., 1990. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. Sensor and Actuators, B1, 244-248.
- Medintz I. L., Stewart M. H., Trammell S. A., Susumu K., Delehanty J. B., Mei B. C., Melinger J. S., Blanco-Canosa J. B., Dawson P. E. ve Mattoussi H., 2010. Quantum-dot/dopamine bioconjugates function as redox coupled assemblies for in vitro and intracellular pH sensing, Nature Materials, 9, 676-684.
- Merkoçi A., Marcolino-Junior L.H., Marín S., Fatibello-Filho O. ve Alegret S., 2007. Detection of cadmium sulphide nanoparticles by using screen-printed electrodes and a handheld device, Nanotechnology, 18, 1-6.
- Michalet X., Pinaud F. F., Bentolila L. A., Tsay J. M., Doose S., Li J. J., Sundaresan G., Wu A. M., Gambhir S. S. ve Weiss S., 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, Science, 28, 307, 538 – 544.
- Mijatovic D., Eijke J. C. T. 1 ve van den Berg A., 2005. Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up-a review, Lab Chip, 5, 492-500.
- Mongpraneet S., Wisitsora A., Phatthanakun R., Chomnawang N. ve Tuantranont A., 2010. Low-cost x-ray mask based on micropattern sputtered lead film for x-ray lithography, American Vacuum Society, 27, 3, 1299-1303.
- Munge B., Liu G., Collins G. ve Wang J., 2006. Multiple enzyme layers on carbon nanotubes for electrochemical detection down to 80 DNA copies, Anal. Chem., 77, 14, 4662-4666.
- Murphy C. J., 2002. Optical sensing with quantum dots. Anal. Chem., 74, 19, 520-526.
- Nath P., Fung D., Kunde Y. A., Zeytun A., Branch B. ve Goddard G., 2010. Rapid prototyping of robust and versatile microfluidic components using adhesive transfer tapes, Lab Chip, 10, 2286-2291.
- Norris D. J., Sacra A., Murray C. B. ve Bawendi M. G., 1994. Measurements of the size dependent hole spectrum in CdSe Quantum dots, Physical Review letters, 72, 2612-2615.
- Pérez B., 2007. Carbon nanotubes for electrochemical (bio)sensing. Universidad Autónoma de Barcelona. Ph.D Thesis. Chemistry Department. Science Faculty, 31.
- Pumera M., Sánchez S., Ichinose I. ve Tang J., 2007. Electrochemical nanobiosensors, Sensors and Actuators B: Chemical, 123, 1195-1205.

- Rajesh T. ve Kumar D., 2009. Recent progress in the development of nano-structured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications. Sens. Actuat. B, 136, 275–286.
- Roy S., 2007. Fabrication of micro- and nano-structured materials using mask-less processes. J. Phys. D: Appl. Phys., 40, 413–426.
- Sanchez M. M., 2009. Master Thesis: Nanobioelectronics based platforms for lab-on-a-chip applications, Nanobioelectronics and Biosensors Group Institut Català de Nanotecnologia ,ICN, Barcelona
- Sapsford K. E., Pons T., Medintz I. L. ve Mattoussi H., 2006. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots, Sensors, 6, 925-953.
- Sayah A., Parashar V.K., Pawlowski A. ve Gijs M.A.M., 2009. Elastomer mask for powder blasting microfabrication, Sensors and Actuators A, 125, 84-90.
- Shiu P.P., Knopf G.K. ve Ostojic M., 2010. Fabrication of metallic micromolds by laser and electro-discharge micromachining, Microsystem Technologies, 16 (3), 477-485.
- Skoog, D. A., West, D. M. ve Holler, F.J., 1996. “Analitik Kimya Temelleri”, Çeviri editörleri: Kılıç, E. ve Köseoğlu, F., 7. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, 1,386-495.
- Sparreboom W., van den Berg A. ve Eijkel J. C. T.,2009. Principles and applications of nanofluidic transport, Nature nanotechnology, 4, 713-720.
- Stavis S. M., Edel J. B., Samiee K. T. ve Craighead H. G., 2005. Single molecule studies of quantum dot conjugates in a submicrometer fluidic channel, Lab Chip, 5, 337–343.
- Terry S.C., 1975. A gas chromatographic air analyzer fabricated on silicon wafer using integrated circuit technology, PhD. Dissertation Stanford University.
- Tian D., Duan C., Wang W. ve Cui H., 2010. Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol functionalized gold nanoparticle labeling, Biosensors and Bioelectronics 25, 2290–2295.
- Tural, H., Gökçel, H. ve Ertas, F.N., 2003. Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları 186, 131.
- Wanekaya A. K., Chen W., Myung N.V. ve Mulchandani A., 2006. Nanowire-based electrochemical biosensors, Electroanalysis, 18, 533–550.
- Wang J., Xu D., Kawde A.N. ve Polsky R., 2001. Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization, Anal. Chem., 73, 5576–5581.

- Wang J., Liu G., ve Merkoçi A., 2003. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets, Am. Chem. Soc., 125, 11, 3214–3215.
- Wang X-F., Zhou Y., Xu J-J. ve Chen H-Y., 2009. Signal-on electrochemiluminescence biosensors based on CdS–carbon nanotube nanocomposite for the sensitive detection of choline and acetylcholine, Adv. Funct. Mater., 19, 1444–1450.
- Wang F., Banerjee D., Liu Y., Chen X. ve Liu X., 2010. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy, Analyst, 135, 1839–1854.
- Wang K., Liu Q., Wu X-Y., Guan Q-M. ve Li H-N., 2010. Graphene enhanced electrochemiluminescence of CdS nanocrystal for H₂O₂ sensing, Talanta, 82, 372–376.
- Yeo L. P., Huan S., Wang Z., Wang Z. ve Frans N., 2009. Micro-fabrication of polymeric devices using hot roller embossing, Microelectronic Engineering, 86, 933–936.
- Zarei H., Ghourchian H., Eskandari K. ve Zeinali M., 2012. Magnetic nanocomposite of anti-human IgG/COOH–multiwalled carbon nanotubes/Fe₃O₄ as a platform for electrochemical immunoassay, Analytical Biochemistry, 421, 446–453, Iran.
- Zhang H., Xua T., Li C-W. ve Yang M., 2010. A microfluidic device with microbead array for sensitive virus detection and genotyping using quantum dots as fluorescence labels, Biosensors and Bioelectronics, 25, 2402–2407.
- Zhu L., Xu L., Huang B., Jia N., Tan L. ve Yao S., 2014. Simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) using square wave anodic stripping voltammetry at a gold nanoparticle-graphene-cysteine composite modified bismuth film electrode, Electrochimica Acta, 115, 471–477, China.
- Zuman, P. ve Heyrovsky, J. “Developments leading to square wave and pulse polarography”, Analyst, 117: 1803-1811.
- Zuman, P. ve Brezina, M., 1962. "Polarographic Analysis in Pharmacy. Progress in Polarography", 2th Ed. Zuman, P., Kolthoff, I. M., New York, Intersence Publishers, 2:593-651.
- URL 1, 2014, <http://visualscience.ru/feature-img/immunoglobulin/immunoglobulin-g-3.jpg>, 21.11.2014.

ÖZGEÇMİŞ

Serdar ŞANLI, 1985 yılında Şişli/İstanbulda doğdu. İlköğretimini Hacı Ethem Üktem İlkokulu'nda, ortaokulu Resneli Niyazi Bey Ortaokulu'nda tamamladı. Lise öğrenimini Kağıthane Anadolu Lisesinde tamamladı. 2005-2006 Eğitim –Öğretim yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2010 yılında lisans eğitimini tamamlayarak Kimyager ünvanı aldı. 2011 yılında Ordu Üniversitesinde Araştırma görevlisi olarak görev aldı ve aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.