



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ



**ELDE TAŞINABİLİR BİYOALGILAYICI
GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOMOLEKÜLER
ETKİLEŞİMİN ELEKTROKİMYASAL TAYİNİNE
YÖNELİK UYGULAMALARI**

Yüksek Lisans Tezi

Alper DEMİRHAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir

2021

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**ELDE TAŞINABİLİR BİYOALGILAYICI
GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOMOLEKÜLER
ETKİLEŞİMİN ELEKTROKİMYASAL TAYİNİNE
YÖNELİK UYGULAMALARI**

Alper DEMİRHAN

Danışman: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir

2021

Alper DEMİRHAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Elde Taşınabilir Biyoalgılayıcı Geliştirilmesi ve Biyomoleküler Etkileşimin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Uygulamaları**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 25/01/2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Raportör Üye : Prof. Dr. Mehmet KUNTALP

Üye : Doç. Dr. Yasemin ERAÇ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Elde Taşınabilir Biyoalgılayıcı Geliştirilmesi ve Biyomoleküler Etkileşimin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Uygulamaları” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

23 / 02 / 2021

Alper DEMİRHAN

ÖZET

**ELDE TAŞINABİLİR BİYOALGILAYICI GELİŞTİRİLMESİ VE
BİYOMOLEKÜLER ETKİLEŞİMİN ELEKTROKİMYASAL TAYİNİNE
YÖNELİK UYGULAMALARI**

DEMİRHAN, Alper

Yüksek lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Ocak 2021, 78 sayfa

Biyosensörler hızlı, hassas, seçici, kolayca hazırlanabilen ve düşük maliyetli cihazlar olmalarından dolayı uygulamaları günümüzde oldukça yaygınlaşmıştır. Ölçüm yöntemleri olarak optik, mekanik ve manyetik gibi çeşitli yöntemlerin yanısıra, uygulaması kolay, maliyeti düşük ve hassas analizi mümkün kılması yüzünden elektrokimyasal yöntemlerin biyosensörlerde kullanımları yaygındır.

Tez çalışmasında, elde taşınabilir elektrokimyasal biyoalgılayıcı tasarımı ve kalem grafit elektrotlar kullanılarak biyomoleküler etkileşimin elektrokimyasal tayini amacıyla uygulamaları gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametri yöntemlerini gerçekleştirebilen ve sensör çıktısını analiz edebilen minyatürize bir cihaz geliştirildi. Geliştirilen cihaz $\pm 2,00$ V aralığında ölçüm yapabilmektedir. ± 10 mA'e kadar olan akımları minimum 6 pA çözünürlükle okuyabilmektedir. Ardından geliştirilen cihazla ssDNA ve dsDNA tayini gerçekleştirildi. ssDNA için tayin sınırı 1,25 $\mu\text{g/mL}$,

VIII

dsDNA için ise 1,10 µg/mL olarak bulundu. Aynı deneyler araştırma laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan ticari bir cihazla gerçekleştirildi ve sonuçlar kıyaslandı. Tezde geliştirilen elektrokimyasal analizör ile DNA-protein etkileşiminin voltametrik tayini gerçekleştirilerek elde taşınabilir cihazın elektrokimyasal nükleik asit ve protein tayinine uygulanabilirliği gösterildi.

Anahtar Sözcükler: DNA, protein, elektrokimyasal biyosensörler, potansiyostat, diferansiyel puls voltametrisi, dönüşümlü voltametri

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF HAND-HELD BIOSENSOR AND
ITS APPLICATIONS FOR ELECTROCHEMICAL DETECTION OF
BIOMOLECULAR INTERACTION**

DEMİRHAN, Alper

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof.Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

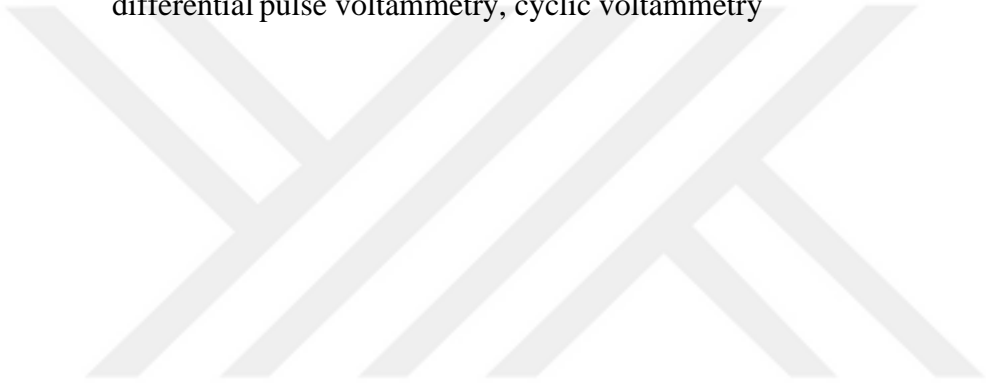
January 2021, 78 pages

Since biosensors are fast, sensitive, selective, easily prepared, and inexpensive devices, their applications have become more prevalent today. In addition to various methods such as optical, mechanical and magnetic as measurement methods, electrochemical methods are widely used in biosensors because they are easy to apply, low-cost and enable precise analysis.

In the thesis study, a handheld electrochemical biosensor was designed and applications were carried out for the electrochemical determination of biomolecular interaction using pencil graphite electrodes. For this purpose, a miniaturized device that can perform cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry methods and analyze the sensor output was first developed. The developed device is capable of scanning $\pm 2,00$ V. It can measure currents up to ± 10 mA with a minimum resolution of 6 pA. Then, detection of ssDNA and dsDNA was performed with the developed device. Limits of detection for ssDNA was calculated as 1,25 $\mu\text{g/mL}$ and for dsDNA as 1,10 $\mu\text{g/mL}$. The same experiments were performed with a

commercial device frequently used in research laboratories and results were compared. Using the electrochemical analyzer developed in the thesis, voltammetric determination of DNA-protein interaction was performed and the applicability of the handheld device to electrochemical nucleic acid and protein determination was demonstrated.

Keywords: DNA, protein, electrochemical biosensors, potentiostat, differential pulse voltammetry, cyclic voltammetry



ÖNSÖZ

Tez çalışmasında, elde taşınabilir elektrokimyasal analizör geliştirildi. Geliştirilen cihazın tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar kullanılarak voltametik nükleik asit tayinine uygulanabilirliği araştırıldı. Bu tezde incelenen elektrokimyasal yöntemlerle, biyosensörlerin daha küçük boyutlarda ve yüksek performansta çalışabileceği gösterilmiştir. Böylece elektrokimyasal biyosensörlerin hasta başı tanı, çevre kirliliği ve savunma gibi birçok uygulamada kullanımına katkıda bulunulmuştur. Bu tezin hazırlanmasında bilgi ve ilgisiyle her zaman destek veren değerli hocam Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

İZMİR

23/02/2021

Alper DEMİRHAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	(vii)
ABSTRACT	(ix)
ÖNSÖZ	(xi)
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	(xii)
ŞEKİLLER DİZİNİ	(xviii)
TABLolar DİZİNİ	(xxiv)
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	(xxv)
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Elektrokimya	3
2.1.1. Temel Prensipler	3
2.1.2. Voltametik Yöntemler	7
2.1.2.1. <u>Dönüşümlü Voltametri</u>	9
2.1.2.2 <u>Diferansiyel Puls Voltametri</u>	13
2.1.3. Potansiyostat	14

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.4. Elektrotlar	15
<u>2.1.4.1. Referans Elektrot</u>	16
<u>2.1.4.2. Yardımcı Elektrot</u>	16
<u>2.1.4.3. Çalışma Elektrodu</u>	16
<u>2.1.4.4. Kalem Grafit Elektrot (KGE)</u>	16
2.2. Biyosensörler	17
2.3. Nükleik Asitler	18
2.4. Proteinler.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Enstrümantasyon.....	21
3.1.1. Güç Devresi	22
3.1.2. Mikrodenetleyici.....	24
3.1.3. Sinyal Üretici	25
3.1.4. Potansiyostatik Kontrol Devresi.....	25
3.1.5. Transempedans Yükseltici.....	25

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.6. Analog-Dijital Dönüştürücü	26
3.1.7. Baskı Devre Kartı	27
3.2. Yazılım	27
3.2.1. Gömülü Yazılım.....	27
<u>3.2.1.1. Kalibrasyon</u>	28
<u>3.2.1.2. Veri protokolü</u>	29
<u>3.2.1.3. Süre Yönetimi</u>	30
<u>3.2.1.4. Elektrokimyasal Protokollerin Gerçeklenmesi</u>	31
<u>3.2.1.5. Veri İşleme</u>	33
3.2.2. Masaüstü Uygulaması.....	40
<u>3.2.2.1. QT</u>	40
<u>3.2.2.2 Dijital Filtre</u>	40
<u>3.2.2.3. Veri Analizi</u>	47
3.3 Kullanılan Cihazlar.....	51
3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	51

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.5. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	52
3.5.1. Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı	52
3.5.2. DNA ve BSA Çözeltilerinin Hazırlanışı	52
3.6. Kalem Grafit Elektrotların Hazırlanışı	52
3.6.1. Kalem Grafit Elektrotların Dönüşümlü Voltametri ile Karakterizasyonu... 53	53
3.7. DNA'nın Voltametrik Analizine Yönelik Deneysel Prosedür.....	53
3.7.1. Kalem Grafit Elektrot Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu.....	53
3.8. DNA-Protein Etkileşiminin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Deneysel Prosedür	53
3.8.1. Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak DNA-Protein Etkileşiminin Voltametrik Tayinine Yönelik Prosedür	53
4. BULGULAR.....	55
4.1. Tarama Hızındaki Değişimin Ölçülen Akıma Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular	55
4.2. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctssDNA'nın Voltametrik Tayinine Yönelik Bulgular	56

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

4.2.1. DNA Konsantrasyonundaki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular	56
4.3. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctDNA'nın Voltametrik Tayinine Yönelik Bulgular	59
4.3.1. DNA Konsantrasyonundaki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular	59
4.4. DNA-BSA Etkileşiminin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Bulgular	62
4.4.1. ssDNA-BSA Etkileşim Süresindeki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular	62
4.4.2. dsDNA-BSA Etkileşim Süresindeki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular	64
5. TARTIŞMA.....	67
5.1. Tarama Hızındaki Değişimin Ölçülen Akıma Etkisinin İncelenmesine Yönelik Tartışma.....	67
5.2. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctssDNA'nın Voltametrik Tayinine Yönelik Tartışma.....	67
5.3. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctDNA'nın Voltametrik Tayinine Yönelik Tartışma	67

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.4. DNA-BSA Etkileşim Süresindeki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Tartışma.....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
TEŞEKKÜR	77
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Elektriksel çift tabakada gerçekleşen redoks tepkimesi. (a) İndirgenme, (b) Yükseltgenme, (c) Elektriksel çift tabaka.....	5
2.2. Voltametrik Yöntemler. Üstte uygulanan sinyal, altta okla gösterilen grafikte ise sensörün tepkisi gösterilmektedir (Compton et al., 2014).	8
2.3. Dönüşümlü voltametri için uygulanan uyartım sinyali. Bu deneylerde başlangıç ile tepe potansiyel değerleri arasında potansiyel doğrusal bir şekilde artırılarak taranır ve her bir gerilim noktasında sensörün akımı ölçülür. Potansiyelin artış hızı “tarama hızı” olarak tanımlanır. Başlangıçtan tepe noktasına kadar tarandıktan sonra ters yönde (tepe noktasından başlangıç noktasına) tarama işlemi başlatılır. Başlangıçtan tepe noktasına kadar olan tarama ile anodik/katodik akım ölçülürken, zıt yöndeki taramada katodik/anodik akım ölçülür.	9
2.4. Dönüşümlü voltametri simülasyonu. Potansiyel A noktasından başlanarak artırılır. D noktasından itibaren potansiyel azaltılarak G noktasında başlangıç potansiyeline dönülür. C noktasında anodik akım, F noktasında ise katodik akım tepe noktasına ulaşır. . Bu tepe noktası Faradayik akım ile kapasitif akımın toplamından oluşmaktadır. Bu yüzden tepe akımından kapasitif akım çıkartılarak Faradayik akım bulunur. Deneye ilk başlanıldığında sadece kapasitif akım olduğu için ve bu akım değeri doğrusal bir şekilde artacağı için, başlangıç noktasından itibaren şekilde gösterdiği gibi bir doğrusal çizgi çizilir ve tepe noktasında kapasitif akımın olması gereken değer hesaplanır. Daha sonra bu değer tepe akımından çıkartılarak Faradayik akım ($i_{a,t}$ ve $i_{k,t}$) bulunmuş olunur.	10
2.5. Şekil 2.4’deki noktaların konsantrasyonun elektrot yüzeyine uzaklıkla değişim grafikleri	11

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.6. Tarama Hızı Simülasyonu	12
2.7. Diferansiyel puls voltametrisinin uyarım sinyali. DPV metodunda, CV'deki gibi bir tarama yapılır. Ancak CV'den farklı olarak her bir ölçüm yapılacak potansiyelde bir puls uygulanır. Akım, pulsun yükselen ve düşen kenarından hemen önce ölçülür ve bu iki akımın farkı alınarak DPV akımı bulunur. Böylece sadece Faradayik akımın ölçülmesi amaçlanır.	13
2.8. Potansiyostatik kontrol sistemi. Sensör (a)'da görüldüğü gibi modellenebilir. V1 gerilimi ile RE değeri kontrol edilir. Referans elektrot tamponlandığı için üzerinden akım akmaz ve gerilimi hep V1 olarak kalır. CE, RE'yi V1 değerinde tutmak için gerekli olan akımı sağlar. Bu akım WE üzerinden geçerek gerileme dönüştürülür. Sensöre uygulanan gerilim, V2-V1 değeri ile belirlenir. (a) Sensörün eşdeğer devresi, (b) Geri-besleme devresi.....	14
3.1. Sistemin blok diyagramı. STM32F373: Dahili 16-bit ADC, 12-bit DAC ve USB kontrolcüsü barındıran ARM M4 mimarisine sahip mikrodenetleyici; MAX4617: Transempedans devresinde I/V kazanç değerini seçmek için kullanılan 8:1 kanallı analog anahtar; A1: 1,5 kazanç değerine sahip op-amp, RE buffer: Referans elektrot için tampon op-amp; A2: Çalışma elektrodunu süren op-amp; TIA: Transempedans yükseltici; A3: 2/3 kazanç değerine sahip ADC sürücü; REF5045: 4,5 V referans voltajı; REF5030: Mikrodenetleyicinin analog birimlerini beslemek için 3,0 V referans voltajı; MCP1703: Dijital devreler için 3,3 V voltaj regülatörü; LPF: Alçak geçiren RC filtre.	21
3.2. Geribesleme devresi. Referans elektrot üzerinden akım akmaması istendiği için tampon devresiyle geribesleme sağlanıyor. Karşıt elektrot (CE) ise RE'nin istenilen değerinde olması için gerekli akımı sağlıyor.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 3.3.** Transempedans (TIA) ve ADC devresi. TIA devresinde 8 farklı akım aralığı için 8:1 kanallı analog anahtar kullanıldı. ADC'nin maksimum gerilimi 3 V ve sensörün maksimum gerilimi 4,5 V olabileceği için, TIA çıkışı 2/3 oranındaki gerilim bölücünün ardından tamponlanıyor. ADC önündeki RC filtre hem örtüşmeyi engellemek amaçlı hem de ADC çevrimi sırasında yük sağlamak amaçlı kullanılıyor..... 26
- 3.4.** Baskı devre serimi ve üretimi yapılmış 39 mm x 62 mm boyutundaki devre. 27
- 3.5.** Kalibrasyon eğrisi. C_{i1} = hesaplanan başlangıç değeri; C_{r1} = ölçülen başlangıç değeri; C_{i2} = hesaplanan bitiş değeri; C_{r2} = ölçülen bitiş değeri..... 29
- 3.6.** Voltmetri dalga formlarının osiloskop görüntüleri. (a) Dönüşümlü Voltmetri Sinyali, (b) Diferansiyel Puls Voltmetri Sinyali 32
- 3.7.** Yüksek miktarda örneklemenin etkisi. Normalde ADC değerleri, (a)'daki gibi sadece tam sayı değerleri alabilirken, eğer ortama gürültü eklenirse bu tam sayı değerleri sürekli değişir. Gürültülü değerler örneklenip ortalaması alındığında (c)'deki gibi daha yüksek çözünürlüklü sonuç elde edilmiş olunur. 34
- 3.8.** DC ölçüm sonucu. (a) mV değeri, (b) ADC değeri..... 35
- 3.9.** DC Sinyalin Histogramı 35
- 3.10.** 17 bitlik data. (a) ADC değeri (LSB), (b) mV değeri..... 36
- 3.11.** 17 bit ve 15 bit data 36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.12. 15 bitlik verilerin denklem 3.7'deki formül ile ortalamalarının alınmasıyla elde edilen grafik. (a) mV değeri, (b) ADC Değeri (LSB).....	37
3.13. Ortalaması alınmış datanın histogramı	38
3.14. Ortalaması alınmış ve 17 bite çıkarılmış data.....	38
3.15. Ortalaması alınmış data ve 17 bitlik data	39
3.16. Uygulama arayüzü	41
3-17: Filtreleme Sonucu Meydana Gelen Faz Farkı	46
3-18: Sıfır Fazlı Filtre Algoritması.....	46
3.19. Sıfır-fazlı filtreleme.	47
3.20. Sıfır-fazlı filtreleme ve normal filtre	47
3.21. Korelasyon Grafiği. Anodik sinyal için denklem 3.12 uygulandığı zaman elde edilen korelasyon katsayı grafiği.	48
3.22. Pozitif tepe değeri için eğrinin bulunması	49
3.23. DPV'de yerel tepe noktası bulma	50
4.1. Elektrotların CV ile karakterizasyonu için yapılan 0,1M KCl içerisinde 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ ve 2 mM $K_4Fe(CN)_6$ kullanılarak yapılan tarama hızı çalışması. Tarama hızı olarak 5 mV/s ile 200 mV/s arasında değerler seçildi. Tarama aralığı:	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
$\pm 1V$ olarak ayarlandı.	55
4.2. Tarama hızı çalışmasında elde edilen akımların tarama hızının kareköküyle değişim grafiği. Akımlar bölüm 3.2.2.3’de anlatılan manuel yöntemle bulundu. .	56
4.3. Geliştirilen cihazla 2-20 $\mu\text{g/mL}$ ssDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği.....	57
4.4. AUTOLAB-302 cihazıyla 2-14 $\mu\text{g/mL}$ ssDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği.....	58
4.5. Her iki elektrokimyasal analizörle voltametrik ssDNA tayinine yönelik elde edilen kalibrasyon grafikleri: (A) Geliştirilen cihaz, (B) AUTOLAB-302.	59
4.6. Geliştirilen cihazla 2-14 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği.....	60
4.7. AUTOLAB-302 cihazıyla 2-18 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği.....	61
4.8. Her iki elektrokimyasal analizörle voltametrik dsDNA tayinine yönelik elde edilen kalibrasyon grafikleri: (A) Geliştirilen cihaz, (B) AUTOLAB-302.	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Şekil****Sayfa**

- 4.9.** ssDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi: (A) BSA Yükseltgenme Sinyali, (B) Guanin Yükseltgenme Sinyali 64
- 4.10.** dsDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi. (a) Yükseltgenme Sinyali, (b) Guanin Yükseltgenme Sinyali..... 66

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Elektrokimyasal sensör örnekleri	7
2.2. Literatürdeki Örnek Potansiyostatlar	15
2.3. Çeşitli Ölçüm Yöntemleri.....	17
3.1. Verilerin kıyaslanması.....	37
3.2. Ortalaması alınmış datalar ile oversampling işleminin sonuçları.....	39
3.3. Verilerin kıyaslanması	39
3.4. Filtrelerin karşılaştırılması.....	42
3.5. FIR ve IIR filtrelerin karşılaştırılması (Ifeachor and Jervis, 2002).	43
4.1. ssDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi (n =3)	63
4.2. dsDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi (n =3)	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ADC	Analog- dijital dönüştürücü
CE	Yardımcı elektrot
CV	Dönüşümlü voltametri
DAC	Dijital-analog dönüştürücü
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPV	Diferansiyel puls voltametri
DTFT	Ayrık zamanlı Fourier dönüşümü
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
FFT	Hızlı Fourier transformu
RE	Referans elektrodu
USB	Evrensel seri veriyolu
WE	Çalışma elektrodu

1. GİRİŞ

Biyosensörler, biyomoleküler etkileşimler hakkında bilgi veren küçültülmüş analitik cihazlardır. Ölçüm yöntemleri olarak optik, elektrokimyasal veya kütle ölçümüne dayalı çeşitli yöntemler kullanılır. Basit, ucuz ve hassas cihazlar geliştirmekte avantaj sağladıkları için elektrokimyasal yöntemlerin kullanımı yaygındır (Wang, 2006).

Elektrokimyasal biyosensörlerde, biyomoleküller bir elektrot yüzeyinde etkileşime girerek elektriksel sinyal oluştururlar. Bundan dolayı bir biyosensör sisteminde meydana gelen işlemler hedef analitin bağlanması, etkileşimi ve buna bağlı olarak sinyal oluşumu ve oluşan sinyalin elektriksel sinyal dönüşümü ile ölçülen değerin okunmasıdır (Palecek, 2002). Hedef analitin bağlanması için, onunla etkileşime giren bir madde, elektrot yüzeyine immobilize edilerek analite spesifik bir yüzey hazırlanır. Bundan dolayı yüzeye analit bağlanması ile elektrodun elektriksel özellikleri değişir. Bu değişimi ölçebilmek için dönüşümlü voltametri, amperometri, diferansiyel puls voltametrisi veya empedans spektroskopisi gibi yöntemler kullanılır. Voltametrik yöntemlerde, belirli bir gerilim aralığında tarama yapılarak akım ölçülür. Bunun sonucunda çıkan tepe noktalarının değeri alınır. Amperometrik yöntemlerde ise sabit bir gerilim altında akımdaki değişimler gözlemlenir. Empedans spektroskopisinde ise sensöre analitlerin bağlanması sonucu oluşan yüzey direnci ve kapasitesindeki değişimler incelenir. Bu kimyasal işlemlerin elektrik sinyaline dönüşmesi ise elektrot yüzeyinde gerçekleşir.

Elektrotlara uygulanacak gerilim, dijital-analog dönüştürücüler ile sağlanır. Ardından elektrotta oluşan akım op-amp ile analog-dijital dönüştürücülerin okuyabileceği bir gerilim değerine dönüştürülür. Mikroişlemci okunan bu değeri dijital sinyal işleme teknikleri ile işleyerek gürültüden arındırır ve madde tayini için gerekli kalibrasyon işlemlerini yapar. Çıkan sonuç Evrensel Seri Veriyolu (USB) gibi haberleşme protokolleriyle bilgisayara aktarılır (Carminati et al., 2012).

Bu tez çalışmasında, elde taşınabilir özellikte bir biyoalgılayıcı geliştirilmiş ve biyomoleküler etkileşimin elektrokimyasal tayinine yönelik uygulamalar

hedeflenmiştir. Bu kapsamda, buzağı timus bezinden elde edilen çift sarmal ve tek sarmal Deoksiribonükleik Asit (DNA) tayini yapılmış ve DNA'nın protein olan sığır serum albümi ile etkileşimi incelenmiştir.

Tezin 2. bölümünde elektrokimyasal sensörler ve ölçüm yöntemleri hakkında bilgi verilmektedir. Temel elektrokimyasal kavramlar ve teknikler ile ölçüm sistemlerinin çalışma prensibi bu bölümde açıklanmıştır. 3. bölümde ise bu konuların nasıl gerçekleştirildiği anlatılmıştır. Önce elektronik ölçüm sisteminin tasarımı anlatılmış, ardından geliştirilen yazılımdan bahsedilmiştir. Son olarak ise kullanılan kimyasal maddeler ve deneysel prosedürler açıklanmıştır. 4. bölümde ise 2. bölümde anlatılan teori ve 3. bölümde geliştirilen cihaz ve bahsedilen elektrokimyasal prosedürler kullanılarak gerçekleştirilen, buzağı timus bezinden elde edilen çift sarmal ve tek sarmal DNA tayinine ve ayrıca sığır serum albümin ile etkileşimlerine dair tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar kullanarak elde edilen deneysel bulgular verilmektedir. 5. bölümde ise elde edilen deney sonuçlarıyla ilgili tartışmalar bulunmaktadır. 6. bölümde ise tez kapsamında ulaşılan sonuçlar ile konu hakkındaki önerilerden bahsedilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

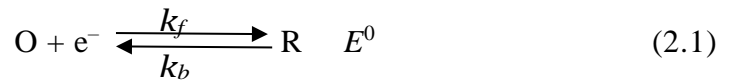
2.1. Elektrokimya

Elektrokimya, kimyasal maddelerin elektriksel tepkilerini inceleyen bilim dalıdır. Kimyasal tepkimeler sonucu meydana gelen elektriksel değişimler incelenir ve böylece meydana gelen tepkimeler hakkında bilgi edinilmiş olunur (Bard and Faulkner, 2001). Bu değişimler maddenin empedansının değişmesi (doğrusal sistemler için) veya volt-akım karakteristiğinin (doğrusal olmayan sistemler için) değişmesi şeklinde meydana gelebilir. Empedansdaki değişimler Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile incelenirken, volt-akım karakteristiğindeki değişimler voltametri veya amperometri gibi yöntemler ile incelenir.

2.1.1. Temel Prensipler

Elektrokimyasal tepkimeler temelde bir elektrot ve elektrolitin bir araya geldiği arayüzde meydana gelir. Bu arayüzde elektrot-elektrolit arasında yük transferi gerçekleşir. Yüklerin, iyonların hareketiyle taşındığı faza elektrolit denir. Bu elektrolit sıvı bir çözelti ya da erimiş tuz olabilir. Elektrolit olarak ferrosenli çözeltilerin kullanımı yaygındır (Gagne et al., 1980). Elektrot olarak ise altın, gümüş ve grafen gibi maddeler kullanılır. Elektrolit içerisinde yüklerin taşınması iyonların hareketi ile meydana gelirken elektrot yüzeyinde elektronların taşınması ile meydana gelir. Bu durumda oluşan yapıya elektriksel çift tabaka denir ve şekil 2.1c ile gösterilmiştir.

Şekil 2.1c'de oluşan tepkime denklem 2.1 ile gösterilebilir:



Burada k_f indirgenme ve k_b yükseltgenme sabitleridir. E^0 ile standart indirgenme potansiyeli ifade edilmektedir. O yükseltgenen, R ise indirgenen maddeyi ifade etmektedir. Bu durumda elektrot ile elektrolit arasında elektron alışverişi olur ve bundan dolayı bir potansiyel fark meydana gelir. Ancak bu potansiyel farkı

ölçebilmek için referans amaçlı ikinci bir elektrot daha gereklidir. Buna referans elektrot denir ve elektrokimyasal tepkisi uygulanan potansiyel altında sabit olacak şekilde seçilir. Böylece oluşan potansiyel fark $\delta V = V_{elektrot} - V_{cozelti} + X$ ile hesaplanabilir. Burada X referans elektrottan gelen sabit değerdir. Dolayısıyla bir süre sonra çözeltinin derişiminin de dengeye ulaşmasıyla oluşan potansiyeli şu şekilde yazabiliriz:

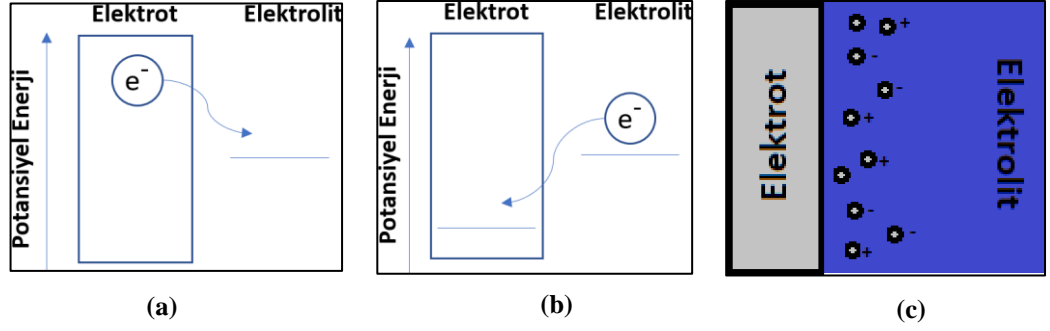
$$E_{denge} = \delta V_{arayuuz}(O/R) - \delta V_{arayuuz}(X) = \delta V_{arayuuz}(O/R) + 0 \quad (2.2)$$

Burada referans elektrodunun potansiyeli sıfır olarak varsayıldı. Bu durumda elektriksel potansiyel ile derişimin ilişkisini veren Nerst denklemi denklem 2.3 ile verilir (Elgrishi et al., 2017):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C_{yukseltgenme}]}{[C_{indirgenme}]} = E^0 + 2.3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{[C_{yukseltgenme}]}{[C_{indirgenme}]} \quad (2.3)$$

Nerst denklemi, çözeltideki konsantrasyon değişimine ya da elektrot potansiyelinin değişimine sistemin nasıl tepki vereceğini gösterir. Örneğin Dönüşümlü Voltametri (CV) sırasında potansiyel değiştikçe elektrot yakınındaki çözelti konsantrasyonu da o oranda değişir ve bu değişim Nerst denklemi ile hesaplanabilir.

Tepkimenin incelendiği elektroda çalışma elektrodu denir. Eğer şekil 2.1a'da görüldüğü gibi elektrolitin daha yüksekte ve boşta elektron seviyesi varsa, elektronlar elektrottan elektrolite geçer. Bu durumda indirgenme akımı gözlenir. Çalışma elektroduna daha yüksek potansiyel uygulandığı zaman ise elektrodun enerjisi azalır ve şekil 2.1b'de gösterildiği gibi elektrolitten elektroda yük transferi gerçekleşir. Bu durumda oksidasyon ya da yükseltgenme akımı gözlenir. Yükseltgenme akımının aktığı elektroda anot, indirgenme akımının aktığı elektroda ise katot denir.



Şekil 2.1. Elektriksel çift tabakada gerçekleşen redoks tepkimesi. (a) İndirgenme, (b) Yükseltgenme, (c) Elektriksel çift tabaka

Kimyasal reaksiyonun miktarı ile ortaya çıkan akımın büyüklüğünün orantılı olduğunu belirten ifadeye Faraday kanunu denir. Dolayısıyla yukarıda belirtilen indirgenme-yükseltgenme durumlarında oluşan akımlara “Faradayik akım” denir. Fakat bazı potansiyel değerlerinde elektron transferi mümkün olmadığında Faradayik akımlar oluşmaz. Ancak uygulanan potansiyel değişmesi, yüzey alanının değişmesi veya çözelti yoğunluğunun değişmesi gibi durumlardan ötürü Faradayik olmayan akımlar da oluşur (Bard and Faulkner, 2001). Bu faradayik olmayan akımlar geçici de olabilir ancak deneyler sırasında göz önüne alınmalıdır çünkü bu tez çalışmasında da olduğu gibi çoğu zaman deneylerde asıl istenilen sadece Faradayik akımlardır.

Elektriksel çift tabakada kütle transferi 3 yolla gerçekleşebilir (Bagotsky, 2006):

$$1. \text{ Difüzyon} \propto \frac{\partial C(x)}{\partial x}$$

$$2. \text{ Migrasyon} \propto C(x) \times E(x)$$

$$3. \text{ Konveksiyon} \propto C(x) \times v(x)$$

$C(x)$ konsantrasyon miktarını, $E(x)$ elektrik alanı ve $v(x)$ çözeltinin hızını temsil etmektedir. Difüzyon, maddelerin yüksek derişimli ortamdan düşük derişimli ortama hareketidir. Difüzyondan dolayı oluşan etki derişimin derişim hızıyla

orantılır. Migrasyon ise yüklü parçacıkların elektrik alan altındaki hareketlerinden kaynaklanmaktadır ve derişim ile elektrik alanın çarpımıyla doğru orantılır. Konveksiyon ise hareket halindeki bir çözeltide maddenin taşınmasını ifade eder ve derişim ile hızın çarpımıyla doğru orantılıdır. Buna göre kütle akışı Nerst-Planck denkleminle şu şekilde ifade edilebilir (Lambrechts, 2019):

$$J(x, t) = \overbrace{-D \frac{\delta C(x, t)}{\delta x}}^{\text{difüzyon}} - \overbrace{\frac{zF}{RT} DC(x, t) \frac{\delta \phi(x, t)}{\delta x}}^{\text{migrasyon}} + \overbrace{C(x, t) v_x(x, t)}^{\text{konveksiyon}} \quad (2.4)$$

Denklem 2.4’de F Faraday sabitini (Coulomb), J malzeme akışını ($\text{mol cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$), D difüzyon katsayısını ($\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$), C derişimi (M) ve v_x hidrodinamik hızı (cm sec^{-1}) temsil etmektedir. Eğer deneyler bu tezdeki gibi hareketsiz bir sistemde yapılıyorsa konveksiyon etkisi yok sayılabilir. Yardımcı elektrolit (örneğin tuz gibi) miktarının yüksek olduğu ortamlarda iki elektrot arasında uygulanan elektrik alan tüm iyonlar için neredeyse eşit olacağı için migrasyon etkisi de ihmal edilebilir. Ancak yardımcı elektrolit miktarının düşük olduğu ortamlarda migrasyonun etkisi önemli olmaktadır. Buna göre kütle transferini etkileyen ana etmen difüzyondur. Bu durumda oluşan akım denklem 2.5 ile verilir (Bard and Faulkner, 2001):

$$i(t) = nFAD \left. \frac{\delta C(x, t)}{\delta x} \right|_{x=0} \quad (2.5)$$

Bu prensiplere dayanarak elektrokimyasal tepkimeler genelde 4 farklı yöntemle incelenebilir:

1. Voltametri
2. Potansiyometri
3. Empedans Spektroskopisi
4. Amperometri

Voltametik yöntemlerde elektroda üçgen dalga veya benzeri dalga formları uygulanarak denklem 2.3 ile belirtildiği şekilde difüzyon gerçekleştirilir ve bunun sonucunda denklem 2.5 ile belirtilen akım elde edilir. Ve sonuçta ortaya çıkan potansiyel-akım grafiği incelenir. Potansiyometride ise iki elektrot arasındaki potansiyel, zamana bağlı olarak incelenir.

Tablo 2.1. Elektrokimyasal sensör örnekleri

Algılayıcı	Ölçüm Prensipleri	Uygulama	Referans
Kalem grafit elektrot	Voltametri, empedans	Nükleik asit sensörleri, Protein sensörleri	Erdem et al., 2014, Erdem et al., 2013
pH cam elektrot	Potansiyometri	Enzim sensörleri	Urban et al., 1992
İyon seçici elektrot	Potansiyometri	Enzim sensörleri, iyon sensörleri	Gupta et al., 2011
Yüzey baskılı elektrot	Amperometri	Glikoz sensörleri	Wang, 2008
Karbon nanotüp	Empedans	DNA-ilaç etkileşimi	Sengiz et al., 2015

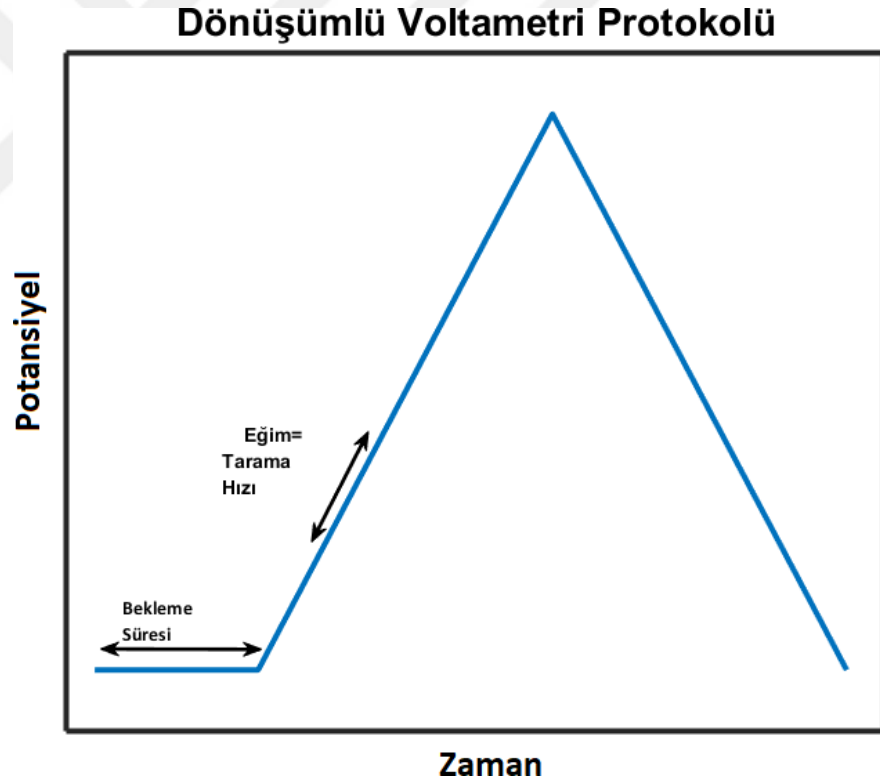
Empedans spektroskopisinde ise kimyasal tepkimeler sonucu elektrot-elektrolit arayüzünde meydana gelen değişimler kapasitör ve direnç gibi pasif elektronik devre elemanlarıyla modellenir ve bu değerlerdeki değişimler incelenir. Akım-zaman ilişkisinin incelendiği yöntemlere ise amperometri denir. Bu yöntemlerin uygulamalarına dair literatürde bulunan bazı örnekler tablo 2.1’de verilmiştir.

2.1.2. Voltametik Yöntemler

Voltametik yöntemler, sensöre elektriksel uyartım sinyali verilip oluşan akımın incelenmesine dayanır. Amperometrik yöntemler hariç olmak üzere,

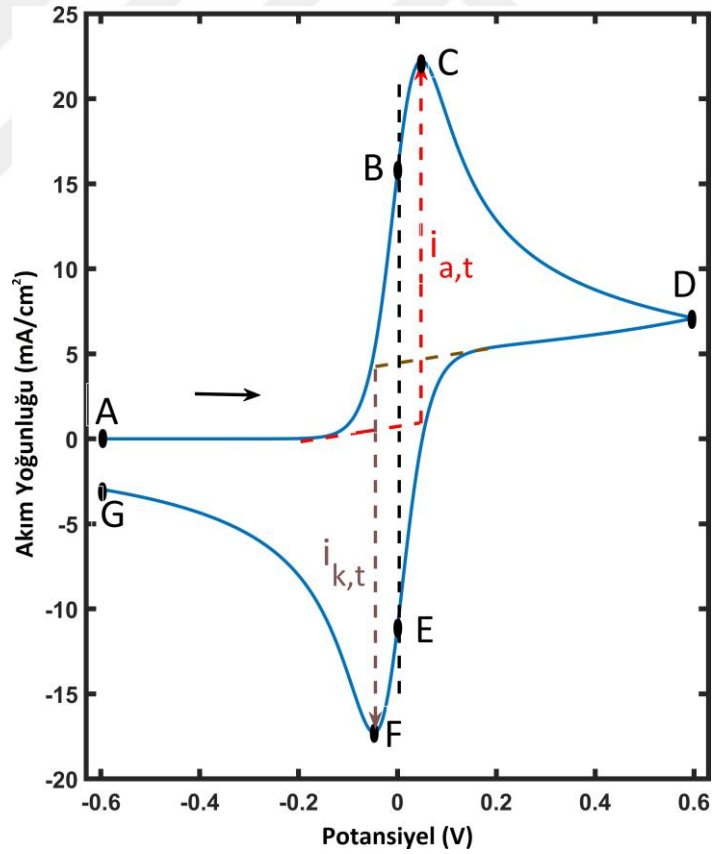
2.1.2.1. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametricide şekil 2.3’de görüldüğü gibi bir üçgen sinyal uygulanır. Bu sinyalin yükselen kenarında genelde anodik akım gözlenirken düşen kenarında katodik akım gözlenir ve elde edilen akım-potansiyel grafiği şekil 2.4’deki gibi olur. Deneye başlamadan önce durgun halde olan sensöre bir anda potansiyel uygulandığında oluşacak kapasitif akımı engelleyebilmek için öncesinde belirli bir süre beklenebilir. Ardından uygulanan potansiyel, tarama hızı ile verilen ve birimi mV/s olacak değerde doğrusal olarak artırılarak/azaltılarak değiştirilir.



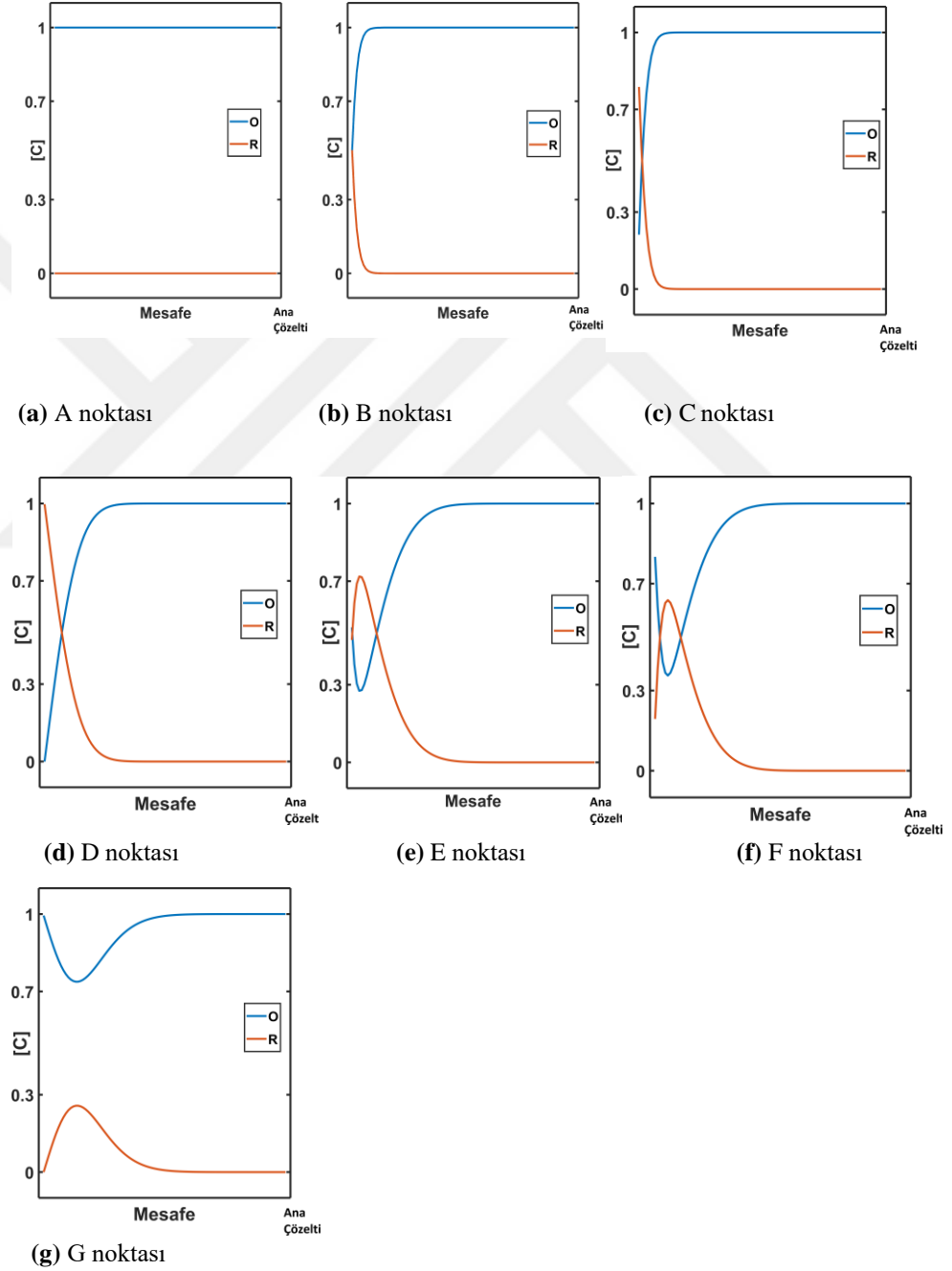
Şekil 2.3. Dönüşümlü voltametri için uygulanan uyartım sinyali. Bu deneylerde başlangıç ile tepe potansiyel değerleri arasında potansiyel doğrusal bir şekilde artırılarak taranır ve her bir gerilim noktasında sensörün akımı ölçülür. Potansiyelin artış hızı “tarama hızı” olarak tanımlanır. Başlangıçtan tepe noktasına kadar tarandıktan sonra ters yönde (tepe noktasından başlangıç noktasına) tarama işlemi başlatılır. Başlangıçtan tepe noktasına kadar olan tarama ile anodik/katodik akım ölçülürken, zıt yöndeki taramada katodik/anodik akım ölçülür.

Denklem 2.5, (Bard and Faulkner, 2001) ve (Attia, 2021) dikkate alınarak MATLAB’de yapılan simülasyonda akım-potansiyel grafiği şekil 2.4 ile gösterilen grafik elde edilmiştir. Burada tarama hızı 100 mV/s, başlangıç derişimi $C = 1 \text{ mol/cm}^3$, difüzyon katsayısı $D = 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, tarama aralığı $\pm 0, 6\text{V}$, elektrokimyasal hız sabiti $k_0 = 10^{-2} \text{ cm/s}$, kimyasal hız sabiti $k_c = 10^{-3} \text{ 1/s}$, sıcaklık $T = 298,15$, Faraday sabiti $F = 96485 \text{ C/mol}$, ideal gaz sabiti $R = 8,3145 \text{ J/mol - K}$ olarak alınmıştır. Şekil 2.4’de görülen $i_{a,t}$ ve $i_{k,t}$ akımları faradayik akımları temsil etmektedir. İlgi duyulan akımlar bunlar olduğu için diğer durumlarda oluşan kapasitif akımların devamı olacak şekilde doğrusal bir çizgi çekilerek bu değer tepe noktasındaki değerden çıkartılır ve geriye sadece faradayik akım kalır.



Şekil 2.4. Dönüşümlü voltametri simülasyonu. Potansiyel A noktasından başlanarak artırılır. D noktasından itibaren potansiyel azaltılarak G noktasında başlangıç potansiyeline dönülür. C noktasında anodik akım, F noktasında ise katodik akım tepe noktasına ulaşır. . Bu tepe noktası

Faradayik akım ile kapasitif akımın toplamından oluşmaktadır. Bu yüzden tepe akımından kapasitif akım çıkartılarak Faradayik akım bulunur. Deneye ilk başlanıldığında sadece kapasitif akım olduğu için ve bu akım değeri doğrusal bir şekilde artacağı için, başlangıç noktasından itibaren şekilde gösterdiği gibi bir doğrusal çizgi çizilir ve tepe noktasında kapasitif akımın olması gereken değer hesaplanır. Daha sonra bu değer tepe akımından çıkartılarak Faradayik akım ($i_{a,t}$ ve $i_{k,t}$) bulunmuş olunur.

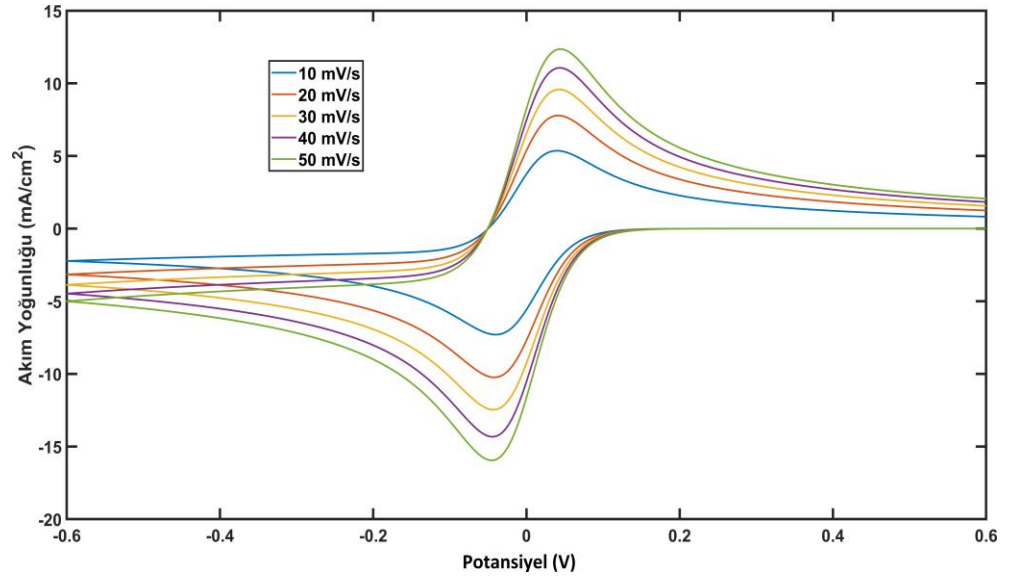


Şekil 2.5. Şekil 2.4'deki noktaların konsantrasyonun elektrot yüzeyine uzaklıkla değişim grafikleri

Şekil 2.5’de, şekil 2.4’de işaretlenen noktalarındaki derişimin değişimi gösterilmektedir. Şekil 2.5’de görüldüğü gibi *A* noktasında neredeyse hiç indirgenme tepkimesi görülmezken *B* noktasında indirgenme meydana gelmiş, dolayısıyla bir miktar madde difüze olmuştur. Burada oluşan difüzyon katmanı 10 µm gibi nispeten düşük değerlerde olabilir (Brownson and Banks, 2014). *C* noktasında maksimum akıma ulaşılır ve bu noktada difüzyon katmanı en büyük değerindedir. *D* noktasından itibaren aynı işlemler tekrar edilir ama bu sefer oluşan tepkiler ters yönde meydana gelir. Bundan dolayı eksi yönde tepe akımı okunur. *B* ve *E* noktalarında yükseltgenen ve indirgenen madde miktarları eşittir. Denklem 2.3 kullanılırsa, $C_{yükseltgenme} = C_{indirgenme}$ olduğundan $E = E^0$ olarak bulunur ve tepe noktalarının ortasına denk gelmektedir.

Tarama hızı, deneylerin ne kadar hızlı yapılacağını belirtir. Tarama hızı ne kadar yüksek olursa, difüzyon tabakası da o oranda düşük olur, bundan dolayı da daha yüksek akımlar elde edilir. Tepe akımının tarama hızıyla değişimi denklem 2.6 ile verilen Randles–Sevcik denklemi ile hesaplanır:

$$i_{tepe} = 0,446nFAC \sqrt{\frac{nFvD}{RT}} \quad (2.6)$$

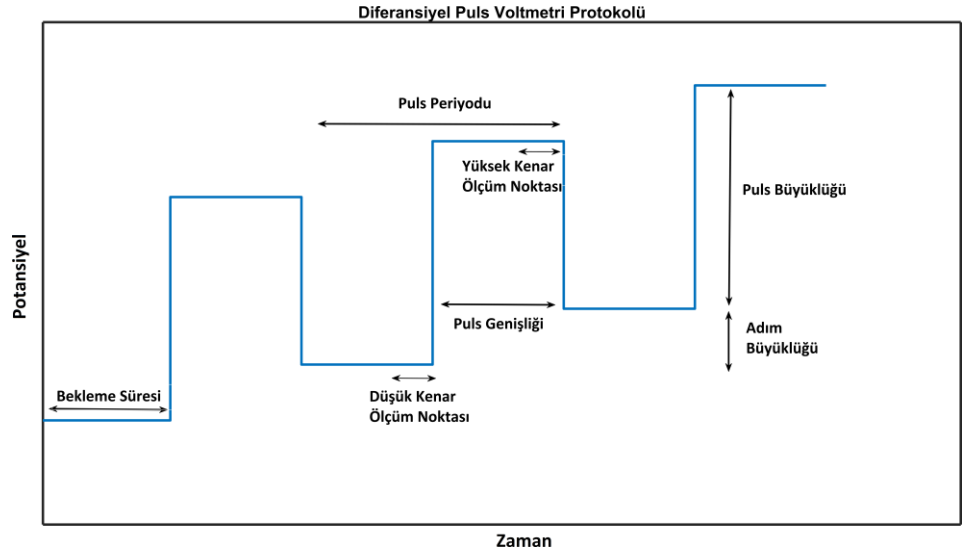


Şekil 2.6. Tarama Hızı Simülasyonu

Burada v ile tarama hızı belirtilmektedir. n tepkime sırasında taşınan elektron sayısını, A elektrodun yüzey alanını, D difüzyon katsayısını, C ise elektrottan uzakta tepkimededen etkilenmeyen elektrolitin derişimini ifade etmektedir. Buna göre tepe akımının değeri tarama hızının kareköküyle doğru orantılıdır. Şekil 2.4 için verilen sabitler kullanılarak tarama hızı 10 mV/s ile 50 mV/s arasında değıştirildiğinde oluşan voltamogramlar şekil 2.6 ile gösterilmektedir.

2.1.2.2 Diferansiyel Puls Voltametri

Dönüşümlü voltametri tekniğinde faradayik olmayan akımlar da gözükmemektedir ve bu akımlar faradayik akımların ölçülmesini kısıtlamaktadır. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) tekniğı faradayik olmayan akımların etkisini azaltmayı ve böylece duyarlılığın artırılmasını sağlar. Şekil 2.7’de bir diferansiyel puls voltametri için uyartım sinyali görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi bir DPV sinyalini puls periyodu, puls genişliği, puls büyüklüğü ve adım büyüklüğü ile tanımlayabiliriz. Dönüşümlü voltametri de olduğu gibi başlangıçta bir bekleme süresi de eklenebilir.



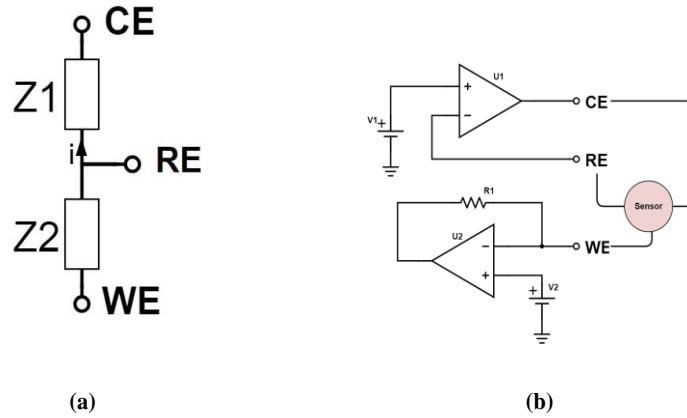
Şekil 2.7. Diferansiyel puls voltametrisinin uyartım sinyali. DPV metodunda, CV’deki gibi bir tarama yapılır. Ancak CV’den farklı olarak her bir ölçüm yapılacak potansiyelde bir puls uygulanır. Akım, pulsun yükselen ve düşen kenarından hemen önce ölçülür ve bu iki akımın farkı alınarak DPV akımı bulunur. Böylece sadece Faradayik akımın ölçülmesi amaçlanır.

Kapasitif akımlara sebep veren elektrot-elektrolit arayüzünü C kapasitesi ile

tanımlarsak, $C\delta V/\delta t = i_{kapasitor}$ olduğu için, şekil 2.7’de “Düşük Kenar Ölçüm Noktası” denilen anda, akım ölçüldükten sonra bir puls uygulandığı zaman kapasitif akım oluşur. Fakat belirli bir süre sonra kapasitif akım sönümlenir. Tam bu noktada yani “Yüksek Kenar Ölçüm Noktasında” akım tekrardan ölçülür. Puls genişliği ve periyodu kapasitif akımın sönümlenebileceği şekilde seçilir. Dolayısıyla puls büyüklüğü faradayik akım oluşturmayacak kadar küçük seçildiği sürece bu iki akımın farkı sıfır olur. Faradayik akımın olduğu noktalarda ise sadece Faradayik akım kalır. Bu sayede duyarlılığı çok daha yüksek deneyler yapılabilir (Skoog et al., 2017).

2.1.3. Potansiyostat

Önceki bölümlerde anlatılan elektrokimyasal deneyleri yapabilmeyi sağlayan cihaza potansiyostat denilmektedir. İlk olarak 1952 yılında Hans Wenking ve ekibi geliştirmiştir (Doelling, 2000). Bölüm 2.1’de de anlatıldığı gibi, voltametrik deneyleri gerçekleştirebilmek için Çalışma Elektrodu (WE) ile Referans Elektrodu (RE) arasına istenilen değerde sabit kalan bir potansiyel uygulanmalıdır.



Şekil 2.8. Potansiyostatik kontrol sistemi. Sensör (a)’da görüldüğü gibi modellenebilir. V1 gerilimi ile RE değeri kontrol edilir. Referans elektrot tamponlandığı için üzerinden akım akmaz ve gerilimi hep V1 olarak kalır. CE, RE’yi V1 değerinde tutmak için gerekli olan akımı sağlar. Bu akım WE üzerinden geçerek gerileme dönüştürülür. Sensöre uygulanan gerilim, V2-V1 değeri ile belirlenir. (a) Sensörün eşdeğer devresi, (b) Geri-besleme devresi.

Fakat referans elektrodunun elektrokimyasal karakteristiğinin değişmemesi için

üzerinden akım geçmemesi gerekmektedir. Bundan dolayı referans elektrodunu istenilen potansiyelde tutması için gerekli akımı sağlayacak bir geribesleme devresine ihtiyaç duyulur. Bu geribesleme devresinde çıkış akımını sağlayan elektroda Yardımcı Elektrot (CE) denir. Şekil 2.8b’de bu devre gösterilmektedir. Şekil 2.8a’da sensörün eşdeğer devresi görülmektedir.

Tablo 2.2. Literatürdeki Örnek Potansiyostatlar

Elektrokimyasal Yöntemler	Akım Aralığı	Çözünürlük (bit)	Tarama Aralığı (mV)	Bant-genişliği (kHz)	Referans
CV, DPV, Amperometri	$\pm 100 \mu\text{A}$	16	± 1000	1	Gu et al., 2018
Amperometri	$\pm 10 \text{ pA}$	16	± 2000	5	Vergani et al., 2012
Potansiyometri, Amperometri	Belirtilmemiş	12	-300/+200	Belirtilmemiş	Jalal et al., 2017
Potansiyometri, Amperometri, Voltametri	$\pm 200 \mu\text{A}$	16	Belirtilmemiş	1-100	Sun et al., 2014
Amperometri	$\pm 103 \mu\text{A}$	12	± 1650	Belirtilmemiş	Hu et al., 2016

Şekil 2.8’de görüldüğü gibi, V_1 gerilimi uygulandığı zaman RE gerilimi de V_1 olur ve CE değeri de bunu gerçekleştirmek için gerekli akımı sağlar. U_2 opampıyla gösterilen devrede ise, WE gerilimi V_2 değerinde olur ve WE ’den geçen akım RI direnci üzerinden geçerek opampın çıkışında gerilime dönüşür. Tablo 2.2, literatürdeki biyosensör uygulamaları için geliştirilen bazı potansiyostatları göstermektedir.

2.1.4. Elektrotlar

Voltametrik sensörlerde genelde üçlü elektrot sistemi kullanılır. Bu elektrotların çalışma prensipleri bir önceki bölümünde anlatılmıştır.

2.1.4.1. Referans Elektrot

Referans elektrodun görevi deneyler için standart olacak bir potansiyel oluşturmak olduğundan dolayı, bu elektrotlar çevresel dürtülerden etkilenmeyen ve çözüldüğü ortamdan bağımsız sabit potansiyelde bulunan malzemelerden seçilirler. Standart olarak kullanıldıklarından dolayı üzerinden akım akmaması gerekmektedir. Standart hidrojen elektrot, kalomel elektrot, gümüş-gümüş klorür elektrotları referans elektrotlara örnektir.

2.1.4.2. Yardımcı Elektrot

Yardımcı elektrot, çalışma elektrodu ile referans elektrodu arasında belirli bir potansiyelde tutmak için gerekli olan akımı sağlar. Bundan dolayı platin tel gibi iletkenler kullanılır.

2.1.4.3. Çalışma Elektrodu

Deneyler sırasında, referans elektrodunun üzerinden akım akmadığı için, sensörün neden olduğu akım çalışma elektrodu üzerinden geçer ve ardından potansiyostat ile okunur. Analit ile tepkimeye giren elektrottur, bu yüzden özellikleri sensörden sensöre farklılıklar gösterebilir. Örneğin çalışma aralıkları ortamın pH'sına, analit türüne ve elektrot türüne göre farklılık gösterebilir. Karbon pasta elektrodu, camsi karbon elektrot, kalem grafit elektrot, yüzey baskılı elektrot, civa elektrodu veya platin ve altın gibi metal elektrotlar kullanılabilir.

2.1.4.4. Kalem Grafit Elektrot (KGE)

Bu çalışmada çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrotlar kullanıldı. Kalem grafit elektrotların kolay ulaşılabilir olmaları, ucuz olmaları ve mekanik olarak dirençli olmaları gibi avantajları vardır (Pandey et al., 2020). Ayrıca düşük toksisite, tek kullanımlılık ve aynı kalitede tekrar üretilebilme gibi özellikleri elektrokimyasal sensörlerde kullanılmalarını cazip kılmaktadır (Congur et al., 2015; Erdem et al., 2019).

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler, maddelerin biyolojik özelliklerini spesifik olarak algılamaya yarayan analitik cihazlardır. Bir reaksiyondaki analitin kimyasal ya da biyolojik tepkimesi sonucu oluşan sinyal ölçülerek analitin konsantrasyonu hakkında bilgi edinilmesini sağlarlar. Bundan dolayı tıbbi teşhis, ilaç geliştirme, gıda prosesleri ve güvenliği, doğa izleme, savunma ve güvenlik gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar (Turner, 2013).

Biyosensörleri oluşturan 3 komponent bulunmaktadır: (1) biyoreseptör, (2) transdüser ve (3) elektronik sistem. Biyoreseptörün amacı ölçülecek analite yüksek seçicilik sağlamaktır. Biyoreseptörlere örnek olarak antikor-antijen etkileşimi, nükleik asit etkileşimleri ve enzimatik etkileşimler verilebilir. Transdüser ise bu durumda oluşan değişimin elektrik sinyaline dönüşmesini sağlar. Bu değişim elektrokimyasal, optik, kütle değişimi ya da kalorimetrik yollarla olabilir. Elektronik sistem ise transdüser ile elde edilen elektrik sinyalini ölçer ve madde miktarı ile ilişkilendirir (Karunakaran et al., 2015).

Biyosensörler alanındaki ilk önemli çalışmaları, kandaki oksijen miktarını belirlemeye yönelik çalışmalarıyla Leland C. Clark gerçekleştirmiştir (Renneberg et al., 2007). Yine Clark, 1962 yılında amperometrik glikoz sensörünü geliştirmiştir. Ardından günümüze kadar elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve akustik gibi çeşitli yöntemlerle biyosensörler geliştirilmiştir. Tablo 2.3'de çeşitli biyosensörler ve ölçüm yöntemleri gösterilmektedir.

Tablo 2-3: Çeşitli Ölçüm Yöntemleri

Analit	Ölçüm Prensipleri	Referans
Glikoz	Elektrokimyasal (amperometrik)	Palmisano et al., 2002
Kanser Biyobelirteçleri	Optik (yüzey plazmon rezonansı)	Liang et al., 2015

Salmonella Typhimurium	Kütle (Quartz mikrobalsans)	Fulgione et al., 2018
Francisella Tularensis	Piezoelektrik	Pohanka and Skladal, 2007

Biyosensörlerin sahip olması gereken birtakım özellikleri vardır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir (Bhalla et al., 2016):

1. **Seçicilik:** Bir biyosensörün, farklı analitlerin de olduğu bir ortamda spesifik bir analite özgü tepki verebilme özelliğidir. Bundan dolayı da biyosensörlerin en önemli özelliklerindedir.
2. **Tekrarlanabilirlik:** Biyosensörün aynı şartlar altında aynı tepkiyi verebilmesidir.
3. **Kararlılık:** Dışarıdan gelen bozucu etkilerin biyosensörün çalışmasını etkileme miktarıdır.
4. **Duyarlılık:** Analitin ölçülebilecek minimum miktarını belirtir.
5. **Doğrusallık:** Farklı konantrasyonlarda ölçülen analit miktarının $y=mx+c$ gibi doğrusal bir denklemlle ifade edilebilmesidir.

2.3. Nükleik Asitler

Nükleoitidler, 3 temel komponentten oluşan ve DNA gibi nükleik asitlerin temel yapı taşı olan kimyasal bileşiklerdir. Bir nükleotid, azot içeren baz, pentoz (beş karbonlu şeker) ve bir ya da daha fazla fosfattan meydana gelir. Nükleotidi oluşturan azotlu bazın primidin ve purin olmak üzere iki türü vardır. Adenin ve guanin bazları purinleri oluştururken, sitozin, timin ve urasil bazları primidinleri oluşturur (Cox and Nelson, 2017).

Nükleik asitler ise nükleoitidlerin bir pentozun 5'-hidroksil grubu ile 3'-hidroksilin fosfodiester bağlarıyla bağlanmasıyla oluşur. İki çeşit nükleik asit vardır: RNA ve DNA. Hem DNA hem de RNA adenin ve guanin barındırır. Farklı olarak RNA'daki nükleoitidler riboz barındırır ve urasil ile sitozin gibi bazlara sahiptirler. DNA'daki nükleoitidler ise deoksiriboz barındırır ve timin ile sitozin gibi bazlara sahiptirler DNA'nın yapısı 1953 yılında Watson ve Crick tarafından Rosalind Franklin'in x-ray kristalografisi ile elde ettiği sonuçlar da kullanılarak açıklanmıştır (Cox and Nelson, 2017). Buna göre DNA çift sarmal şeklindedir ve sarmallar birbirini tamamlar yapıdadır. Bu yüzden adenin ile timin sayısı, guanin ile de sitozin sayısı aynı miktardadır. Adenin ve timin bazları arasında çiftli bağ, guanin ve sitozin bazları arasında üçlü bağ bulunur. Ancak 7,0 pH ve 25°C'de viskoz halde bulunan DNA, çok yüksek pH değerlerinde ya da 80°C gibi yüksek sıcaklıklarda tutulursa DNA'nın viskoz hali bozulur ve erimeye başlar. Bunun sonucunda da tek sarmallı DNA elde edilir (Cox and Nelson, 2017). DNA'nın duplikasyon ve transkripsiyon olmak üzere iki görevi vardır. DNA'nın kendini eşlemesi olayına duplikasyon denirken, kendindeki bilgileri RNA'ya aktarması olayına transkripsiyon denir (Kari et al., 2001).

2.4. Proteinler

Proteinler, hücrede yer alan neredeyse tüm işlemlere etki ederler. Örneğin genetik bilginin eksprese edilmesinde yer alırlar, hücredeki kimyasal reaksiyonların kolayca gerçekleşebilmesi için enzim olarak çalışırlar, enerji elde etme ve enerjiyi dönüştürme gibi işlevlerde bulunurlar.

Proteinler amino asitlerin polimerleridir. Tüm organizmalardaki proteinler 20 çeşit amino asitten meydana gelir. Protein üretmek için bu 20 çeşit amino asit zincir şeklinde bağlanırlar. Sadece bu 20 çeşit amino asitin farklı kombinasyonlarda dizilmesiyle çok çeşitli enzim, hormon, antibiyotik, antikor vb. maddeler üretilir. Hücrelerde genelde binlerce farklı protein bulunur ve her biri farklı bir biyolojik aktivitede yer alır. Proteinlerin fonksiyonlarındaki bu farklar kendilerini oluşturan amino asitlerin farklı dizilişlerinden kaynaklanır. Örneğin bazı büyük proteinler 4500 amino asitten oluşabilir. Bu büyüklükte bir protein 20^{4500} farklı dizilişe sahip

olabilir (Hunter, 1993).

Proteinler aynı zamanda kendilerine has üç boyutlu yapıya sahiptirler. Bu da kendilerine özel kimyasal yapıya sahip olmalarını sağlar. Ancak bir proteinin üç boyutlu yapısı sabit değildir, birçok protein kısıtlı da olsa hareket edebilir. Bu da biyokimyasal özelliklerinde önemli değişikliklere sebep olur. Ayrıca bazı proteinler, atom gruplarıyla birleşerek aktifleşmelerini sağlayabilir. Mesela “heme” grubu, hemoglobin proteinine oksijenin bağlanmasını sağlar.

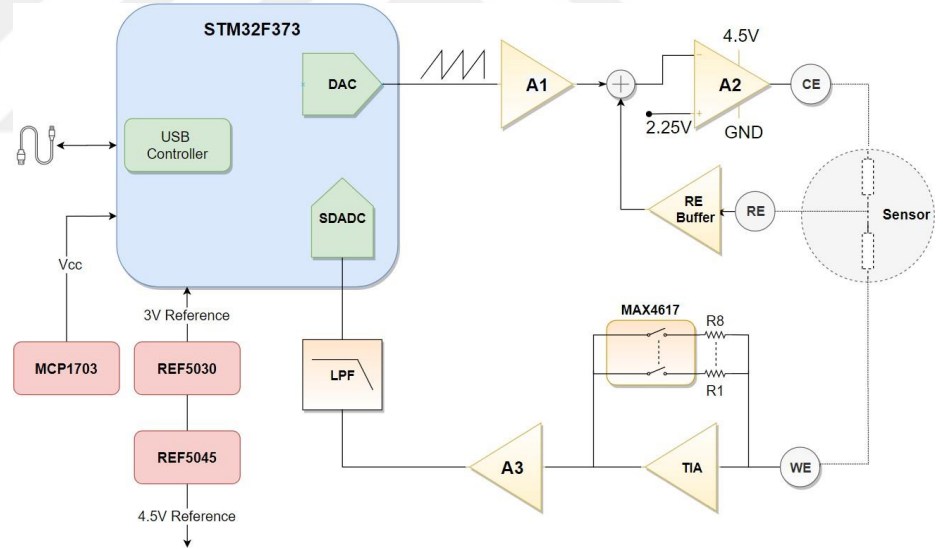
Amino asitler, merkezinde bir karbon atomu, bir ucunda amino grubu (NH_3), diğer ucunda karboksil grubu ($COOH$) ve bir de değişebilen bir yan zincirden (R) oluşurlar. Proteinler ise 4 yapıdan oluşur: primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapı. Primer yapı, amino asit zincirlerinden meydana gelir. Sekonder yapı ise hidrojen bağlarıyla stabilize edilmiş, tekrarlayan amino asit dizilerinden oluşur. Tersiyer yapı ise polipeptit zincirlerinin oluşturduğu üç boyutlu yapıdır. Polipeptitler uzun amino asit zincirlerine denir. Tüm bu yapıların bir araya gelip oluşturduğu daha büyük yapılara ise kuaterner yapı denir (Voet et al., 2016).

Bu çalışmada protein olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA vücut sıvısında ve dokularında bolca bulunan asidik bir protein grubudur. 583 amino asit zincirinden oluşur. BSA antikorların fonksiyonelliğini ve yaşam süresini artırır ve protein analizinde standart olarak kullanılır. Bunların yanında sığır kanından da bolca elde edilebildiğinden araştırmalarda tercih edilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Enstrümantasyon

Yapılan deneylerde bölüm 2.1.3'te anlatılan yöntemleri gerçekleştirebilmek ve bölüm 2.1.4'te anlatılan potansiyostatik kontrolü gerçekleştirebilmek için 1 nA-1 mA aralığında akım ölçebilen bir transepedans devresine ve ± 2 V aralığında üçgen dalga ve üçgen dalganın üzerine bindirilmiş kare dalga üretebilen gerilim üreticiye ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu sinyallerin işlenmesi için Analog-Dijital Dönüştürücü (ADC) ve mikroişlemci yapıları gerekmektedir. Bu bölümde bu işlemleri gerçekleştirebilmek için gerekli olan elektronik enstrümantasyon konusu anlatılmıştır. Şekil 3.1'de sistemin blok diyagramı gösterilmektedir. Son bölümde ise üretilen elektronik kart devresi gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Sistemin blok diyagramı. STM32F373: Dahili 16-bit ADC, 12-bit DAC ve USB kontrolcüsü barındıran ARM M4 mimarisine sahip mikrodenetleyici; MAX4617: Transepedans devresinde I/V kazanç değerini seçmek için kullanılan 8:1 kanallı analog anahtar; A1: 1,5 kazanç değerine sahip op-amp, RE buffer: Referans elektrot için tampon op-amp; A2: Çalışma elektrodunu süren op-amp; TIA: Transepedans yükseltici; A3: 2/3 kazanç değerine sahip ADC sürücüsü; REF5045: 4,5 V referans voltajı; REF5030: Mikrodenetleyicinin analog birimlerini beslemek için 3,0 V referans voltajı; MCP1703: Dijital devreler için 3,3 V voltaj regülatörü; LPF: Alçak geçiren RC filtre.

Gu et al., 2018, benzer bir mimari kullanarak Cd^{2+} ve Pb^{2+} tayini yapmışlardır. Fakat bu çalışmalarında 1 kHz kesim frekanslı alçak geçiren analog filtre kullanılmıştır. Bundan dolayı özellikle DPV deneylerinde uygulanan sinyalin şekli kısıtlanmaktadır. Bu çalışmada ise analog filtre yerine dijital filtre kullanılmıştır. Ayrıca ± 1 V tarama aralığına sahiptir. Bu çalışmada ise 1,2 V gibi değerlere kadar tarama yapıldığından, geliştirilen cihaz USB beslemesinin tüm aralığını kapsayacak şekilde $\pm 2,00$ V tarama aralığına sahiptir. Ayrıca bahsi geçen çalışmada sadece ± 100 μA akım aralığı okunabilmektedir. Bu tezde geliştirilen cihaz ile 10 mA- 0.2 μA arasında 8 farklı akım ayarında okuma yapılabilinmektedir. Her bir akım ayarında 16 bitlik çözünürlükte ölçüm yapılıyor. Bu özellikler de DNA ve protein sensörleri gibi çok düşük değerlerde akım üreten ve geniş gerilim aralığında çalışan sensörler için önemli olmaktadır (Erdem et al., 2014; Eksin et al., 20019; Eksin et al., 2017; Crescentini et al., 2014).

Ayrıca Cruz et al., 2014, LMP91000 entegre devresini kullanarak dönüşümlü voltmetri deneylerini yapabilen minyatür bir sistem geliştirmişlerdir. Ancak LMP91000 entegresinde verilebilecek gerilimler referans geriliminin $\pm \%24$ 'ü ile sınırlı olduğu için bu durum tarama aralığını ve akım çözünürlüğünü kısıtlamaktadır. Örneğin 5 V referans gerilimi ile en fazla $\pm 1,2$ V arasında ve 100 mV adım ile tarama yapılabilir. Ve bu çalışmada olduğu gibi diferansiyel puls voltmetrisi kullanıldı zaman akım çözünürlüğü de oldukça düşmekte ve bu durum tayin sınırını etkilemektedir.

3.1.1. Güç Devresi

Deneylerde ± 2 V arası tarama yapabilmek için 5V çıkış veren USB portu güç beslemesi olarak kullanılmıştır. Ancak USB portundan gelen birçok gürültü olabileceği için (şebeke gürültüsü, anahtarlama gürültüsü), Dijital-Analog Dönüştürücü (DAC) ve ADC gibi kritik birimleri beslemek için regülatör ve voltaj referansları kullanılmıştır.

İşlemciyi beslemek için 3,3 V çıkış veren MCP1703 doğrusal gerilim regülatörü kullanıldı. Bu regülatör sadece işlemcinin dijital birimlerini beslemek için

kullanıldı. Geri dönüş akımının analog birimlerden geçerek gürültü yaratmasını engellemek amacıyla toprak bağlantısı tek bir noktada birleştirildi. Aksi takdirde dijital devrenin yüksek frekanslı anahtarlamalarından kaynaklanan akım ve devredeki akım ve bakır yolların kaçak indüktansının yarattığı gürültü, ölçümlerin hassasiyetini etkileyebilir. Bundan dolayı PCB (baskı devre kartı) 4 katlı tasarlandı ve orta katmanlardan biri tamamen toprak hattına bağlandı.

Besleme pinlerine veri sayfalarında önerilen tantal ve/veya seramik yangeçit kapasitörleri (bypass kapasitörleri) eklenmiştir. Seramik kapasitörler yönsüz olması, küçük olması, düşük ESR (equivalent series resistance-eşdeğer seri direnç) değerine sahip olması, nispeten daha yüksek gerilim değerlerine dayanabilmesi gibi özelliklerine rağmen yüksek değerlerde üretilmesi zor ve maliyetlidir. Bu yüzden ya tantal kapasitörler kullanılır ya da MLCC (multilayer ceramic capacitor) teknolojisi ile üretilmiş seramik kapasitörler kullanılır. Bu çalışmada her bir entegre için veri sayfasında önerilen tipte malzemeler kullanılmıştır. Ancak kapasitörler her frekansta ideal davranmamaktadırlar ve frekans tepkileri farklı olmaktadır. Belirli frekans değerinden sonra empedans değerleri istenilenin aksine artmaktadır. Ve düşük frekanslarda tantal kapasitörün empedansı daha düşük olurken, 5 MHz ve yukarısı için seramik kapasitörler daha etkili olmaktadır. Bu yüzden gürültü oluşması beklenen her bir frekans bölgesi için ayrı bir bypass kapasitörü kullanıldı ve hepsi paralel olarak bağlandı.

STM32'de kullanılan ADC ve DAC birimleri maksimum V_{cc} değerlerini alabildiği için bu değere en yakın olan 3 V çıkışlı, band-gap mimarili REF5030 gerilim referansı kullanılmıştır. Sıcaklıkla değişimi 3 ppm/°C, çıkış gürültüsü $3 \mu V_{pp}/V$ ve doğruluğu %0,05'tir. Çıkış akımı olarak maksimum 10 mA sağlayabilmektedir. Sadece DAC ve ADC birimleri beslendiği için bu akım değeri yeterli gelmektedir.

Op-amp'ları beslemek için ise aynı referans entegresinin 4,5 V çıkış veren REF5045 versiyonu kullanılmıştır. Bu referans çıkışı tamponlandıktan sonra opamp'ları beslemek için kullanılmıştır. Ayrıca gerilim bölücü kullanılarak çalışma elektroduna 2,25 V verilmesi sağlanmıştır.

3.1.2. Mikrodenetleyici

Sinyal üretmek, okumak ve işlemek için bir mikro bilgisayar birimine ihtiyaç duyulmuştur. Bunun için STMicroelectronics firmasının STM32F373 mikrodenetleyicisi kullanılmıştır. Bu mikrodenetleyici şu sebeplerden dolayı seçilmiştir:

1. 1 tane 12 bit, saniyede 1 milyon örnek oluşturabilen DAC bulundurması: 3 V referans ile beslendiğinde 1 LSB değeri $\frac{3000 \text{ mV}}{4096} = 0.732 \text{ mV}$ 'a denk gelmektedir. Bu çalışmada ise 1 mV çözünürlük gerekmektedir. Ayrıca ileride daha küçük gerilim uygulanmak istendiğinde her iki DAC gerilim bölücü yapısında bağlanarak 20 bit gibi yüksek çözünürlüğe ulaşılabilmektedir.
2. 3 tane 16-bit 50 kSPS Sigma-Delta ADC bulundurması: 3 V referans ile beslendiğinde 1 LSB $\frac{3 \cdot 10^6 \mu\text{V}}{2^{15}} \approx 90 \mu\text{V}$ olmaktadır. Transimpedans devresinde $10 \text{ M}\Omega$ kazanç direnci bulunduğu zaman okunabilecek minimum akım $I_{min} = \frac{90 \mu\text{V}}{10 \text{ M}\Omega} \times 2/3 = 6 \text{ pA}$ olur. Bu da biyosensör ölçümleri için fazlasıyla yeterli çözünürlük oluşturmaktadır.
3. Dahili USB kontrolcüsü: Ana bilgisayar ile iletişimde bulunmak için USB kontrolcüsüne ihtiyaç duyulmaktadır. Bu mikrodenetleyicinin içinde dahili olarak USB kontrolcüsü bulunmaktadır.

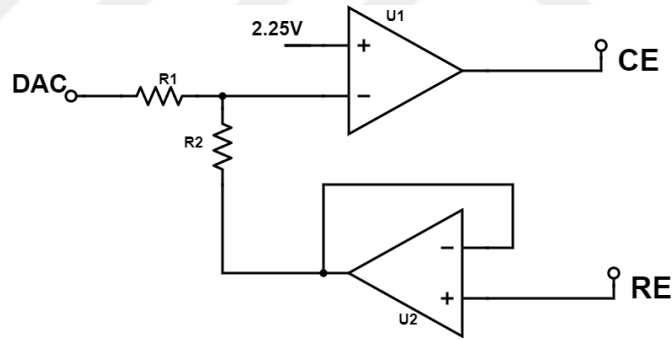
Bu üç özellik sistemin küçülmesi ve maliyetinin azalması yönünden çok önemli. Bu birimler harici olarak kullanılsaydı maliyet çok daha fazla olacaktı. Karşılığında DAC ve ADC'lerin performansının daha iyi olacağı öngörülse de bu birimler ileriki bölümlerde anlatılan çeşitli tekniklerle kalibre edilerek istenilen performansta çalışmaları sağlanmıştır.

3.1.3. Sinyal Üretici

Uyartım sinyalini üretmek için mikrodenetleyicinin 12 bitlik DAC'si kullanıldı. Ancak DAC'nin referans gerilimi 3 V olduğu için, DAC çıkışı opamp kullanılarak 1,5 katına çıkartıldı ve böylece 0-4,5V arasında sinyal üretilmesi sağlanmıştır.

3.1.4. Potansiyostatik Kontrol Devresi

Geri besleme devresi şekil 3.2'de gösterilmektedir. Referans elektrodunun empedansı yüksek olduğundan ve üzerinden akım akmaması gerektiğinden önce tamponlanmış ardından DAC sinyali ile negatif geribesleme devresini tamamlamıştır. Çalışma elektrodu ise referans elektrodunu istenilen gerilimde tutmak için gerekli olan sinyali sağlamaktadır.



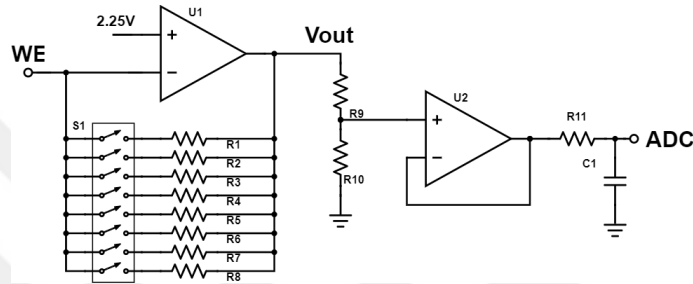
Şekil 3.2. Geribesleme devresi. Referans elektrot üzerinden akım akmaması istendiği için tampon devresiyle geribesleme sağlanıyor. Karşıt elektrot (CE) ise RE'nin istenilen değerde olması için gerekli akımı sağlıyor.

3.1.5. Transempedans Yükseltici

Deneylerde 1 nA'den 1 mA'e geniş bir aralıkta ölçümlerin yapılması gerekmektedir. Bundan dolayı şekil 3.3'de gösterilen transempedans devresi tasarlanmıştır. Buna göre;

$$V_{out} = 2,25 V \pm I_{sensor} \cdot R_{gain} \quad (3.1)$$

olur. En düşük direnç olarak $R_1=220\Omega$ kullanılırsa, bu durumda $I_{max} = \pm \frac{4,5V-2,5V}{220\Omega} \approx \pm 10,22mA$ olur. Bu kazançtaki akım çözünürlüğü ise $I_{1LSB} = \frac{\left(\frac{3000mV}{2^{15}}\right)}{220\Omega} \approx 416nA$ eder. Daha düşük ölçümler için $R_8=10M\Omega$ olarak ayarlanırsa, bu durumda $I_{max} = \pm \frac{2,25V}{10M\Omega} \approx \pm 2,25\mu A$ olur. Bu kazançtaki akım çözünürlüğü ise $I_{1LSB} = \frac{\left(\frac{3000mV}{2^{15}}\right)}{10M\Omega} * 2/3 \approx 6pA$ eder.



Şekil 3.3. Transimpedans (TIA) ve ADC devresi. TIA devresinde 8 farklı akım aralığı için 8:1 kanallı analog anahtar kullanıldı. ADC'nin maksimum gerilimi 3 V ve sensörün maksimum gerilimi 4,5 V olabileceği için, TIA çıkışı 2/3 oranındaki gerilim bölücünün ardından tamponlanıyor. ADC önündeki RC filtre hem örtüşmeyi engellemek amaçlı hem de ADC çevrimi sırasında yük sağlamak amaçlı kullanılıyor.

3.1.6. Analog-Dijital Dönüştürücü

ADC'de kullanılan sigma-delta mimarisinde dönüşüm sırasında anahtarlama gürültüleri oluşmaktadır. Ayrıca ADC'nin içindeki örnekleme kapasitörüne yük sağlaması için, yük deposu amacıyla kullanılacak bir kapasitöre ihtiyaç vardır. Fakat bu kapasitörü direkt olarak opamp çıkışına koymak opamp'ın salınım yapmasına sebep olmaktadır. Bundan dolayı araya bir direnç konulmuştur. Ayrıca ADC'nin maksimum hızı 50 ksp/s olduğu için, Nyquist teoremi gereğince okunabilecek en yüksek frekans 25 kHz olabilir. Bu RC devresi aynı zamanda yüksek frekanslı sinyalleri filtreleyerek örtüşmeyi (aliasing) de engellemektedir. Şekil 3.3'de ADC devresi görülmektedir. ADC'nin çalışma akımından ve kullanılan dirençlerin toleransından kaynaklanan hatalar ölçülerek yazılımsal olarak kalibre edilmiştir.

3.1.7. Baskı Devre Kartı

Devre serimi Autodesk EAGLE CAD (Kaliforniya, A.B.D.) programı ile 4 katmanlı olarak hazırlandı. Üst ve alt katmanlar sinyaller için, ortadaki katmanlar ise güç ve toprak için kullanıldı. Üretimi ve dizgisi yapılmış cihaz şekil 3.4 ile gösterilmektedir. Devrenin toplam boyutu 39 mm x 62 mm'dir. Gerber dosyası hazırlanan kartların üretimi JLCPCB (Shenzhen, Çin) firmasında yapıldı.



Şekil 3.4. Baskı devre serimi ve üretimi yapılmış 39 mm x 62 mm boyutundaki devre.

3.2. Yazılım

Yazılım kısmı iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde mikrodnetleyici için olan gömülü yazılım kısmı anlatılmıştır. İkinci bölümde ise masaüstü uygulaması anlatılmıştır.

3.2.1. Gömülü Yazılım

Mikrodnetleyici yazılımı Atollic TrueStudio programı kullanılarak C dilinde geliştirildi. Başlangıç kodlarını oluşturmak için STM32CubeMX programından faydalanıldı.

3.2.1.1. Kalibrasyon

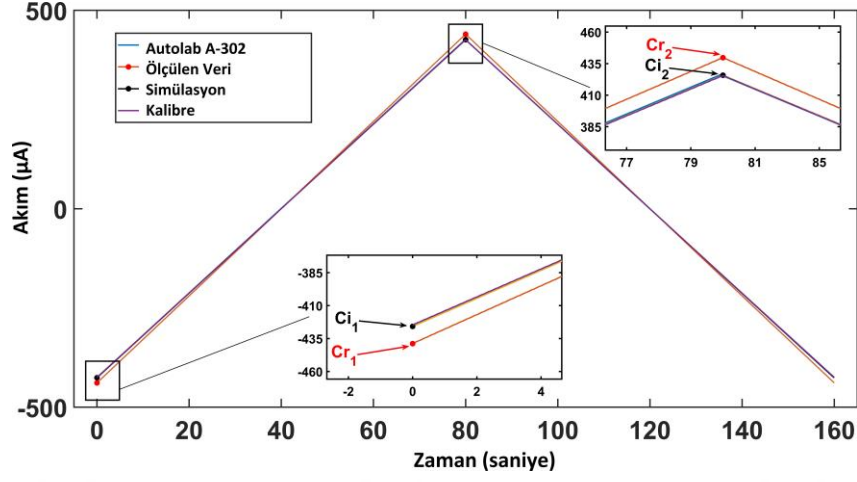
ADC ve DAC devrelerinde ölçüm sonuçlarında kaymaya yol açacak bir çok hata kaynağı bulunmaktadır. Örneğin ADC'nin çalışma akımının, örtüşme filtresinin direnci üzerinden akmasından dolayı şekil 3.3'de görülen ($R_{11} \times I_{ADC}$) miktarınca değerinde sapma olacaktır. Ayrıca DAC çıkışı 1,5 katına çıkartılırken ve TIA çıkışı 1,5 kat düşürülürken kullanılan dirençlerin toleransından dolayı da yazılımda hesaplanan değerler ile gerçekte oluşan değerler arasında fark oluşacaktır. Bundan dolayı oluşan değerler ADC ve multimetre kullanılarak ölçüldü ve mikrodenetleyicinin hafızasına kaydedildi. Böylece her işlem sırasında bu kalibrasyon değerleri de hesaba katılarak hesaplamalar yapıldı. Şekil 3.5, ADC'nin kazanç hatası (gain error) grafiğini göstermektedir. Grafikte de görüldüğü üzere, yapılan okumalarda ideal durumdakine göre sabit bir oranda sapma meydana gelmektedir. Buna kazanç hatası denilmektedir ve şu formülle hesaplanmaktadır:

$$Kazanc\ hatasi(KE) = \frac{C_{r2}-C_{r1}}{C_{i2}-C_{i1}} \quad (3.2)$$

Bu durumu kalibre etmek için, 6 ½ basamaklı dijital bir hassas multimetre (34461A, Keysight) kullanılarak bir direncin değeri 4,697 KΩ olarak ölçüldü. Ardından CV deneyi yapılarak ideal değerden hangi oranda saptığı denklem 3.2 ile hesaplandı. Buna göre KE değeri %3,23 olarak bulundu. Bu durumda ölçülen her bir ADC değerini kalibre etmek için şu denklem kullanıldı:

$$ADC_{kalibre} = \frac{ADC_{raw}-offset}{KE} \quad (3.2)$$

Burada ADC_{raw} ile kalibre edilmemiş ADC değeri belirtilmektedir. Offset ise hiçbir yük yok iken RE ile WE arasında ölçülen gerilim değerini ifade etmektedir. $ADC_{kalibre}$ ise kalibre edilmiş ADC değerini ifade etmektedir.



Şekil 3.5. Kalibrasyon eğrisi. Ci_1 = hesaplanan başlangıç değeri; Cr_1 = ölçülen başlangıç değeri; Ci_2 = hesaplanan bitiş değeri; Cr_2 = ölçülen bitiş değeri.

Şekil 3.5, idealde çıkması gereken grafiği, ölçülen ve kalibre edilen veriyi ve Autolab A-302 cihazı ile kıyaslama amacıyla yapılan ölçüm sonuçlarını göstermektedir.

3.2.1.2. Veri protokolü

Mikrodenetleyiciden bilgisayara toplamda 9 byte veri gönderilmektedir. Ölçüm sonucu “float” tipinde tutulduğundan, float veri tipi “union” yapısı altında 4 byte’lık paketlere bölünüp gönderilmiştir. Ardından bilgisayarda aynı şekilde bir union yapısı ile tekrardan float’a çevrilmiştir.

Kod 3.1: Float-uint8t dönüşümü

```
union {
float fval;
uint8_t
bval[4];
}
data_to_send;
```

Bilgisayara gönderilen veriler kod 3.2’de görülmektedir.

Kod 3.2: Veri protokolü

```

uint8_t buffer[] = {
    method, // elektrokimyasal protokolun ID'si

    channel,

    (bias) & 0xff, // 12bit DAC'nin ilk
    byte'i (bias >> 8) & 0xff, // 12bit
    DAC'nin2.byte'i
    data_to_send.bval[0], // float data
    1.byte data_to_send.bval[1], //
    float data 2.byte
    data_to_send.bval[2], // float data
    3.byte data_to_send.bval[3], //
    float data 4.byte channel // 8th byte
};
CDC_Transmit_FS(buffer, 9); //CubeMX programinin
    olusturdugu,USB transmit fonksiyonu

```

Deneyleri başlatabilmek için ise ana bilgisayardan mikrodenetleyiciye 21 byte'lık veri yapısı gönderilmiştir.

3.2.1.3. Süre Yönetimi

Mikrodenetleyici 48Mhz frekansta çalıştırılmıştır. Oluşturulan sinyal formlarının zamanlamasının doğru olabilmesi için mikrodenetleyicinin 32 bitlik CYCCNT sayıcı register'ı kullanılmıştır. Bu register sayesinde $\frac{1}{48\text{MHz}} \approx 20,8 \text{ ns}$ hassasiyetinde işlemler yapılabilirdi. Register'ın sayabileceği maksimum değer $20,8 \text{ ns} \cdot 2^{32} \approx 89$ saniyedir. Bu da deneyler için fazlasıyla yeterli bir değerdir.

Ancak koddaki “if-else”, “while” ve “for” gibi ifadelerinin de belirli bir süre harcaması ve bu sürelerin toplandığında önemli bir oranda hataya sebep olması sebebiyle her bir döngüde sebep olunan gecikme bir sonraki döngüde telafi edildi. Böylece toplam sürede çok hassas bir zamanlama sağlanmış oldu.

Deneye başlamadan önce her seferinde sayıcının kaç'a kadar sayması gerektiği hesaplanıyor. Ardından ADC, DAC gibi tüm işlemler bittikten sonra sayıcı sıfırlanıp diğer döngüde tekrar başlatılıyor.

3.2.1.4. Elektrokimyasal Protokollerin Gerçeklenmesi

Yapılan deneylerde sadece dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametri kullanıldığı için bu bölümde bu iki protokol anlatılmıştır.

Dönüşümlü Voltametri: Dönüşümlü voltametri için uyarım sinyali şekil 2.3'de görülmektedir. Protokolü gerçekleştiren algoritma ise kod 3.4'de görülmektedir. Her bir adım için mikrodenetleyici sayıcısının sayması gereken tık sayısı şu formülle hesaplandı:

$$Tick_sayisi = \frac{1}{tarama_hizi(mV/s)} \cdot 10^6 \cdot 48 \quad (3.4)$$

Verilen tarama hızında 1 mV'luk artış için gereken süreyi mikrosaniye cinsinden bulmak için 10^6 ile çarpma işlemi yapıldı. Ardından işlemcinin sayıcısının frekansı 48 MHz olduğu için, mikrosaniye cinsinden hesaplanan süre 48 ile çarpıldığı zaman her bir adımda işlemcinin sayıcısının sayması gereken değer bulunmaktadır. Kod 3.4'de `scan_rate_to_usec()` fonksiyonu bu hesaplamayı yapmaktadır. Şekil 3.6a'da dönüşümlü voltametri uyarım sinyalinin osiloskop görüntüsü gösterilmektedir.

Kod 3.3: Donusumlu Voltametri Algoritması

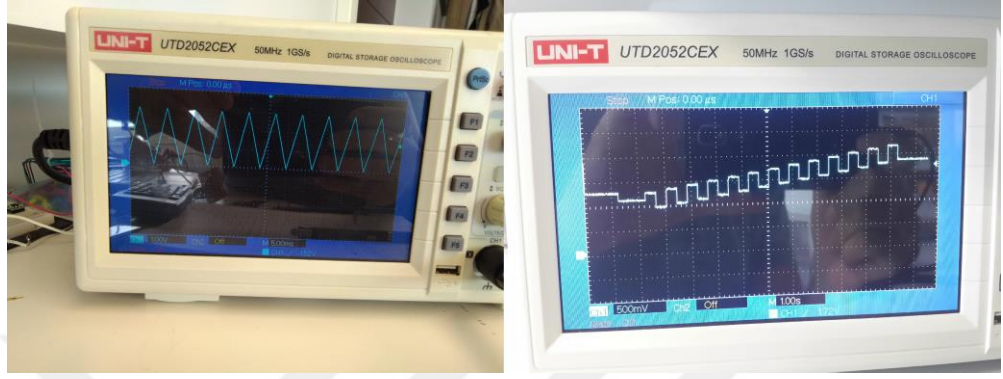
```

bekleme=scan_rate_to_usec(scan_rate);// bir adimlik beklemeyi hesapla
for (bias = baslangic; bias < (bitis); bias += artis){
    set_bias(bias); //DAC'den istenilen gerilimi ver

    wait (bekleme); // tarama hizini saglamak
    icin bekle ortalama = read_adc(); // ADC
    sonucunu al send_data(ortalama, bias); //
    sonuclari gonder
}

```


Diferansiyel Puls Voltametri Diferansiyel puls voltametri için uyartım sinyali şekil 2.7’de görülmektedir. Şekil 3.6b’de diferansiyel puls voltametri uyartım sinyali için osiloskop görüntüsü gösterilmektedir.



(a)

(b)

Şekil 3.6. Voltametri dalga formlarının osiloskop görüntüleri. (a) Dönüşümlü Voltametri Sinyali, (b) Diferansiyel Puls Voltametri Sinyali

Kod 3.4: Diferansiyel Puls Voltametri Algoritması

```

for (bias=baslangic;bias<bitis;bias+=step)
{
    //YUKSELEN KENAR
    set_bias(bias); //DAC baslangic gerilimi
    wait(width); // kare dalganin low kenari icin
    bekle set_counter_zero(); //sayaci sifirla
    current_low=read_adc(); // dusen kenar
    akimini olc set_counter_zero();

    //DUSEN KENAR
    set_bias(bias+amplitude); // puls uygula
    wait(period-width); // yükselen kenar
    icin bekle set_counter_zero();
}

```

```

current_high=read_adc(); // yükselen kenar akimini olc
//SONUC
send_data((current_high-current_low), bias); // sonuclarigonder
set_counter_zero();
}

```

3.2.1.5. Veri İşleme

ADC ile okunan değerler, ortalaması alınıp diziye kaydedildi. Geriye kalan tüm işlemler (filtreleme, pik bulma vs.) bilgisayar tarafından gerçekleştirildi.

Oversampling Yöntemi ADC çözünürlüğü çoğu ölçüm için yeterli olsa da, daha hassas ölçüm yapabilmek ve sinyal-gürültü oranını (SNR) artırmak için yüksek miktarda örnek (oversampling) alınarak ölçüm çözünürlüğünün artırılması hedeflenmiştir. Bu bölümde önce işlenmemiş data alınıp oversampling yöntemi uygulanmış, ardından ortalaması alınmış dataya oversampling yöntemi uygulanmıştır. Son olarak, işlenmemiş data, ortalaması alınmış data ve oversampling yapılmış data karşılaştırılmıştır.

Nyquist teoreminin belirttiği üzere, bir sinyali örtüşme olmadan örnekleyebilmek için $f_{nyquist} > 2 \cdot f_{sinyal}$ koşulunun sağlanması gerekmektedir. Burada f_{sinyal} , ölçümdeki en yüksek frekanslı bileşeni temsil etmektedir.

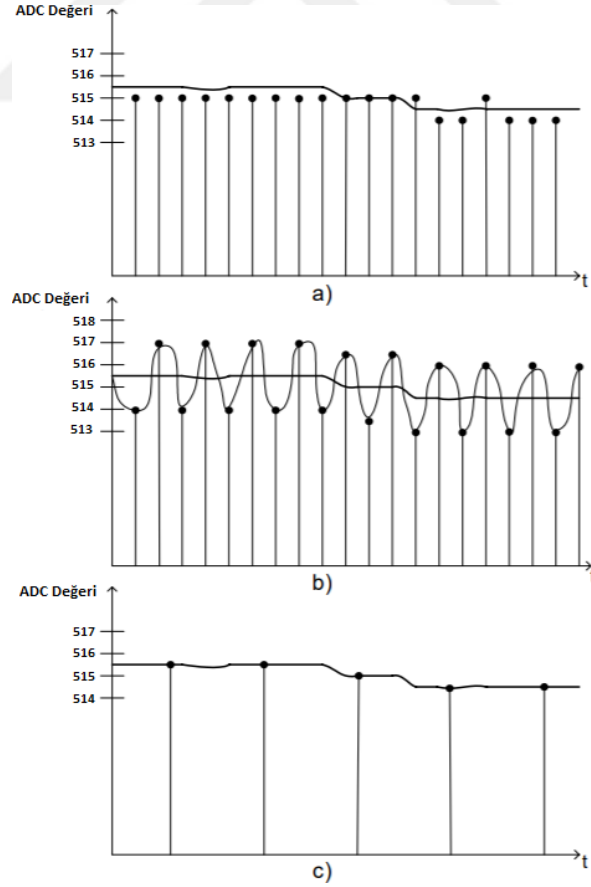
Oversampling yöntemi ile Nyquist frekansından çok daha fazla sayıda örnek alınarak çözünürlüğün artırılması sağlanır. Şekil 3.7'de bu yöntem gösterilmektedir. Örneğin, ölçülecek sinyalin LSB değeri 515,2 ise, yapılan tüm ölçümlerin sonucu 515 olarak okunacaktır. Ancak ortamda şekil 3.7(b)'deki gibi beyaz gürültü varsa, örneklerin ortalaması alınarak şekil 3.7(c)'deki gibi daha hassas değerler elde edilir. Bunun için gerekli örnekleme frekansı eşitlik 3.5 ile ifade edilmektedir:

$$f_{oversampling} = 4^n \cdot f_{nyquist} \quad (3.5)$$

Bu eşitliğe göre, çözünürlüğü bir bit artırmak için 4 kat fazla örnek alınmalıdır. Sinyal-gürültü oranının en iyi durumdaki teorik limiti ise denklem 3.6 ile verilmiştir:

$$SNR(dB) = (6,02 \cdot ENOB) + 1,76 \quad (3.6)$$

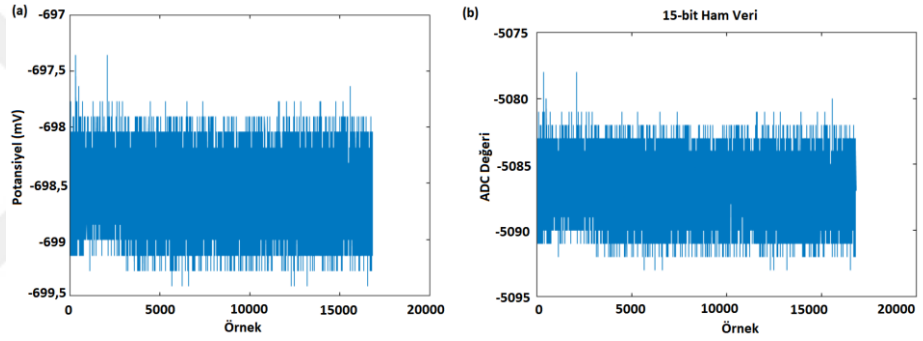
Burada ENOB, “effective number of bits” anlamına gelmektedir. Bu denklemden de görüldüğü üzere çözünürlüğü bir bit artırmak, SNR değerini yaklaşık 7,7 dB artırmaktadır. Ancak bu yöntemin çalışması için ortamda beyaz gürültü olmalı ve sonuçları en azından birkaç LSB salınım yaptırmalıdır. Bunu test etmek için herhangi bir direnç üzerine DC sinyal uygulanarak ölçüm yapılır. Eğer ortamda beyaz gürültü varsa, yani gürültü başka bir sinyal ile (güç kaynağının gürültüsü, ADC’nin doğrusal olmayan transfer fonksiyonu gibi) ilintili değilse ölçüm sonucu merkezi limit teoremince açıklandığı üzere Gauss dağılımına yakınsayacaktır.



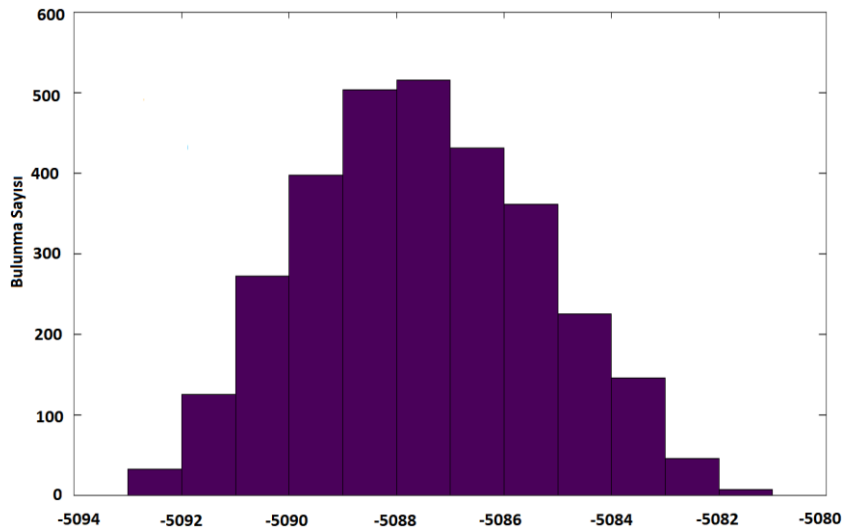
Şekil 3.7. Yüksek miktarda örneklemenin etkisi. Normalde ADC değerleri, (a)’daki gibi sadece

tam sayı değerleri alabilirken, eğer ortama gürültü eklenirse bu tam sayı değerleri sürekli değişir. Gürültülü değerler örneklenip ortalaması alındığında (c)'deki gibi daha yüksek çözünürlüklü sonuç elde edilmiş olur.

Şekil 3.8'de DC ölçüm sonucu görülmektedir. Ölçümler alınırken ortalama alma işlemi yapılmamış, ADC sonuçları direkt olarak çizilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere ölçüm değerleri yaklaşık ± 5 LSB değişmektedir. Şekil 3.9'de bu değerlerin histogramı görülmektedir. Görüldüğü üzere sonuçlar Gauss eğrisi vermekte ve bu da ortamda beyaz gürültü olduğunu ve oversampling yönteminin uygulanabileceğini göstermektedir.

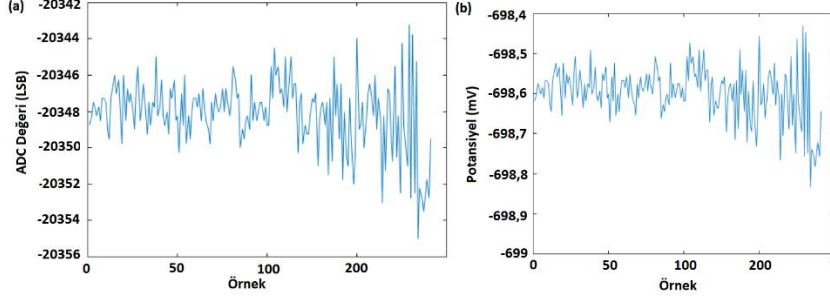


Şekil 3.8. DC ölçüm sonucu. (a) mV değeri, (b) ADC değeri.



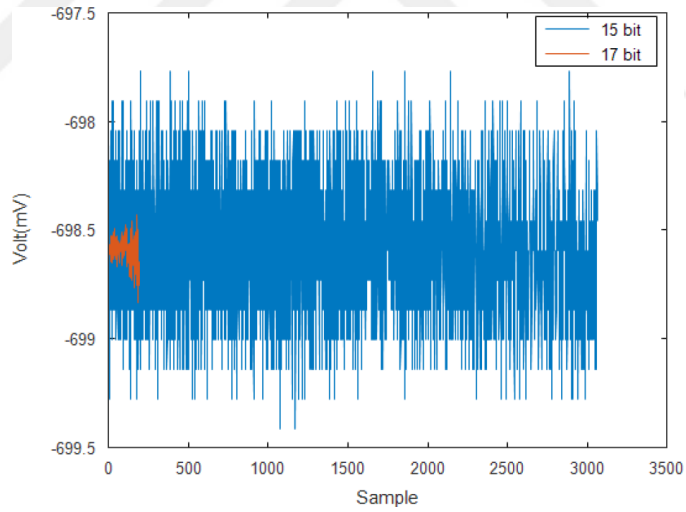
Şekil 3.9. DC Sinyalin Histogramı

Daha sonra, çözünürlüğü 2 bit artırmak için $4^2 = 16$ tane örnek alınıp toplanmış ve çıkan sonuç 2 bit sağa kaydırılarak $15+2 = 17$ bitlik veri elde edilmiş olur. Bu durumda elde edilen grafik şekil 3.10'de görülmektedir.



Şekil 3.10. 17 bitlik veri. (a) ADC değeri (LSB), (b) mV değeri.

Şekil 3.11'de 15 bit ve 17 bitlik verinin sonucu gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere ölçüm sonuçlarındaki salınımda önemli bir gelişme görülmektedir.



Şekil 3.11. 17 bit ve 15 bit veri

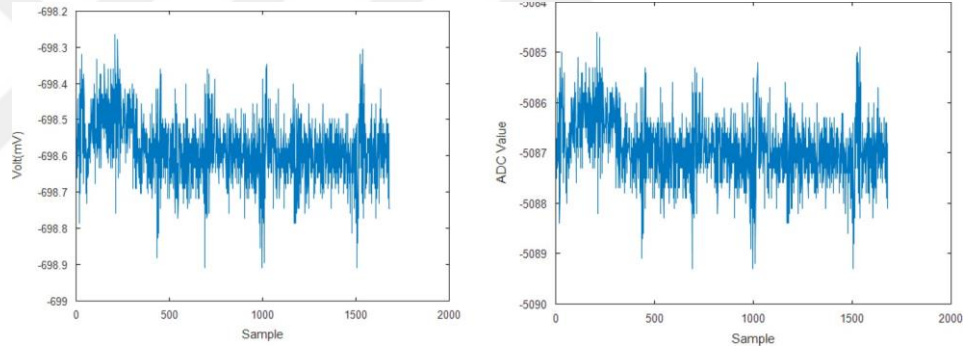
Bu durumda elde sonuçlar tablo 3.1'de gösterilmektedir. Sonuçlara göre oversampling yöntemi ile standart sapma değerinde yaklaşık 4,5 kat daha iyi sonuç elde edildiği görülmektedir. Daha sonra aynı veri kullanılarak ama bu sefer 10arlı basit yürüyen ortalaması alındıktan sonra aynı işlemler tekrar edilmiştir. Yani yeni durumdaki veriler şu şekilde elde edilmiştir:

$$x_{\text{mean}}[n] = \frac{(x_{\text{raw}}[n \cdot 10] + x_{\text{raw}}[n \cdot 10 + 1] + \dots + x_{\text{raw}}[n \cdot 10 + 8] + x_{\text{raw}}[n \cdot 10 + 9])}{10} \quad (3.7)$$

Tablo 3.1. Verilerin kıyaslanması.

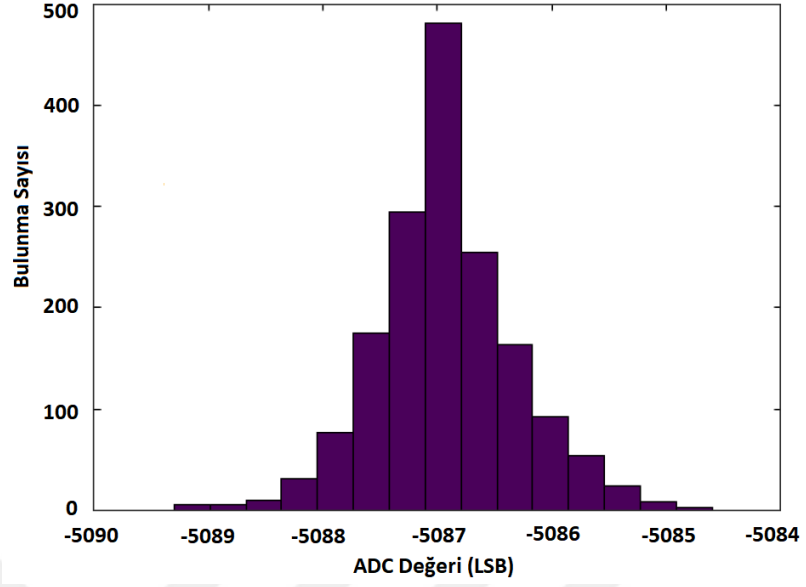
	15 bit	17 bit
Ortalama (LSB)	-5087,0	-20348
Ortalama (mV)	-698,60	-698,60
Standart sapma (LSB)	2,2158	1,9156
Standart sapma (mV)	0,30430	0,065767

Şekil 3.8'deki verinin ortalamasının denklem 3.7'deki formül ile alınmasıyla elde edilen grafik şekil 3.12'de gösterilmektedir.



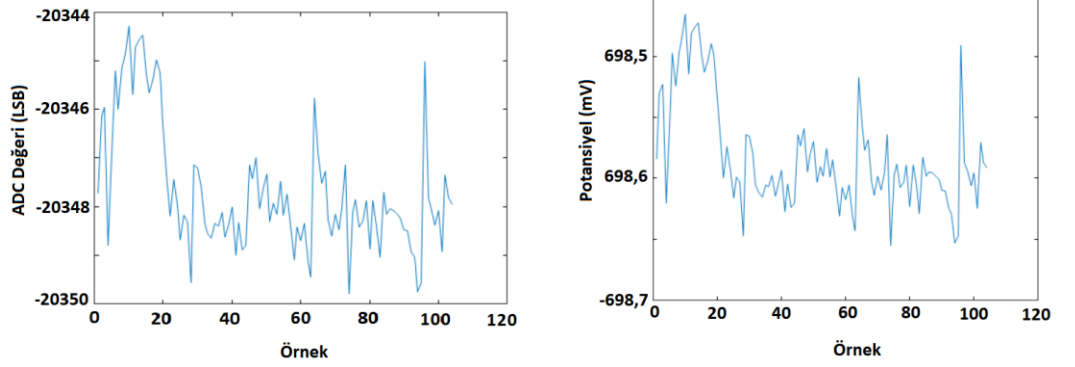
Şekil 3.12. 15 bitlik verilerin denklem 3.7'deki formül ile ortalamalarının alınmasıyla elde edilen grafik. (a) mV değeri, (b) ADC Değeri (LSB)

Ortalaması alınmış verinin histogramı şekil 3.13'de gösterilmektedir.

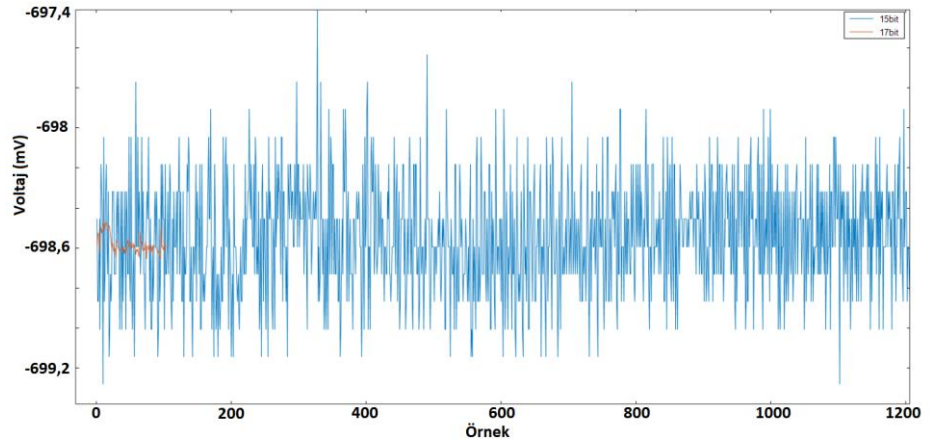


Şekil 3.13. Ortalaması alınmış datanın histogramı

Daha önceden yapıldığı gibi 16 verinin ortalaması alınıp çıkan sonuç 2 bit sağ tarafa kaydırıldığında elde edilen grafik şekil 3.14’de görülmektedir. Şekil 3.15’de her iki grafik üst üste görülmektedir.



Şekil 3.14. Ortalaması alınmış ve 17 bite çıkarılmış veri



Şekil 3.15. Ortalaması alınmış veri ve 17 bitlik veri

Tablo 3.2’de sonuçlar görülmektedir. Görüldüğü üzere oversampling ile bu durumda da aynı çözünürlükte ölçüm yapılmıştır. Tablo 3.3’de tüm sonuçlar toplu halde gösterilmektedir. Görüldüğü üzere sadece ortalama almanın çok az bir etkisi görülürken, oversampling yöntemi ile sinyal-gürültü oranında önemli miktarda bir gelişme görülmektedir.

Tablo 3.2. Ortalaması alınmış veriler ile oversampling işleminin sonuçları

	15 bit (ortalama)	17 bit
Ortalama (LSB)	-5086,9	-20348
Ortalama (mV)	-698,58	-698,60
Standart sapma (LSB)	2,1183	1,2933
Standart sapma (mV)	0,29091	0,065767

Tablo 3.3. Verilerin kıyaslanması

	15 bit ham veri	15 bit ortalama	17 bit ham veri	17 bit ortalama
Ortalama (mV)	-698,60	-698,60	-698,60	-698,60
Standart sapma (mV)	0,30430	0,29091	0,065767	0,065767

3.2.2. Masaüstü Uygulaması

Mikrodenetleyiciden gönderilen verilerin masaüstü bilgisayarda görüntülenmesi ve işlenmesi için QT yazılım geliştirme çatısı kullanılarak C++ dilinde bir uygulama geliştirildi.

3.2.2.1. QT

Masaüstü uygulaması hem cihazı kontrol etmekte hem de elde edilen verilerin saklanması, ekrana çizilmesini ve analiz edilmesini sağlamaktadır. Şekil 3.16’de tasarlanan arayüz gösterilmektedir. Arayüzün temel özellikleri şunlardır:

- Deneyleri başlatma-sonlandırma,
- Deney sonuçlarını kaydetme ve açma,
- Sonuçları filtreleme,
- Teğet eğrisi bulma

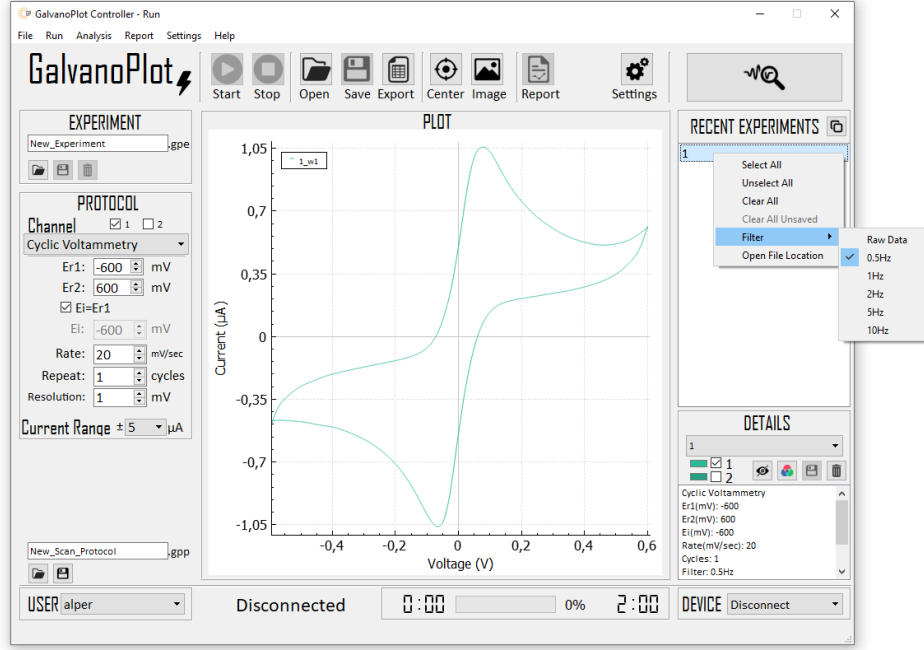
Arayüz ile cihaz, USB üzerinden “Virtual COM Port” oluşturarak haberleşmektedir. Bilgisayara herhangi bir USB takıldığında, bu cihazın STM32’nin USB kontrolcüsü için sağladığı VID ve PID değerlerine sahip olup olmadığı kontrol edilir. Eğer STM32 çipiye, bir sorgu paketi gönderilir. Gelen cevaba göre cihazın kime ait olduğu anlaşılır. Ardında “PROTOCOL” sekmesinden istenilen protokol ve parametreler seçilerek deney başlatılır. Tüm parametre değerleri 21 byte’lık paketler halinde cihaza gönderilmektedir.

3.2.2.2 Dijital Filtre

Özellikle zayıf sinyalleri hassas olarak ölçen sistemlerde dış kaynaklardan gelen birçok gürültü kaynağı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır:

- 50/60 Hz şebeke gürültüsü,

- RF sinyaller,
- Beyaz gürültü-termal gürültü ve saçma gürültüsü (shot noise),
- Nicemleme gürültüsü.



Şekil 3.16. Uygulama arayüzü

Beyaz gürültü maddenin doğasından kaynaklandığı için tamamen yok etmek mümkün değildir. Nicemleme gürültüsü ise analog-sayısal dönüşümünden kaynaklanmaktadır ve yüksek hızda örnekleme (oversampling) yöntemi ile iyileştirilebilmektedir. RF sinyaller ve şebeke gürültüsü ise faraday kafesi ve güç izolatörleri ile bir nebze zayıflatılsa da yeterli oranda etkili olamamaktadır. Özellikle medikal cihazlarda en önemli gürültü kaynağı olan şebeke gürültüsünü ve güç hattından gelen gürültüleri engellemek için filtre kullanılması gerekmektedir.

Filtreler temelde analog ve sayısal filtreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Analog filtreler direnç, kapasitör ve op-amp gibi devre elemanları ile kurulurken sayısal filtreler yazılımsal olarak gerçekleştirilmektedir. Bundan dolayı sayısal filtrelerin özellikleri çalışma sırasında bile değiştirilebilecek iken analog filtrelerin

frekans tepkisi hep sabit kalmaktadır. Bu da özellikle elektrokimyasal sensör ölçümleri için istenmeyen bir durumdur çünkü uygulanan protokole göre filtre tepkisinin değişmesi gerekmektedir. Bunun yanında şebeke gürültüsü gibi düşük frekanslı sinyalleri filtrelemek için yüksek derece filtreler gerekmektedir. Bu da maliyeti artırmaktadır. Ayrıca bu durumda bile analog filtrelerin frekans tepkisi, sayısal filtrelerin yanında çok kötü kalmaktadır. Sayısal filtreler, kullanılan bilgisayarın gücüne bağlı olduğu için günümüzdeki sıradan bilgisayarlarla bile çok etkili filtreler tasarlamak mümkündür. Analog filtreler ise kullanılan devre elemanların toleransına bile oldukça bağlıdır. Tablo 3.4'te karşılaştırmaları gösterilmektedir.

Bir alçak geçiren filtre için şu özellikler önemli olmaktadır:

- Dar geçiş bandı değeri,
- Düşük geçiş bandı zayıflaması,
- Yüksek bant durdurma değeri.

Sonlu Dürtü Yanıtlı Filtreler Sayısal filtreler sonlu dürtü yanıtlı (finite impulse response-FIR) ve sonsuz dürtü yanıtlı (infinite impulse response-IIR) filtreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Tablo 3.4. Filtrelerin karşılaştırılması

Sayısal Filtre	Analog Filtre
Yazılımla konfigüre edilebilir	Bir kere ayarlanır
Çok hassas bir şekilde ayarlanabilir	Hassasiyet, devre elemanlarına ve sayısına bağlı
Her zaman aynı tepkiyi verir	Sıcaklığa ve devre elemanlarının toleransına göre tepkisi

	değişir
Ucuz- sadece işlemci gücüne ihtiyaç duyar	Maliyetli- hem çok yer kaplar hem de devre elemanlarının maliyeti vardır
Daha iyi performans	Daha kötü frekans tepkisi
Yüksek frekansları filtrelemek maliyeti	Yüksek frekansları kolayca filtreleyebilir
Tasarımını daha zordur	Kolayca tasarlanır

IIR filtrelerin denklemi şu şekilde ifade edilir:

$$y(n) = \sum_{k=0}^N a_k x(n-k) - \sum_{k=1}^M b_k y(n-k) \quad (3.8)$$

a_k ve b_k filtre katsayılarını ifade etmektedir. Denklemden de görüldüğü gibi IIR filtreler rekürsif filtrelerdir. FIR filtreler ise şu şekilde ifade edilebilir:

$$y(n) = \sum_{k=0}^{N-1} h(k)x(n-k) \quad (3.9)$$

FIR ve IIR filtrelerin karşılaştırılması tablo 3.5'te gösterilmektedir. FIR filtreler her durumda stabil olması, doğrusal faz tepkisine sahip olması ve kolayca implemente edilebilmelerinden dolayı bu çalışmada tercih edilmiştir.

Tablo 3.5. FIR ve IIR filtrelerin karşılaştırılması (Ifeachor and Jervis, 2002).

FIR Filtre	IIR Filtre
Doğrusal faz tepkisi	Doğrusal olmayan faz tepkisi
Stabildir	Stabilliği garanti değildir
Benzer tepki için daha çok katsayıya ihtiyaç duyar	Daha az katsayı
Analog filtrelerden farklı tepki verir	Analog filtreler gibi tasarlanabilir

FIR katsayılarını hesaplamak daha zordur	Daha kolay hesaplanır
--	-----------------------

Katsayıların Hesaplanması FIR filtresi denklem 3.9 ile verilmişti. Buna göre filtre oluşturmak için gereken esas şey $h(n)$ filtre katsayılarının hesaplanmasıdır. Bu katsayıların hesaplanabilmesi için pencere yöntemi (window method) kullanılmıştır. Bu yöntemde, frekans uzayındaki kare fonksiyonun zaman uzayında $\frac{\sin(x)}{x}$ yani sinc(x) fonksiyonuna denk gelmesi özelliği kullanılır. Kare dalganın genliği 1 olduğu bölge ile bant-geçiren bölge karşılaştırılır. Böylece geri kalan frekans değerleri sıfır ile çarpılırken bant-geçiren bölgedeki frekans değerleri hiç değişmeden kalır. Kare fonksiyonu, zaman uzayında sinc(x) fonksiyonuna denk gelmektedir. Dolayısıyla, bu sinc(x) fonksiyonu zaman uzayında başka bir sinyal ile konvolv edildiğinde, diğer sinyalin 5 Hz'den sonraki frekans değerleri sıfır ile çarpılmış olacak. Yani 5 Hz kesim frekanslı bir alçak geçiren filtre gerçekleşmiş olmaktadır. Dolayısıyla sinc fonksiyonun değerleri aynı zamanda filtrenin katsayıları oluşturmaktadır.

Fakat yukarıda anlatılan işlemde bahsedilen sinc(x) fonksiyonu matematiksel olarak sonsuza kadar devam etmektedir. Fiziksel olarak bu durum gerçekleştirilemeyeceği için belirli bir noktadan sonra fonksiyon kesilip geri kalan değerlerin sıfır olduğu varsayımının yapılması gerekmektedir. Fakat bu durum "Gibbs fenomeni" olarak bilinen bir duruma yol açmaktadır. Gibbs fenomenin yol açtığı, kare dalganın kenarlarındaki çıkıntılar sinc fonksiyonunun kesilmesinden kaynaklanmaktadır. Bunu engellemek için pencereleme fonksiyonları kullanılır.

Pencereleme Fonksiyonları Gibbs fenomenine sebep olan sinc fonksiyonunun yarıda kesilmesi durumu aslında fonksiyonun kare dalga ile çarpılmasına denk gelmektedir. Yani eğer sinc fonksiyonu M . örnekte kesildiyse bu fonksiyon ile çarpılmış demektir:

$$w(n) = \begin{cases} 0.54 + 0.46\cos(2\pi\frac{n}{N}) & 0 \leq n \leq N \\ 0 & n > N \end{cases}$$

Bu da frekans uzayında $w(n)$ ile sinc fonksiyonun konvolv olması demektir. Bu da

gibbs fenomenine sebep olmaktadır. Bu durumu çözmek için ideal filtre fonksiyonu, sonlu değere sahip bir pencere fonksiyonu ile çarpılır.

Sonuç Yukarıda anlatılanlar göz önüne alınarak, filtre fonksiyonu şu şekilde olmaktadır:

$$h[n] = K \frac{\sin(2\pi f_c(i-M/2))}{i-M/2} \left[0.54 + 0.46 \cos\left(2\pi \frac{n}{M}\right) \right] \quad (3.10)$$

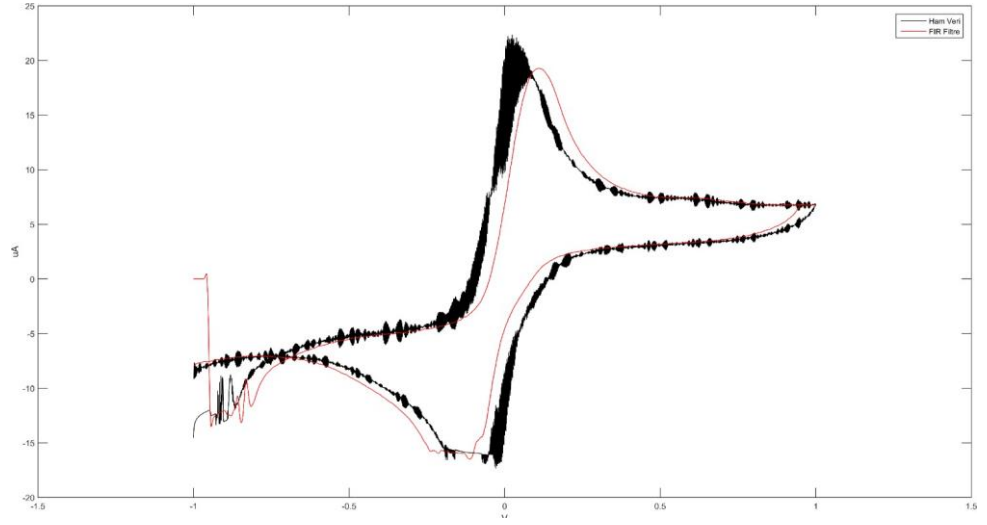
Burada K değeri, filtrenin kazancını normalize etmek için, DC'de kazancı 1 yapan bir katsayıdır. f_c , filtrenin kesim frekansını, M ise filtrenin uzunluğunu belirtmektedir. Filtrenin uzunluğuyla geçiş bölgesinin genişliği arasında şu ilişki vardır:

$$M \approx \frac{4}{BW} \quad (3.11)$$

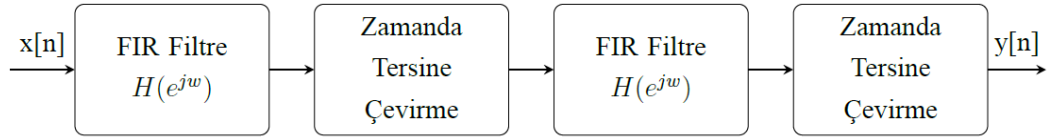
Buna göre filtrenin uzunluğu ne kadar büyük olursa filtrenin geçiş bandı o kadar dar olur. Bu yüzden uygulamada veri uzunluğuna da bağlı olarak olabildiğince yüksek dereceli filtreler kullanıldı

Sıfır fazlı filtreleme Yukarıda verilen yöntem ile örnek bir veri üzerinde filtreleme işlemi yapıldığında Şekil 3.17'deki sonuç elde edilmektedir.

Görüldüğü gibi filtrenin sebep olduğu faz kaymasından ötürü, gürültüler temizlenmiş olsa bile veride kayma meydana gelmektedir. Bu durum tepe noktasının yerinin çok önemli olduğu elektrokimyasal sensörler için sorun yaratmaktadır. Bunu çözmek için şekil 3.18'de gösterilen yöntem kullanılmıştır.

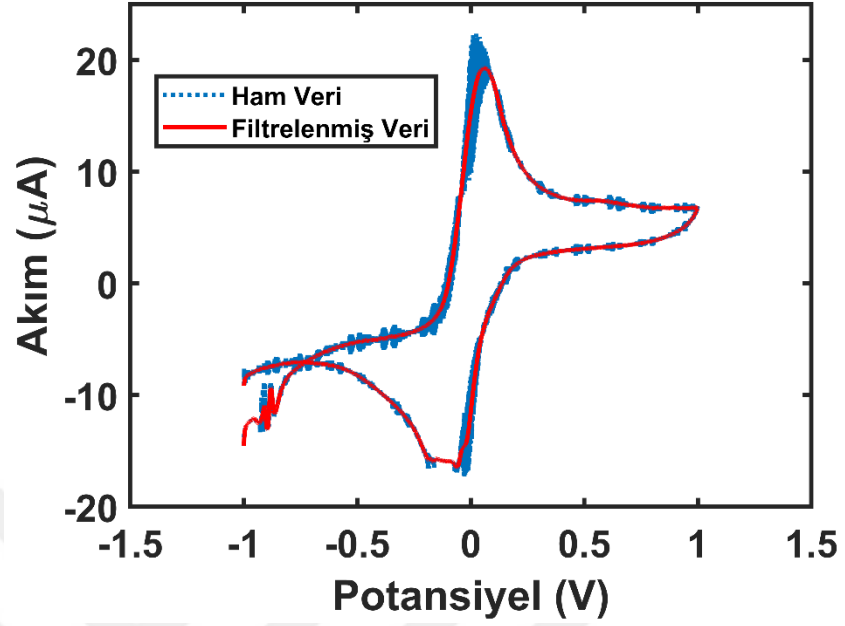


Şekil 3.17. Filtreleme Sonucu Meydana Gelen Faz Farkı

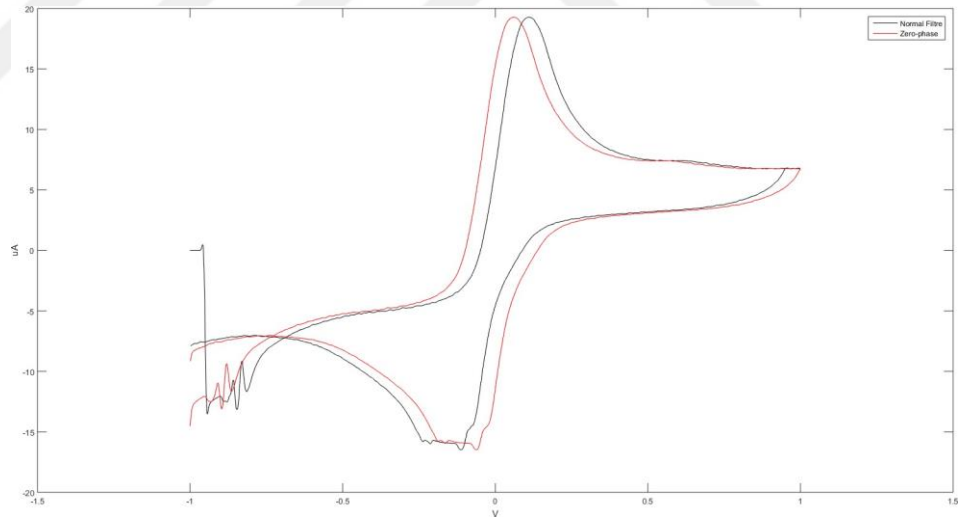


Şekil 3.18. Sıfır Fazlı Filtre Algoritması

Buna göre şekil 3.18’de gösterilen yöntemde input verisi filtreden geçirilerek bir miktar faz kaymasının olduğu bir $H(e^{jw})X(e^{jw})$ verisi elde edilir. Daha sonra bu veri zamanda ters çevrildiğinde $H(e^{jw})^*X^*(e^{jw})$ elde edilir ve tekrardan aynı filtre ile filtrelendir. Bunun sonucunda $|H(e^{jw})|^2X^*(e^{jw})$ elde edilir. Böylece ilk başta sebep olunan faz kaymasının tam tersi yönünde bir faz kayması meydana gelir ve toplam faz kayması sıfırlanmış olur. Ardından veri tekrardan ters çevrilerek $|H(e^{jw})|^2X(e^{jw})$ elde edilir ve gerçek haline döndürülmüş olur. Bu yöntemin uygulanmasıyla yapılan filtreleme işleminin sonucu şekil 3.19 ve 3.20’de gösterilmektedir.



Şekil 3.19. Sıfır-fazlı filtreleme.



Şekil 3.20. Sıfır-fazlı filtreleme ve normal filtre

3.2.2.3. Veri Analizi

Elektrokimyasal biyosensör deneylerinde hem kapasitif hem de faradaik akımlar oluşmaktadır. Analiz yapılırken faradaik akım değerleri gerekirken, kapasitif akımın sonuçlardan çıkartılması gerekir. Diferansiyel puls voltametri

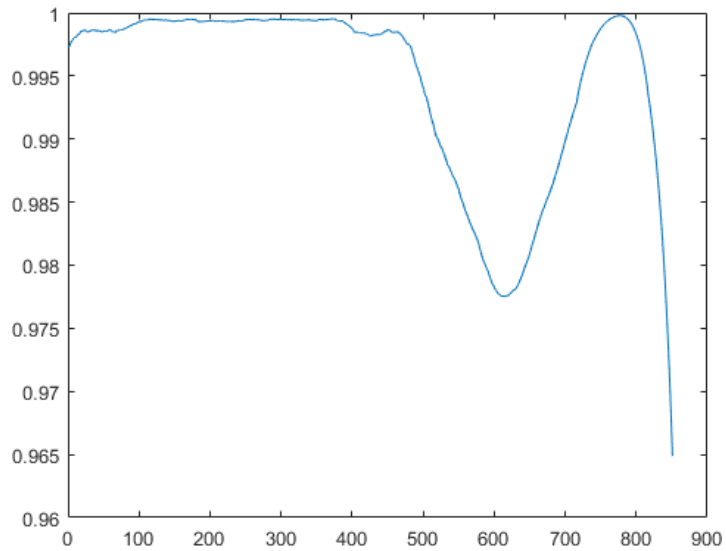
deneysinde kapasitif akımın değeri çok düşük olsa da aranan sensör sinyali başka bir eğrinin üzerine binmiş halde olabilmektedir. Bundan dolayı arka plan eğrisinin çıkartılıp, sadece sinyalin büyüklüğü hesaba katılmalıdır. Bu yüzden bir de analiz için şekil 3.23’de görülen ayrı bir arayüz tasarlanmıştır.

Eğriyi otomatik bulabilmek için bu çalışmada öncelikle Pearson korelasyon yöntemi kullanıldı. Fakat her durumda doğru sonuç vermediği için eğriyi manuel olarak bulma seçeneği de eklendi.

Pearson Korelasyon Yöntemi Bu yöntemde verilerin 20şerlik gruplar halinde korelasyonuna bakıldı. Pearson Korelasyon formülü şu şekilde verilmiştir:

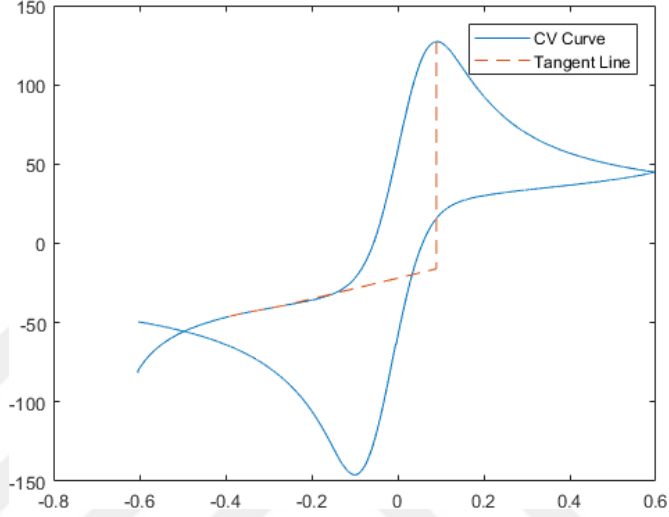
$$R = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \quad (3.12)$$

Burada n, data uzunluğunu ifade etmektedir ve bizim çalışmamızda değeri 20dir. x ve y ise korelasyonuna bakılacak datayı ifade etmektedir. Burada, ilk 20 data (yani x) ile sonraki 20 datanın (yani y’nin) korelasyonuna bakılmıştır. Eğer korelasyon 1’e yakınsa, her iki tarafta da doğrusal bir artışın olduğu anlamına gelmektedir. Matlab’de yukarıdaki formül kullanılarak yapılan analizde şekil 3.21’de gösterilen eğimler bulundu.



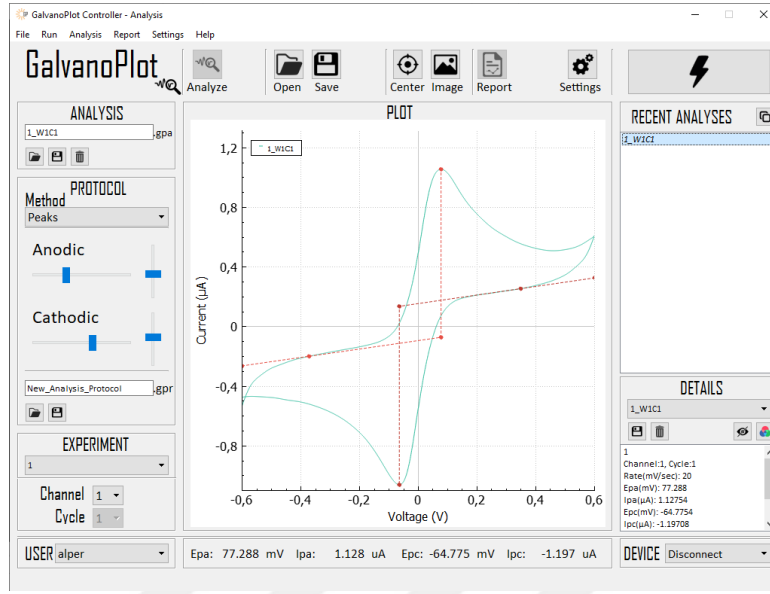
Şekil 3.21. Korelasyon Grafiği. Anodik sinyal için denklemler 3.12 uygulandıktan sonra elde edilen korelasyon katsayı grafiği.

Burada korelasyonun 290. veriden itibaren en yüksek değere ulaştığı görülüyor. Dolayısıyla en doğrusal olan noktada burası olmaktadır. Bu nokta başlangıç kabul edilirse, eğrinin eğimi 0,0482 olarak bulunur. Bu noktadan E_{max} 'a aynı eğimle eğri çizilirse ve bu I_{max} ile birleştirilirse şekil 3.22'deki grafik elde edilir.



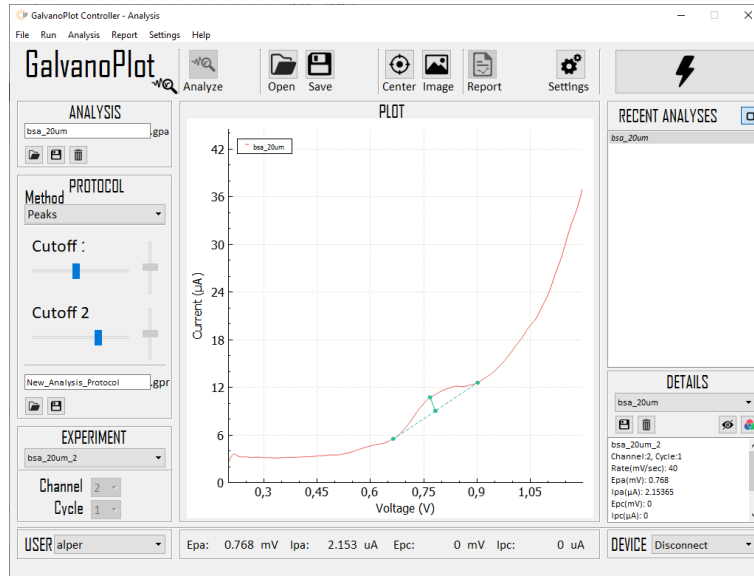
Şekil 3.22. Pozitif tepe değeri için eğrinin bulunması

Manuel Eğri Bulma Hem Pearson yöntemi her zaman doğru sonuç vermediği, hem de rastgele herhangi bir noktada istenilen açıdaki eğimin hesaplanabilmesi için manuel olarak eğri bulma yöntemi geliştirildi. Şekil 3.23'de görülen “Anodic” ve “Cathodic” sekmesi ile teğetin başladığı nokta seçilir. Bar ileri-geri hareket ettirilerek herhangi bir nokta teğet başlangıç noktası olarak seçilebilir. Ardından hemen yanlarındaki bar yukarı-aşağı oynatılarak istenilen açıda teğet eğrisi değiştirilebilmektedir.



Şekil 3.23. Manuel tepe bulma

Diferansiyel puls voltametrisinde yerel tepe noktalarının bulunması gerektiğinden, bu deneyler için manuel olarak iki kesim noktası seçilip, bu iki nokta arasındaki doğru, verilerden çıkartılır. Ardından yerel tepe noktası bulunur. Şekil 3.24’de sonuç gösterilmektedir.



Şekil 3.24: DPV’de yerel tepe noktası bulma

3.3 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada geliştirilen cihazı kıyaslamak amacıyla Autolab PGSTAT-302 cihazı ve Nova yazılımı kullanıldı. Bunların yanında deneylerde kullanılan diğer cihazlar ve malzemeler şunlardır:

- Hassas terazi (Mettler Toledo),
- Vortex (Biosan V1),
- Faraday kafesi,
- Ag/AgCl referans elektrodu (BAS),
- Platin tel yardımcı elektrot,
- Kalem grafit çalışma elektrodu (0,5 mm Rotring kalem ve HB model 0,5 mm uç).

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler şunlardır:

- Sığır serum albümini (Bovine serum albumin-BSA) (Sigma),
- Buzağı timus bezinden elde edilen tek sarmal DNA (ctssDNA) (Sigma),
- Buzağı timus bezinden elde edilen çift sarmal DNA (ctdsDNA) (Sigma),
- Asetat tampon çözeltisi,
- Fosfat tampon çözeltisi.

3.5. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.5.1. Tampon Çözeltisinin Hazırlanışı

Ultra saf su kullanılarak hazırlanan tampon çözeltileri buzdolabında saklandı. Fosfat tamponu olarak pH değeri 7,4 olan 0,05 M çözelti hazırlandı. Bunun için 1,36 g (0,01 mol) KH_2PO_4 , 6,96 g (0,04 mol) K_2HPO_4 ve 1,168 g (0,02 mol) NaCl içeren çözelti hazırlandı.

DNA çözeltilerinde kullanılan asetat tampon çözeltisi için 2,396 g (0,292 M) sodyum asetat, 12,49 g (0,2 M) asetik asit kullanılarak 0,5 M ABS tampon elde edildi. pH değerinin 4,8 olması için pH metre ile ölçüm yapılarak gerekli miktarda NaOH veya HCl eklendi.

3.5.2. DNA ve BSA Çözeltilerinin Hazırlanışı

BSA, ssDNA ve dsDNA, Sigma-Aldrich firmasından alındı ve hazırlanışında Milli-Q ultra saf su kullanıldı. Tris-HCl (TBS, pH 7,00) tamponunda hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı.

Seyreltilmiş ssDNA ve dsDNA çözeltileri 20 mM NaCl (ABS, pH 4,80) içeren 0,50 M asetat taponunda hazırlandı. Seyreltilmiş BSA çözeltileri ise 20 mM NaCl (PBS, pH 7,40) içeren 0,05 M fosfat taponunda hazırlandı.

3.6. Kalem Grafit Elektrotların Hazırlanışı

Kalem grafit elektrotların (KGE) hazırlık aşamasında, Tombow kalem uçları 3,0 cm boyutunda kesildi ve 1,0 cm'lik kısmı elektrokimyasal hücre içerisinde kalacak şekilde kalem aparatı içerisine yerleştirildi. Elektrokimyasal yüzey aktivasyonu 30 saniye süreyle +1,4 V potansiyel uygulanarak ABS (pH 4,8) tampon içinde gerçekleştirildi.

3.6.1. Kalem Grafit Elektrotların Dönüşümlü Voltametri ile Karakterizasyonu

Elektrotların karakterizasyonu için gerçekleştirilen dönüşümlü voltametri deneyleri, 100 mM KCl içerisinde 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ hazırlanarak yapıldı. Farklı tarama hızlarında deneyler gerçekleştirilerek akım-tarama hızı ilişkisi incelendi.

3.7. DNA'nın Voltametrik Analizine Yönelik Deneysel Prosedür

DNA analizi için bölüm 2.1.2.2'de anlatılan DPV protokolü kullanıldı. Tarama hızı 50 mV/s olarak ayarlandı. Bunun için adım büyüklüğü 2 mV, puls genişliği 20 ms ve periyot 40 ms olarak belirlendi. Puls büyüklüğü 25 mV olarak ayarlandı. Dijital filtrenin kesim değeri 5 Hz olarak seçildi.

3.7.1. Kalem Grafit Elektrot Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu

Yüzey aktivasyonu yapılmış elektrotlar 100 μ L DNA çözeltisi içine daldırıldı ve 30 dk bekletilerek pasif adsorpsiyon yapması sağlandı. Spesifik olmayan yüzeye tutunumları atmak için elektrotlar ABS içinde iki kez yıkandı. Bu yöntemler hem ssDNA hem de dsDNA için uygulandı.

3.8. DNA-Protein Etkileşiminin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Deneysel Prosedür

DNA-BSA etkileşimi için bölüm 2.1.2.2'de anlatılan DPV protokolü kullanıldı. Tarama hızı 50 mV/s olarak ayarlandı. Bunun için adım büyüklüğü 2 mV, puls genişliği 20 ms ve periyot 40 ms olarak belirlendi. Puls büyüklüğü 25 mV olarak ayarlandı. Dijital filtrenin kesim değeri 5 Hz olarak seçildi.

3.8.1. Kalem Grafit Elektrot Kullanılarak DNA-Protein Etkileşiminin Voltametrik Tayinine Yönelik Prosedür

BSA-DNA etkileşimini incelemek için, yüzeyine DNA immobilize edilmiş

kalem grafit elektrotlar, 6 μ M BSA içeren 0,05 M PBS (pH 7,40) özeltisine daldırılarak bekletildi. Ardından her bir elektrot PBS ile yıkandı.

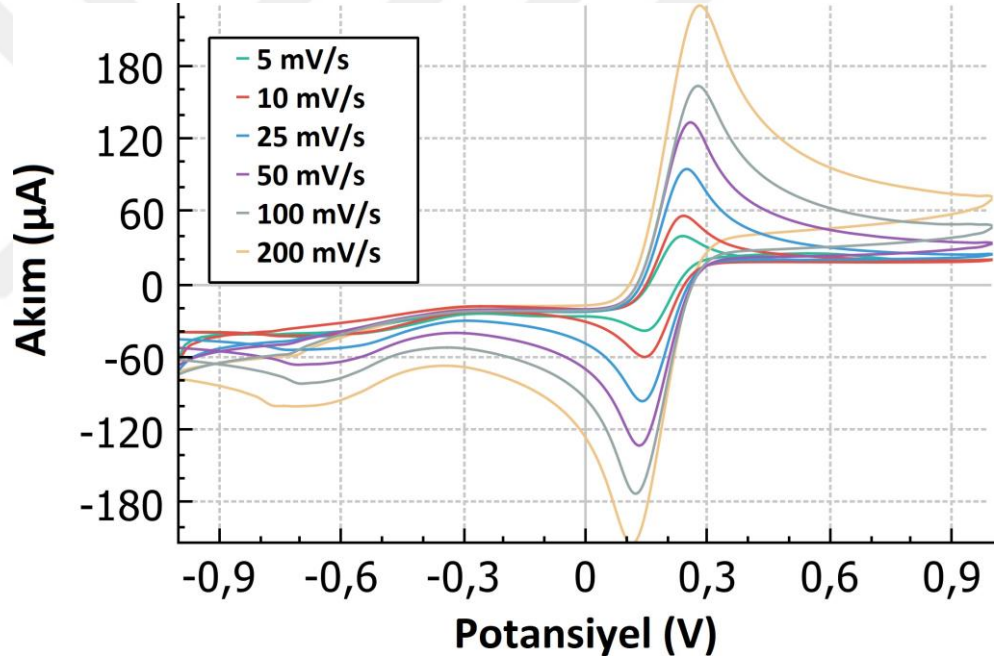
BSA-DNA etkileşiminin voltametrik tayini için bölüm 2.1.2.2.'de anlatılan DPV protokolü kullanıldı.



4. BULGULAR

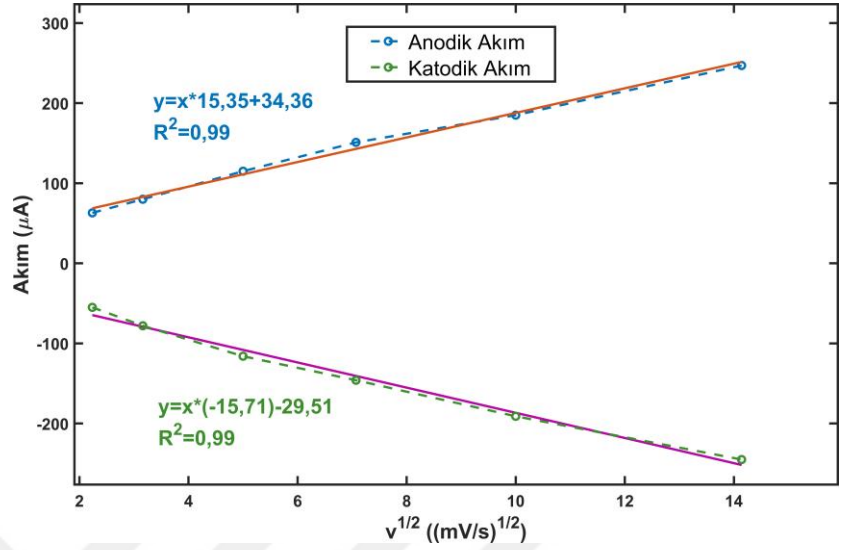
4.1. Tarama Hızındaki Değişimin Ölçülen Akıma Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

Elektrotların karakterizasyonunu yapmak için -1 V ile +1 V arasında, tarama hızı 5 mV/s'den 200 mV/s'ye kadar değişen hızlarda CV deneyleri gerçekleştirildi. Redoks prob çözeltisi 0,1M KCl içerisinde 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ ve 2 mM $K_4Fe(CN)_6$ kullanarak hazırlandı. Tüm deneylerde 5 Hz kesim frekanslı alçak geçiren dijital filtre uygulandı. Deney sonuçları şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Elektrotların CV ile karakterizasyonu için yapılan 0,1M KCl içerisinde 2 mM $K_3Fe(CN)_6$ ve 2 mM $K_4Fe(CN)_6$ kullanılarak yapılan tarama hızı çalışması. Tarama hızı olarak 5 mV/s ile 200 mV/s arasında değerler seçildi. Tarama aralığı: $\pm 1V$ olarak ayarlandı.

Bölüm 2.1.2.1'de anlatıldığı üzere akımın tarama hızının kareköküyle doğru orantılı artması gerekmektedir. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen her iki akımın tarama hızının kareköküyle olan ilişkisi şekil 4.2'de gösterilmektedir. Buna göre hem anodik bölgede hem de katodik bölgede elde edilen grafiklerde $R^2 = 0,99$ olarak bulunmuştur.



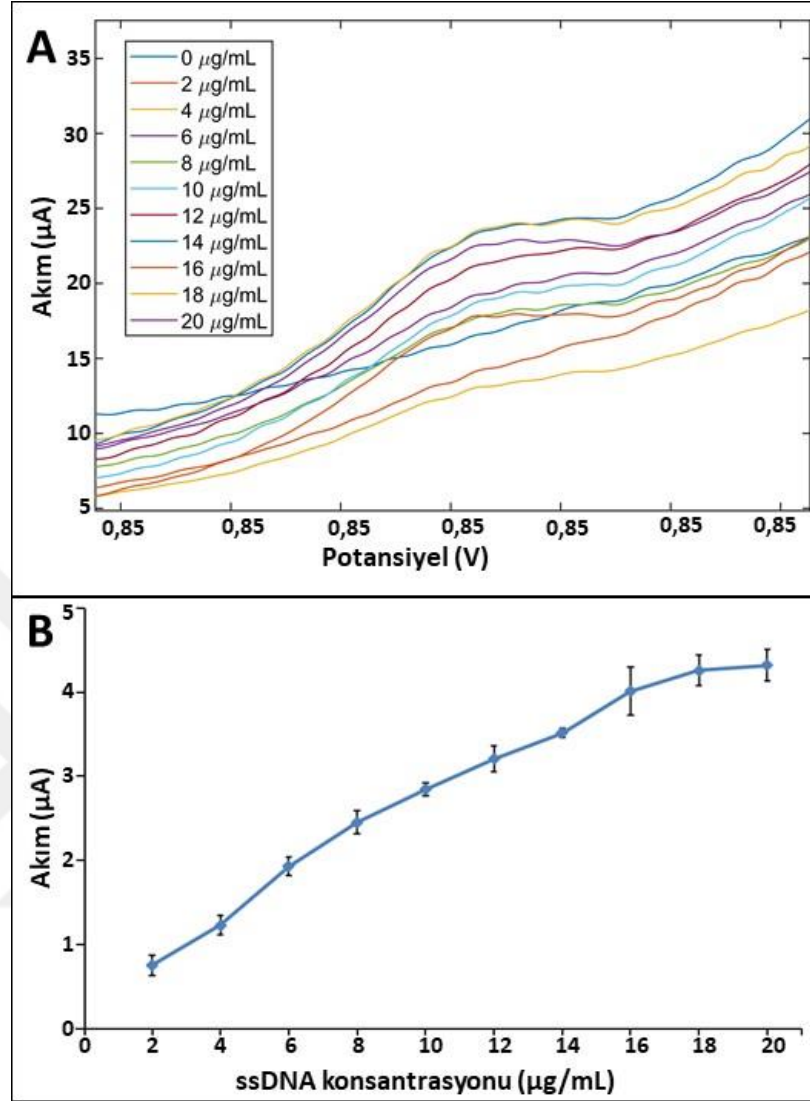
Şekil 4.2. Tarama hızı çalışmasında elde edilen anodik ve katodik akımların tarama hızının kareköküyle değişim grafiği. Akımlar bölüm 3.2.2.3’de anlatılan manuel yöntemle bulundu.

4.2. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctssDNA’nın Voltametrik Tayinine Yönelik Bulgular

Deneyler bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Sonuçlar 3.2.2.2’de anlatıldığı şekilde 10 Hz’de filtrelendi. Akım bulma işlemi, 3.2.2.3’de anlatıldığı üzere manuel olarak yapıldı.

4.2.1. DNA Konsantrasyonundaki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

Elektrot yüzeyine immobilize edilen ctssDNA konsantrasyonundaki değişimin ölçülen guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisi incelemek amacıyla gerçekleştirilen deneylerde +1,00 V civarında ölçülen guanin sinyali şekil 4.3’de voltamogramda gösterilmiştir.

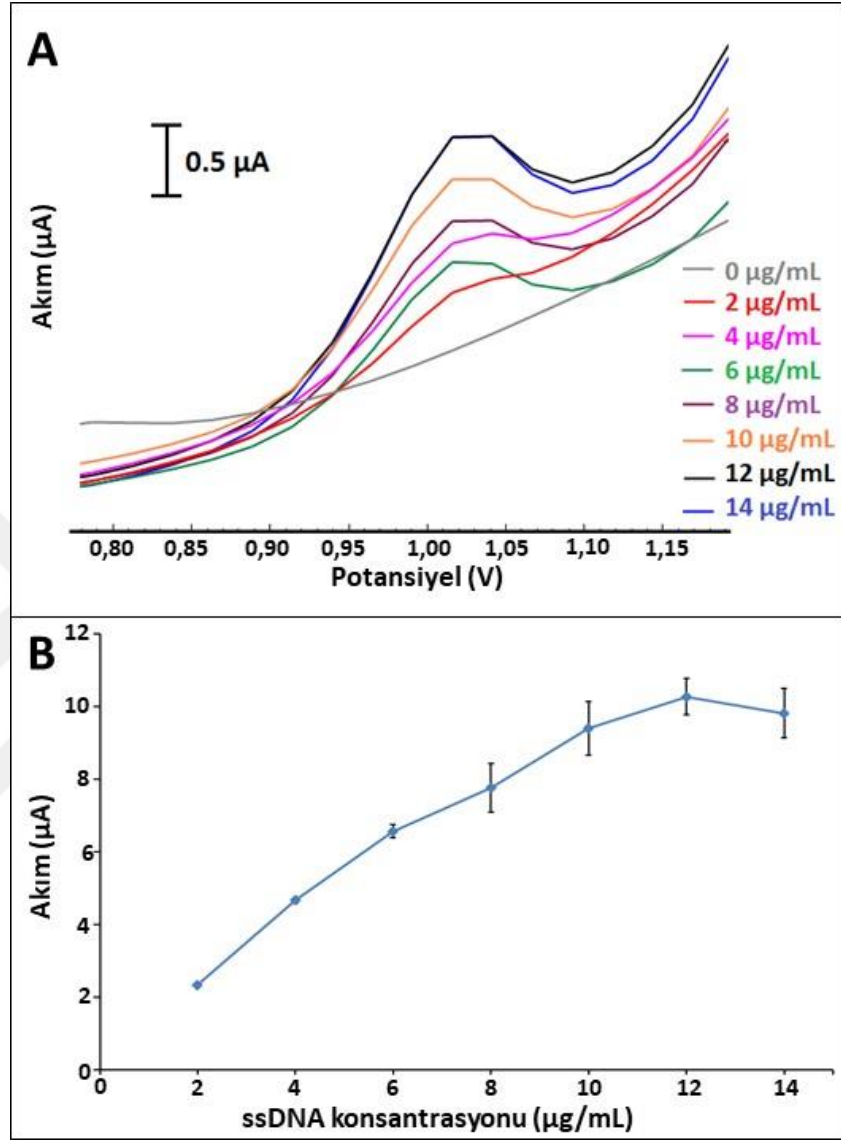


Şekil 4.3. Geliştirilen cihazla 2-20 ug/mL ssDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği

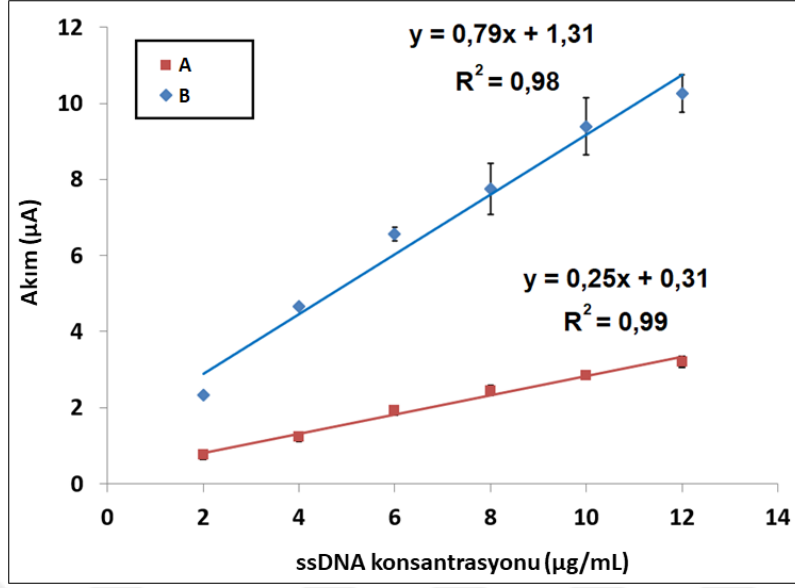
Bu sonuçlara göre elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.5’de gösterilmektedir. Buna göre tayin sınırı 1,25 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Doğrusal regresyon denklemi $I(\mu A)=0,25 [ssDNA] (\mu g/mL) + 0,31$ ve $R^2 = 0,99$ olarak bulundu.

A-302 cihazı ile aynı koşullarda yapılan deneyler sonucunda elde edilen voltamogramlardan şekil 4.4A’da gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.5’de gösterilmektedir. A-302 cihazı ile yapılan deneylerde tayin sınırı 1,65 µg/mL olarak bulundu. Doğrusal regresyon

denklemini $I(\mu\text{A}) = 0,79 [\text{ssDNA}] (\mu\text{g/mL}) + 1,31$ ve $R^2 = 0,98$ olarak bulundu.



Şekil 4.4. AUTOLAB-302 cihazıyla 2-14 $\mu\text{g/mL}$ ssDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği



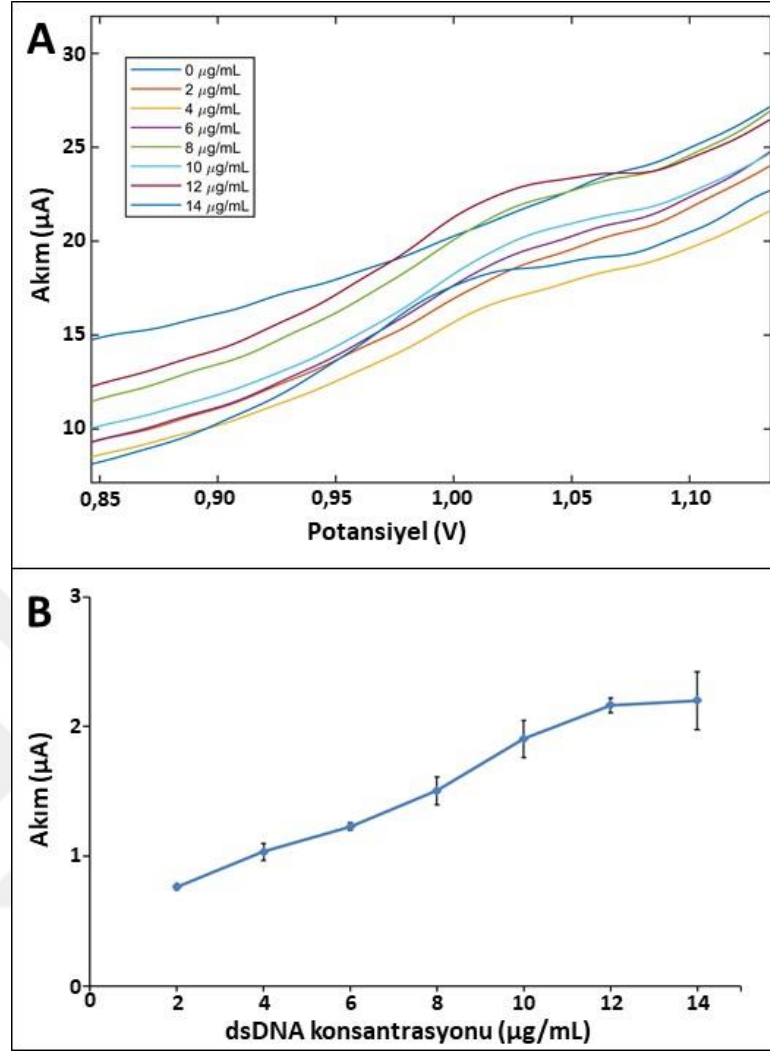
Şekil 4.5. Her iki elektrokimyasal analizörle voltametrik ssDNA tayinine yönelik elde edilen kalibrasyon grafikleri: (A) Geliştirilen cihaz, (B) AUTOLAB-302.

4.3. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctdsDNA'nın Voltametrik Tayinine Yönelik Bulgular

Deneyler bölüm 3.7'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Sonuçlar 3.2.2.2'de anlatıldığı şekilde 10 Hz'de filtrelendi. Akım bulma işlemi, 3.2.2.3'de anlatıldığı üzere manuel olarak yapıldı.

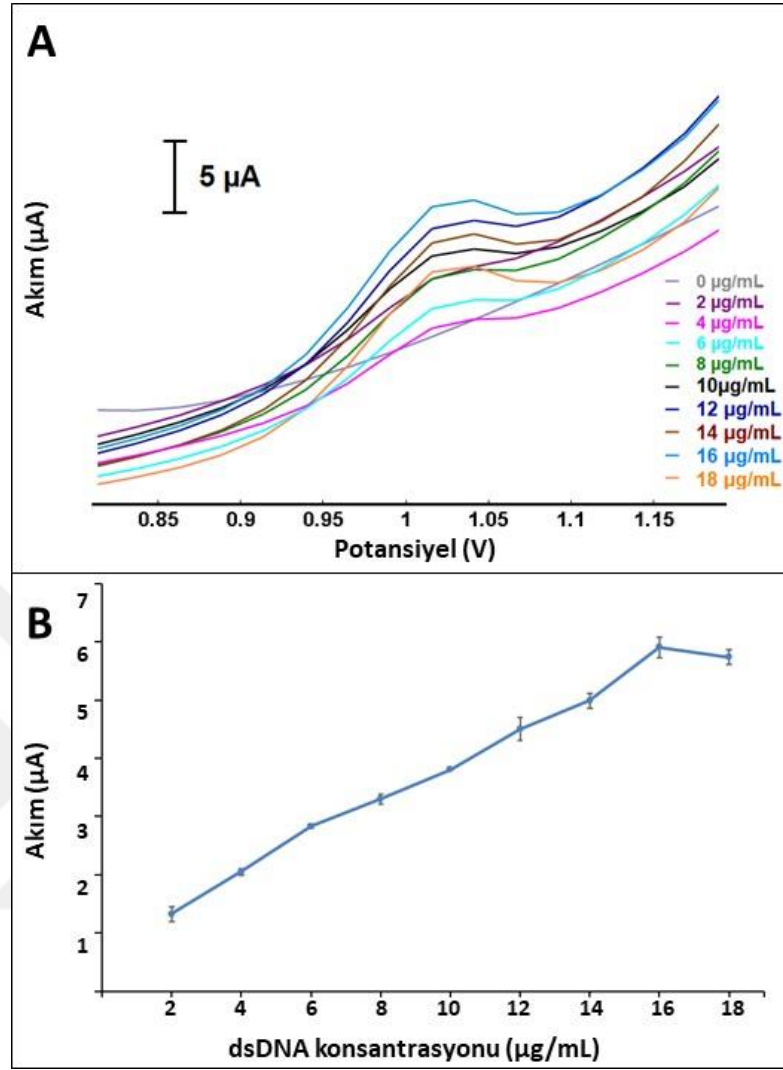
4.3.1. DNA Konsantrasyonundaki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

Elektrot yüzeyine immobilize edilen ctdsDNA konsantrasyonundaki değişimin ölçülen guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen deneylerde +1,00 V civarında ölçülen guanin sinyali şekil 4.6'da voltamogramda gösterilmiştir.

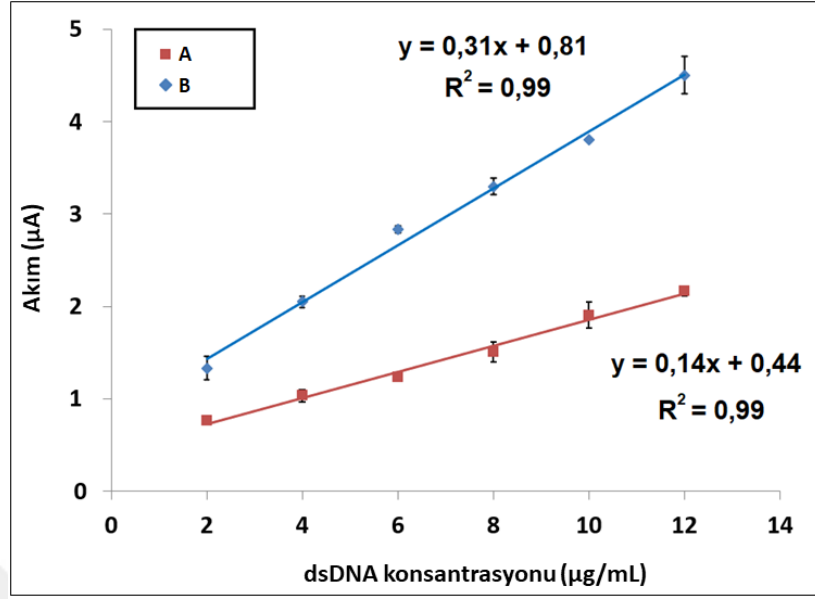


Şekil 4.6. Geliştirilen cihazla 2-14 ug/mL dsDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği

Bu sonuçlara göre elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.8’de gösterilmektedir. Buna göre tayin sınırı 1,10 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Doğrusal regresyon denklemi $I(\mu A) = 0,14[dsDNA](\mu g/mL) + 0,44$ ve $R^2 = 0,99$ olarak bulundu. A-302 cihazı ile aynı koşullarda yapılan deneylerin sonuçları şekil 4.7’de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.8’de gösterilmektedir. A-302 cihazı ile yapılan deneylerde tayin sınırı 0,96 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğrusal regresyon denklemi $I(\mu A) = 0,31[dsDNA](\mu g/mL) + 0,81$ ve $R^2 = 0,99$ olarak bulundu.



Şekil 4.7. AUTOLAB-302 cihazıyla 2-18 ug/mL dsDNA konsantrasyon aralığında alınan voltametrik ölçümlerde elde edilen sonuçlar: (A) Voltamogramlar ve (B) Çizgi grafiği



Şekil 4.8. Her iki elektrokimyasal analizörle voltametrik dsDNA tayinine yönelik elde edilen kalibrasyon grafikleri: (A) Geliştirilen cihaz, (B) AUTOLAB-302.

4.4. DNA-BSA Etkileşiminin Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Bulgular

Proteinler, DNA ve RNA ile etkileşime girdiklerinden dolayı nükleik asitlerin yapısını etkilerler. Bundan dolayı DNA eşleşmesi, onarımı ve rekombinasyonu gibi birçok konuda protein-DNA etkileşiminin incelenmesi önemlidir. Tez çalışmasında bu tür etkileşimleri tayin etmek açısından, kanda yüksek oranda bulunan Albumin proteini hedef alınmıştır. Bunun yanısıra BSA biyosensör geliştirme çalışmalarında sıklıkla bloklayıcı ajan olarak da kullanıldığı için BSA-DNA etkileşimi model olarak seçilmiştir.

Deneyler bölüm 3.8’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Sonuçlar 3.2.2.2’de anlatıldığı şekilde 10 Hz’de filtrelendi. Akım bulma işlemi, 3.2.2.3’de anlatıldığı üzere manuel olarak yapıldı.

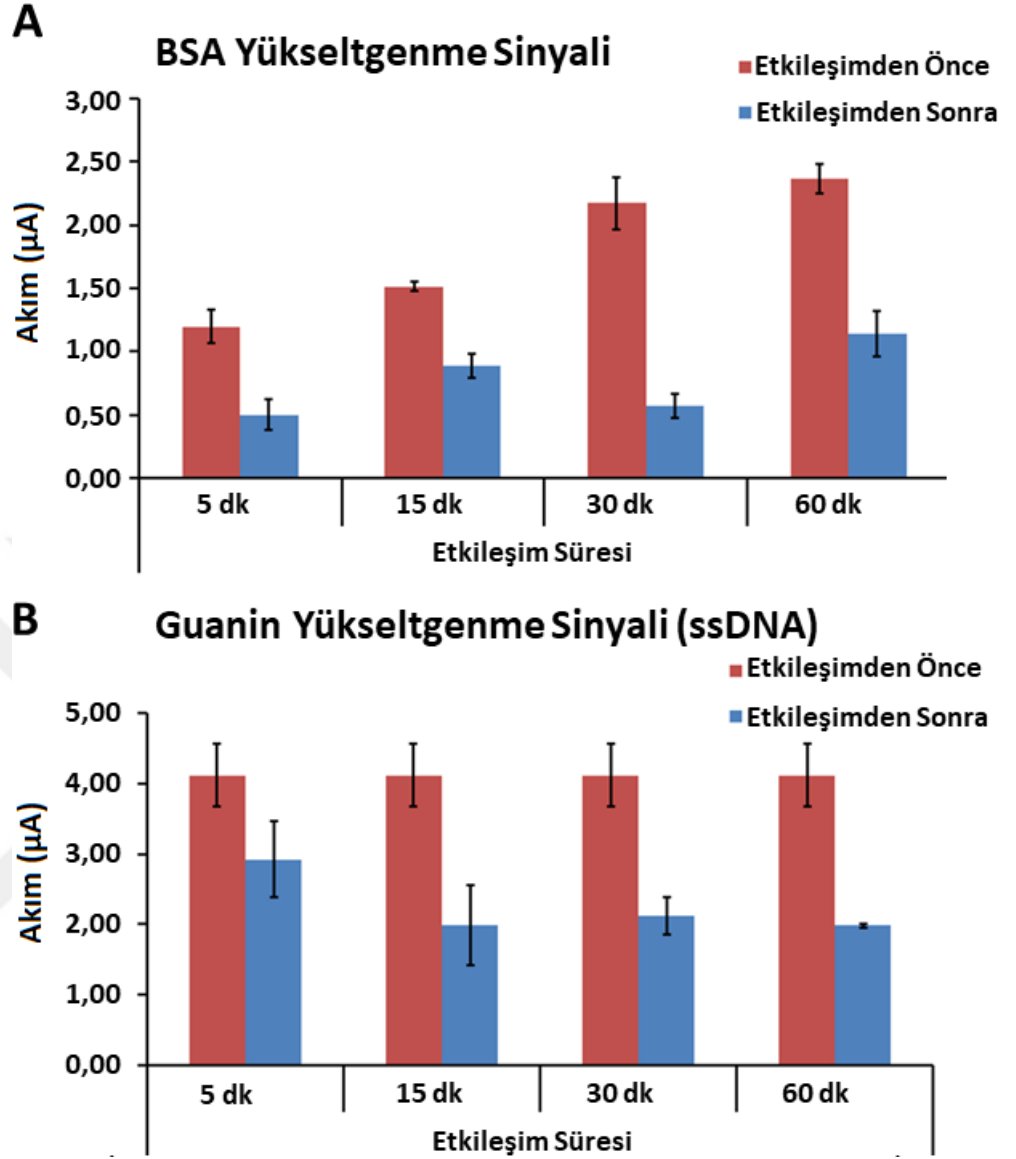
4.4.1. ssDNA-BSA Etkileşim Süresindeki Değişimin Yanıta Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

ssDNA immobilize edilmiş kalem grafit elektrotların BSA çözeltisine

daldırılıp belirli bir etkileşim süresi sonrasında yıkanıp ölçülmesinin ardından elde edilen sonuçlar şekil 4.9’da gösterilmektedir. Deneylerde 5 dakika ile 60 dakika arasında değişen süreler uygulanmış olup, sürenin yanıt üzerine etkisi incelendi. BSA ve guanin yükseltgenme sinyalleri hem etkileşimden önce hem de etkileşimden sonra aynı voltametrik skalada ölçüldü. +0,79V civarında BSA sinyali, +1,01V civarında ise guanin sinyali gözlemlendi. Etkileşim süresine bağlı olarak sinyaldeki yüzdesel değişimler (% azalış), tablo 4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. ssDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi (n =3)

Etkileşim Süresi (dakika)	Etkileşim öncesi BSA sinyali (μA)	Etkileşim sonrası BSA sinyali (μA)	BSA sinyalindeki % azalış	Etkileşimden önce guanin sinyali (μA)	Etkileşimden sonra guanin sinyali (μA)	Guanin sinyalindeki % azalış
5	1,19 $\pm 0,13$	0,50 $\pm 0,12$	%58	4,11 $\pm 0,44$	2,91 $\pm 0,54$	%29
15	1,51 $\pm 0,03$	0,88 $\pm 0,09$	%41	4,11 $\pm 0,44$	1,99 $\pm 0,56$	%51
30	2,17 $\pm 0,20$	0,57 $\pm 0,09$	%73	4,11 $\pm 0,44$	2,12 $\pm 0,26$	%48
60	2,36 $\pm 0,11$	1,14 $\pm 0,17$	%52	4,11 $\pm 0,44$	1,97 $\pm 0,03$	%52



Şekil 4.9. ssDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi: (A) BSA Yükseltgenme Sinyali, (B) Guanin Yükseltgenme Sinyali

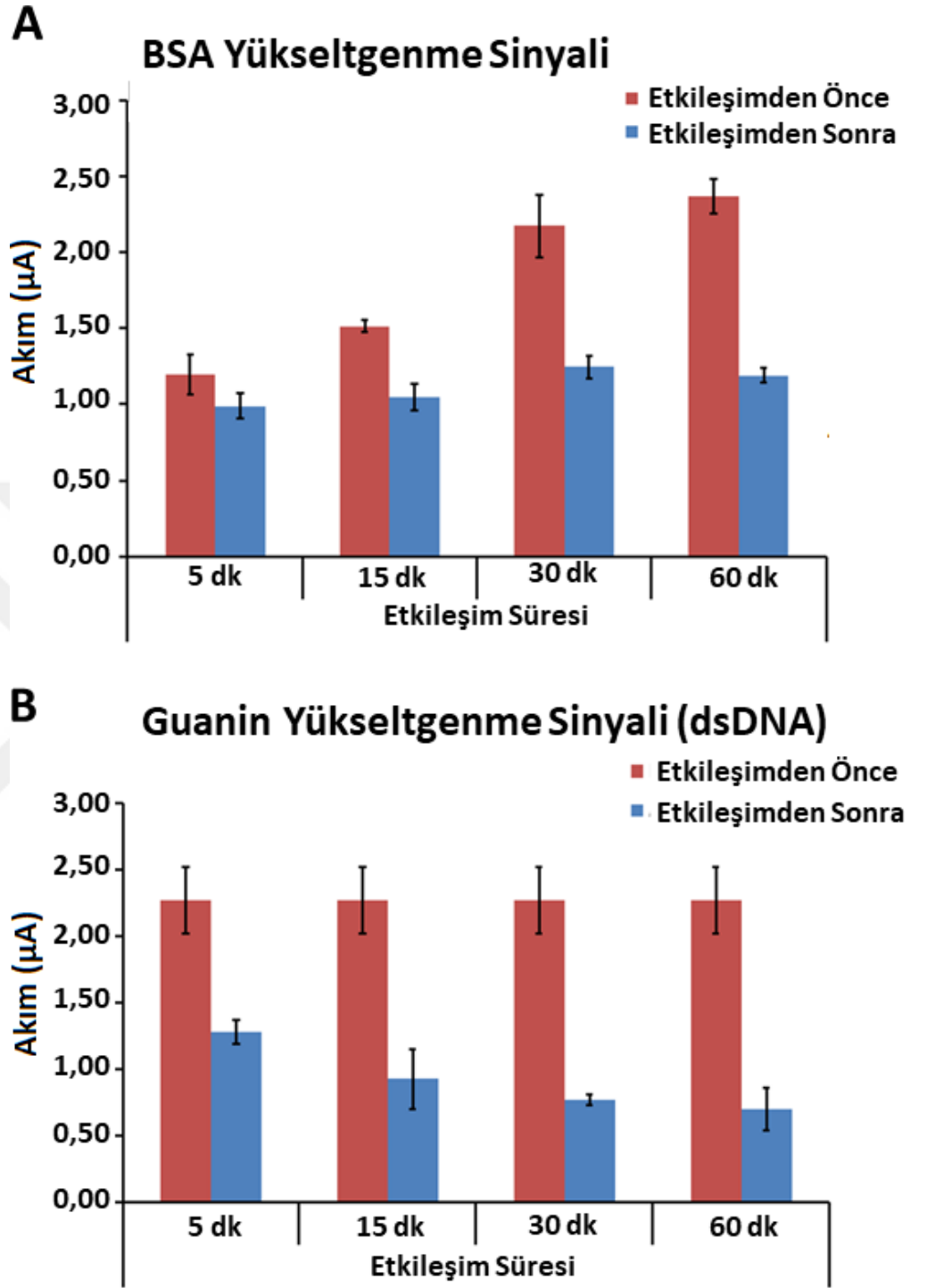
4.4.2. dsDNA-BSA Etkileşim Süresindeki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

dsDNA immobilize edilmiş kalem grafit elektrotların BSA çözeltisine daldırılıp belirli bir etkileşim süresi sonrasında yıkanıp ölçülmesinin ardından elde edilen sonuçlar şekil 4.10'da gösterilmektedir. Deneylerde 5 dakika ile 60 dakika arasında değişen süreler uygulanmış olup, sürenin yanıt üzerine etkisi incelendi. BSA ve guanin yükseltgenme sinyalleri hem etkileşimden önce hem de etkileşimden

sonra aynı voltametrik skalada ölçüldü. +0,79V civarında BSA sinyali, +1,01V civarında ise guanin sinyali gözlemlendi. Etkileşim süresine bağlı olarak sinyaldeki yüzdesel değişimler (% azalış), tablo 4.2’de gösterilmektedir.

Tablo 4.2. dsDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi (n =3)

Etkileşim Süresi (dakika)	Etkileşim öncesi BSA sinyali (μA)	Etkileşim sonrası BSA sinyali (μA)	BSA sinyalindeki % azalış	Etkileşimden önceki guanin sinyali (μA)	Etkileşim sonrası guanin sinyali (μA)	Guanin sinyalindeki % azalış
5	1,19 $\pm 0,13$	0,98 $\pm 0,07$	%17	2,27 $\pm 0,25$	1,28 $\pm 0,08$	%43
15	1,51 $\pm 0,03$	1,04 $\pm 0,08$	%31	2,27 $\pm 0,25$	0,93 $\pm 0,22$	%38
30	2,17 $\pm 0,20$	1,24 $\pm 0,07$	%42	2,27 $\pm 0,25$	0,77 $\pm 0,0$ 4	%66
60	2,36 $\pm 0,11$	1,18 $\pm 0,04$	%69	2,27 $\pm 0,25$	0,70 $\pm 0,1$ 6	%69



Şekil 4.10. dsDNA-BSA etkileşim süresindeki değişimin ölçülen ortalama BSA ve guanin sinyaline etkisi. (a) Yükseltgenme Sinyali, (b) Guanin Yükseltgenme Sinyali.

5. TARTIŞMA

5.1. Tarama Hızındaki Değişimin Ölçülen Akıma Etkisinin İncelenmesine Yönelik Tartışma

Bölüm 2.1.2.1’de anlatıldığı üzere, CV protokolü uygulandığında Şekil 2.4’deki gibi bir grafik çıkması ve akımının tarama hızının kareköküyle orantılı olması beklenmektedir. Şekil 4.1’de görüldüğü üzere CV deney sonuçları simülasyon sonuçlarına benzer çıkmıştır. Şekil 4.2 ise akımının tarama hızının kareköküyle değişimini göstermektedir. Şekilde görüldüğü üzere hem anodik hem katodik akımlarının tarama hızının kareköküyle ilişkisi incelendiğinde aralarında doğrusal bir ilişki ($R^2 = 0,99$) olduğuna karar verildi. Bu doğrusal ilişki difüzyon kontrollü redoks tepkimesinin gerçekleştiğini göstermekte olup literatürde daha önce rapor edilen çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Wu et al., 2016; Erdem and Ozsoz, 2001).

5.2. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctssDNA’nın Voltametrik Tayinine Yönelik Tartışma

Şekil 4.3’da görüldüğü üzere, ssDNA konsantrasyonu arttıkça akım değeri de doğrusal bir şekilde artmaktadır. Bu durumda 2–12 $\mu\text{g/mL}$ aralığında, ssDNA miktarı ile akım arasında $R^2=0,99$ olan ve $I(\mu\text{A}) = 0,25[\text{ssDNA}] (\mu\text{g/mL}) + 0,31$ denklemiyle ifade edilebilen bir ilişki bulunmuştur. Tayin sınırı ise 1,25 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı. Aynı deneyler Autolab A-302 cihazı ile tekrarlandığında ise 2-12 $\mu\text{g/mL}$ aralığında doğrusal artış görüldü. Autolab cihazında yapılan deneylerde ssDNA ile akım arasında $R^2 = 0,98$ olan ve $I(\mu\text{A}) = 0,79 [\text{ssDNA}] (\mu\text{g/mL}) + 1,31$ denklemiyle ifade edilebilen ilişki elde edildi. Tayin sınırı 1,65 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplandı.

5.3. KGE Yüzeyine İmmobilize Edilen ctdsDNA'nın Voltametrik Tayinine Yönelik Tartışma

Şekil 4.6'da histogramda görüldüğü üzere, dsDNA konsantrasyonu arttıkça 1 V civarındaki akım değeri de doğrusal bir şekilde artmaktadır. Bu durumda 0 – 12 µg/mL aralığında yapılan ölçümlerde, dsDNA miktarı ile akım arasında $R^2 = 0,99$ olan ve $I (\mu A) = 0,14[dsDNA] (\mu g/mL) + 0,44$ denklemiyle ifade edilebilen bir ilişki bulunmuştur. Tayin sınırı ise 1,10 µg/mL olarak hesaplandı. Aynı deneyler Autolab A-302 cihazı ile tekrarlandığında ise yine 2–12 µg/mL aralığında doğrusal artış gözlemlendi. Autolab cihazında yapılan deneylerde dsDNA ile akım arasında $R^2 = 0,99$ olan ve $I (\mu A) = 0,31[dsDNA] (\mu g/mL) + 0,81$ denklemiyle ifade edilebilen ilişki elde edildi. Tayin sınırı 0,96 µg/mL olarak hesaplandı.

5.4. DNA-BSA Etkileşim Süresindeki Değişimin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Tartışma

DNA ve protein etkileşimi 5 dk ile 60 dk arasında farklı etkileşim sürelerinde incelendi. ssDNA-BSA etkileşiminde, etkileşim süresinden bağımsız olarak hem guanin sinyalinde hem de BSA sinyalinde azalış gözlemlendi. Ancak etkileşim süresi ile azalış miktarı arasında doğrusal bir ilişki bulunamadı.

dsDNA-BSA etkileşiminde, etkileşim süresi arttıkça BSA sinyalinde sürekli bir azalış gözlemlendi. Guanin sinyalinde ise 15 dakikalık etkileşim süresi dışında azalma yüzdesinde sürekli bir azalış gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlar BSA ile çift sarmal DNA etkileşiminin daha uzun sürelerde daha etkin bir şekilde meydana geldiği şeklinde açıklanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasının ilk bölümünde elde taşınabilir, minyatür bir cihazla elektrokimyasal analizleri gerçekleştirebilmek için gerekli elektronik ve yazılım teknikleri anlatıldı. Karmaşık sinyal devre tasarımı kurallarına uygun olarak devre tasarımı yapıldı. Masaüstü cihazlara benzer performans göstermesi ve bunu daha az maliyetli, basit ve kompakt yollarla yapabilmek için bir referans direnç kullanılarak kalibrasyon işlemi yapıldı. Verileri işlemek ve görselleştirmek için QT programı kullanılarak bir masaüstü arayüzü oluşturuldu. Bu arayüze sayısal alçak geçiren filtre gibi özellikler eklendi. Sonuçta elde edilen cihaz ile $\pm 2,0$ V aralığında ± 10 mA'e kadar olan akımları 6 pA çözünürlükle ölçebilen bir cihaz elde edilmiş oldu. Bu özellikler sayesinde yüksek taban akımına sahip olan DNA'nın elektroaktif bazı olan guanine ait yükseltgenme sinyali +1 V civarında ölçülerek DNA elektrokimyasal yöntemle tayin edildi.

Tez çalışmasında geliştirilen cihaz ile uygulanan DPV protokolünde puls verildikten sonraki sinyal ile puls verilmeden önceki sinyalin farkının alınması işlemi elektronik olarak gerçekleştirilememiştir. Örneğin çalışmada +1 V civarında akım ölçüldüğünde 100 μ A civarında taban akımı okunmuştur. Ardından puls uyarısı verildiğinde 100 μ A + 100 nA civarında akım okunmuştur. Sonuçta bu ikisinin farkı alınarak 100 nA'lık sinyal elde edilmiştir. Bu işlem ise yazılımsal olarak yapılmaktadır. Dolayısıyla, aslında istenilen akımın değeri 100 nA civarlarında olsa da gerçekte ölçülen sinyal ondan 1000 kat daha büyük değerdedir. Bu yüzden de TIA devresinin kazancı bu 1000 kat büyük olan akıma göre seçilmektedir. Bu durum DPV yöntemine dayalı deneylerde tayin sınırını oldukça düşürmektedir. Ancak DPV protokolündeki bu fark alma işlemi geliştirilerek elektronik olarak yapılabilirse çözünürlük oldukça artabilir.

Tezin ikinci aşamasında ise kalem grafit elektrotlar kullanılarak DNA biyosensörün geliştirilmesi ve uygulamasına yönelik deneyler yapıldı. Öncelikle elektrotların karakterizasyonu için farklı tarama hızlarında CV deneyleri yapıldı ve tarama hızıyla ölçülen akımın ilişkisi incelendi; aralarında doğrusal bir ilişki

bulundu. Ardından kalem grafit elektrotlar üzerine buzağı timüs bezinden elde edilen ssDNA ve dsDNA immobilize edilerek geliştirilen cihaz ile voltametrik DNA tayini yapıldı. Aynı deneyler Autolab PGSTAT-302 cihazı ile tekrar yapılarak sonuçlar kıyaslandı.

Tezde geliştirilen cihazla ssDNA için 1,25 µg/mL tayin sınırı bulunurken, Autolab cihazı ile tayin sınırı 1,65 µg/mL olarak hesaplandı. dsDNA için tayin sınırı 1,10 µg/mL olarak bulunurken, Autolab cihazı ile tayin sınırı 0,96 µg/mL olarak hesaplandı. Çalışmanın son aşamasında BSA-DNA etkileşimi artan süre bazında incelendi ve BSA'nın DNA ile zamanla artan oranda etkin bir etkileşimi olduğuna karar verildi.

Tez çalışmasında geliştirilen cihaz ile grafit kalem uçlarına özel bir deney düzeneği hazırlanarak sözkonusu deneyler otomatikleştirilebilir ve böylece birden çok elektrokimyasal ölçüm aynı anda yapılabilir. Tez çalışmasında tek kanallı çalışma elektrodu kullanılmış olup her bir deney için aynı deneysel prosedürün tekrarlanmasıdır. Ancak uygun bir düzenek ile deneyler ardarda veya eş zamanlı olarak ya da en azından deney düzeneğini hiç ellemeden otomatik olarak yapılabilir. Bunun için çalışma elektroduna analog anahtar eklenmeli ve elektrotları tutacak bir mekanik düzenek geliştirilmelidir. Böylece daha gelişmiş ve portatif özellikte olan elektrokimyasal biyoalgılayıcılar geliştirilebilir.

Sonuç olarak, tez çalışmasında geliştirilen elde taşınabilir elektrokimyasal temelli biyoalgılayıcı sayesinde, kullanımı kolay, ucuz ve hassas sonuç veren, taşınabilir bir cihaz geliştirildi ve bu cihazla DNA-protein etkileşimi incelendi. Dolayısıyla nükleik asit ve proteinlerin elektrokimyasal analizine yönelik elde taşınabilir cihaza entegre yeni biyosensörlerin geliştirilmesi sayesinde gelecekte birçok biyoanalitin pratik ve hızlı bir şekilde analizleri mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Attia P.**, “Cyclic Voltametry App: Code”,
https://petermattia.com/cyclic_voltammetry_simulation/code.html,
(Erişim tarihi: 15 Ocak 2021).
- Bagotsky, V.S.**, 2005, Fundamentals of Electrochemistry, Wiley Interscience, USA, 752p.
- Bard, A.J. and Faulkner L.R.**, 2001, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, USA, 864p.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. and Estrela, P.**, 2016, Introduction to Biosensors, *Essays Biochem*, 60:1–8 pp.
- Brownson, D.A.C. and Banks, C.E.**, 2014, Interpreting Electrochemistry, Springer, London, 23–77 pp.
- Carminati, M., Rottigni, A., Alagna, D., Ferrari, G. and Sampietro, M.**, 2012, Compact FPGA-based elaboration platform for wide-bandwidth electrochemical measurements, *2012 IEEE I2MTC- International Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings*, 264–267 pp.
- Compton, R.G., Laborda, E. and Ward, K.R.**, 2014, Understanding Voltammetry, Imperial College Press, London, 1–24 pp.
- Congur, G., Eksin, E. and Erdem, A.**, 2015. Impedimetric Detection of microRNA at Graphene Oxide Modified Sensors, *Electrochim. Acta*, 172:20–27 pp.
- Cox, M. M. and Nelson, D.L.**, 2017, Lehninger Principles of Biochemistry, WH Freeman, USA, 1328p.
- Crescentini, M., Bennati, M., Carminati, M. and Tartagni, M.**, 2014, Noise limits of CMOS current interfaces for biosensors: A review, *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, 8:278–292 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cruz, A.F.D., Norena, N., Kaushik, A. and Bhansali, S., 2014, A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis, *Biosens Bioelectron.*, 62:249–254 pp.

Doelling, R., 2000, Potentiostats, Bank Elektronik, USA, 57p.

Eksin, E., Zor, E., Erdem, A. and Bingol, H., 2017, Electrochemical monitoring of biointeraction by graphene-based material modified pencil graphite electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 92:207–214 pp.

Eksin, E., Polat, D. and Erdem, A., 2019, Voltammetric and Impedimetric Detection of Interaction Between Dacarbazine and Nucleic Acids, *Electroanalysis*, 31:2012–2019 pp.

Elgrishi, N.N., Rountree, K.J., Mccarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T. and Dempsey, J.L., 2018, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.*, 95(2):197-206 pp.

Erdem, A. and Ozsoz, M., 2001, Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal. Chim. Acta*, 437:107–114 pp.

Erdem, A., Congur, G. and Eksin, E., 2013, Multi channel screen printed array of electrodes for enzyme-linked voltammetric detection of MicroRNAs, *Sensors Actuators, B Chem.*, 188:1089–1095 pp.

Erdem, A., Muti, M., Mese, F. and Eksin, E., 2014, Chitosan-ionic liquid modified single- use sensor for electrochemical monitoring of sequence-selective DNA hybridization, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 114:261–268 pp.

Erdem, A., Eksin, E., Kesici, E., Yaralı, E. and Kanat, E., 2019, Single-use sensor technology for monitoring of zearalenone in foods: ZentoSens, *Microchem. J.*, 147:37– 42 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fulgione, A., Cimafonte, M., Ventura, B. Della, Iannaccone, M., Ambrosino, C., Capuano, F., Thérèse, Y., Proroga, R., Velotta, R. And Capparelli, R., 2018, QCM- based immunosensor for rapid detection of Salmonella Typhimurium in food, *Sci. Reports*, 8:16137.

Gagne, R.R., Koval, C.A. and Lisensky, G.C., 1980, Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements, *Inorg. Chem*, 19:2854–2855 pp.

Gu, Z., Liu, H.X., Ying, Y.L., Xiu, G. and Long, Y.T., 2018, A thumb-size electrochemical system for portable sensors, *Analyst*, 143:2760–2764 pp.

Gupta, V.K., Ganjali, M.R., Norouzi, P., Khani, H., Nayak, A. And Agarwal, S., 2011, Electrochemical analysis of some toxic metals by ion-selective electrodes, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 282-313 pp.

Hu, Y., Sharma, S., Weatherwax, J., Cass, A. and Georgiou, P., 2016, A portable multi- channel potentiostat for real-time amperometric measurement of multi-electrode sensor arrays, *IEEE International Symposium on Circuits and Systems, Institute of Electrical and Electronics Engineers*, 1306–1309 pp.

Hunter, L., 1993, Molecular biology for computer scientists, *Artif. Intell. Mol. Biol.*, MIT Press, USA, 1–46 pp.

Ifeachor, E.C. and Jervis, B.W., 2002, Digital Signal Processing: A Practical Approach, Pearson, UK, 960p.

Jalal, A.H., Umasankar, Y., Gonzalez, P.J., Alfonso, A. and Bhansali, S., 2017, Multimodal technique to eliminate humidity interference for specific detection of ethanol, *Biosens. Bioelectron.*, 87:522–530 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kari, L., Kitto, R. and Gloor, G., 2001, A computer scientist's guide to molecular biology, *Soft Comput.*, 5:95–101 pp.

Karunakaran, C., Bhargava, K. and Benjamin, R., 2015, Biosensors and Bioelectronics, Elsevier, Netherlands, 344p.

Lambrechts, M.S., 2019, Biosensors: Microelectrochemical Devices, CRC Press, USA, 316p.

Liang, J., Yao, C., Li, X., Wu, Z., Huang, C., Fu, Q., Lan, C., Cao, D. and Tang, Y., 2015, Silver nanoprism etching-based plasmonic ELISA for the high sensitive detection of prostate-specific antigen, *Biosens. Bioelectron.*, 69:128–134 pp.

Palecek, E., 2002, Past, present and future of nucleic acids electrochemistry, *Talanta*, 56:809–819 pp.

Palmisano, F., Zambonin, P.G., Centonze, D. and Quinto, M., 2002, A disposable, reagentless, third-generation glucose biosensor based on overoxidized poly(pyrrole)/tetrathiafulvalene -Tetracyanoquinodimethane composite, *Anal. Chem.*, 74:5913–5918 pp.

Pandey A., Sharma, S., Jain, R. and Raja, A.N., 2020, Review- Pencil Graphite Electrode: An Emerging Sensing Material, *J. Electrochem. Soc.*, 167:037501.

Pohanka, M. and Skládal, P., 2007, Piezoelectric immunosensor for the direct and rapid detection of *Francisella tularensis*, *Folia Microbiol.*, 52:325–30 pp.

Renneberg, R., Pfeiffer, D., Lisdat, F., Wilson, G., Wollenberger, U., Ligler, F. and Turner, A.P.F., 2007, Frieder scheller and the short history of biosensors, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 109:1–18 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sengiz, C., Congur, G., Eksin, E. and Erdem, A., 2015, Multiwalled Carbon Nanotubes- Chitosan Modified Single-Use Biosensors for Electrochemical Monitoring of Drug- DNA Interactions, *Electroanalysis*, 27:1855–1863 pp.

Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A., 2017, Principles of instrumental analysis, Brooks Cole, USA, 992p.

Sun, A., Wambach, T., Venkatesh, A.G. and Hall, D.A., 2014. A low-cost smartphone- based electrochemical biosensor for point-of-care diagnostics, *IEEE 2014 Biomedical Circuits and Systems Conference, BioCAS 2014 – Proceedings, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.*, 312–315 pp.

Turner, A.P.F., 2013, Biosensors: Sense and sensibility, *Chem. Soc. Rev.*, 42:3184–3196 pp.

Urban, G., Jobst, G., Keplinger, F., Aschauer, E., Tilado, O., Fasching, R. and Kohl, F., 1992, Miniaturized multi-enzyme biosensors integrated with pH sensors on flexible polymer carriers for in vivo applications, *Biosens. Bioelectron.*, 7:733–739 pp.

Vergani, M., Carminati, M., Ferrari, G., Sampietro, M., Amato, L., Heiskanen, A., Dimaki, M., Svendsen, W.E. and Emneus, J., 2012, Compact potentiostat for cellular electrochemical imaging with 54 parallel channels, *2012 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference: Intelligent Biomedical Electronics and Systems for Better Life and Better Environment, BioCAS 2012 – Conference Publications*, 136–139 pp.

Voet, D., Voet, J. and Pratt, C.W., 2016, Fundamentals of Biochemistry, Wiley, USA, 1184p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wang, J., 2006, Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics, *Biosensors and Bioelectronics.*, 1887–1892 pp.

Wu, J., Wang, W., Wang, M., Liu, H. and Pan, H., 2016, Electrochemical Behavior and Direct Quantitative Determination of Tanshinone II A in Micro-emulsion, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 11:5165–5179 pp.

Wang, J., 2008, Electrochemical Glucose Biosensors, *Chem. Rev.*, 108:814–825 pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca, yanında çalışmaktan onur duyduğum, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN'a,

Solar Biyoteknoloji firmasında çalıştığım süre boyunca yanında çalışmaktan onur duyduğum, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Sayın Dr. Yalın KILIÇ ve Özlem KILIÇ'a,

Tez çalışmaları sırasında desteklerini gördüğüm başta Ece olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

23/02/2021

Alper DEMİRHAN

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Alper DEMİRHAN

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi- Biyoteknoloji ABD

Lisans: Dokuz Eylül Üniversitesi- Elektrik/Elektronik Mühendisliği

