

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

PROTEİN ALGILAMASINA YÖNELİK
NANO-BİYOSENSÖRLERİN YENİ MALZEME VE TEKNİKLERLE
GELİŞTİRİLMESİ

Mustafa YÜKSEL

2012

KIRIKKALE

Fizik Anabilim Dalında Mustafa YÜKSEL tarafından hazırlanan PROTEİN ALGILAMASINA YÖNELİK NANO-BİYOSENSÖRLERİN YENİ MALZEME VE TEKNİKLERLE GELİŞTİRİLMESİ adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Saffet NEZİR
Anabilim Dalı Başkanı

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

Yrd. Doç. Dr. Ali Kemal OKYAY

Prof. Dr. Sedat AĞAN

Ortak Danışman

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sedat AĞAN _____

Üye :Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM _____

Üye : Doç. Dr. Zafer EVİS _____

Üye : Yrd. Doç. Dr. Necmi BIYIKLI _____

Üye : Yrd. Doç. Dr. Erdem YAŞAR _____

...../...../.....

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

PROTEİN ALGILAMASINA YÖNELİK NANO-BİYOSENSÖRLERİN YENİ MALZEME VE TEKNİKLERLE GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEL, Mustafa

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı, Doktora tezi

Danışman: Prof. Sedat AĞAN

Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ali Kemal OKYAY

Temmuz 2012, 82 sayfa

Bu tezde protein algılamasına yönelik nano biyosensörlerin, yeni malzemeler ve tekniklerle geliştirilmesi araştırılmıştır. Dikey kapasitör sensörler tasarlanmış olup, metal kaplama için altın ve krom malzemeleri kullanıldı. Metal plakaların arasına ise dielektrik malzeme olarak SiO_2 ve Al_2O_3 malzemeleri kullanıldı. Nano boşluklu kapasitif nano biyosensörlerin fabrikasyonu ve düşük frekans değerlerinde (1 kHz – 100 kHz) karakterizasyonu konusu araştırıldı. Geliştirilen etiketsiz kapasitif nano biyosensörlerin 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml ve 10 ng/ml konsantrasyonlarındaki streptavidin proteinlerini algılaması araştırıldı. Yapılan

deneysel çalışmalar sonucunda farklı konsantrasyonları birbirinden ayırt edebildiği görüldü. Ayrıca, farklı boyutlardaki sensör yapılarının algılama hassasiyetine etkisi, ıslak aşındırma süresinin algılama hassasiyetiyle ilişkisi ve streptavidinlerin fonksiyonelize edilen yüzeylere bağlanma süresi araştırılmıştır. Yapılan araştırmaların sonucunda, farklı boyutlara sahip sensörlerin algılama hassasiyetlerinin farklı olduğu gösterilmiştir. Üretilen nano biyosensörlerin tekrarlanabilirlik, kararlılık ve güvenilirlik testleri yapılmış olup, güvenilirliği ispatlanmıştır. Bu biyosensörler 10 mVrms'te çalışırlar ve düşük güç platformları sunarlar. Hedef proteinleri algılamada dielektriğe karşı duyarlılık dielektrik katsayısı birim değişikliği başına 132 pF'dir. Ayrıca, farklı boyutlara sahip olan dört aygıtta 100μg/ml konsantrasyonunda streptavidin uygulanmıştır. Aygıtların kapasitans (C_p) değerlerinde %10 ile %16 arasında bir değişim görülmüştür. Streptavidin bağlanma deneyi sonuçlarına göre, 100μg/ml konsantrasyonundaki straptavidinin bağlanması için +4°C sıcaklıkta 30 dakika bekletmenin yeterli olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, nano aralık, elektriksel ift katman, impedimetrik biyosensor, streptavidin, biotin.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NANO-BIOSENSORS FOR DETECTION OF PROTEIN BY NEW MATERIALS AND TECHNIQUES

YÜKSEL, Mustafa

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Physics, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sedat AĞAN

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ali Kemal OKYAY

July 2012, 82 pages

In this thesis, development of nano-biosensors intended protein detection by new materials and techniques was investigated. The vertical capacitor sensors were designed and gold and chrome materials were used for metal coating. SiO₂ and Al₂O₃ materials were used as dielectric materials between the plates of metals. Fabrication of capacitive nano-biosensors with nano gap and characterization at low frequency ranges (1 kHz – 100 kHz) were investigated., Detection of streptavidin proteins in 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml and 10 ng/ml concentrations were investigated by developed unlabelled capacitive nano-biosensors. As a result of experimental studies, it was seen to be able to distinguish different concentrations from each other. Also, the effect of sensor structures having different dimensions on the detection sensitivity, the relationship between wet etching time and detection sensitivity and the binding time of streptavidins to functionalized surfaces were

investigated. As a result of the investigations, detection sensitivities of the sensors with different dimensions were shown to be different. The repeatability, stability and reliability tests of fabricated nano-biosensors were performed and their reliabilities were proved. These biosensors work at 10 mVrms and provide low power platforms. Sensitivity to dielectric in detecting the target proteins, dielectric coefficient is 132 pF per unit change. Moreover, 100 μ g/ml concentration of streptavidin was applied to the four devices with different dimensions. In the capacitance values of devices, a change between 10% to 16% was observed. According to the results of streptavidin-binding experiments, it was shown that in order to bind 100 μ g/ml of streptavidin concentration, a temperature of +4 °C for 30 minutes was found to be sufficient.

Keywords: Biosensor, Nanogap, electrical double layer, impedimetric biosensor, streptavidin, biotin

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında, her türlü yardımını esirgemeyen tez yöneticisi hocam Sayın Prof. Dr. Sedat AĞAN'a, ortak tez yöneticisi hocam Bilkent Üniversitesi Elektrik Elektronik Mühendisliği öğretim üyesi Sayın Ali Kemal OKYAY'a ve deney imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine veren Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma merkezi temiz oda sorumlusu, öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Necmi BIYIKLI'ya, ortak çalışma yürüttüğümüz değerli arkadaşım Bilkent Üniversitesi Elektrik Elektronik Mühendisliği Araştırma görevlisi ve Yüksek Lisans öğrencisi Oğuz HANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yüzey fonksiyonallizasyon işlemlerinde yardımcı olan ve tez çalışmamda büyük katkıları olan Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma merkezi öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Özgür GÜLER ve doktora öğrencisi Handan ACAR'a, Bilkent Üniversitesi Elektrik Elektronik Mühendisliği doktora öğrencisi Ferhat TAŞDEMİR'e, SEM görüntülerinde yardımcı olan doktora sonrası araştırmacı Muhammed GAFFARİ'ye teşekkür etmeyi borç bilirim.

Ayrıca, Doktora tez izleme komitemde yer alan ve tezimin gelişim sürecinde büyük katkıları olan Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü müdürü Sayın Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM ve Ortadoğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Zafer EVİS'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu tez çalışmasına Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel araştırmalar biriminin, 2011/05 numaralı proje ile ve Fatih Üniversitesi Bilimsel araştırmalar biriminin P54121101_B(1588) numaralı proje ile verdiği destekten dolayı teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen değerli Babam İmdat YÜKSEL'e ve annem Emine YÜKSEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin hazırlanması aşamasında desteğini sürekli hissettiğim sevgili eşim Sevda YÜKSEL'e, oğlum Talha YÜKSEL'e ve kızım Büşra YÜKSEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyolojik algılayıcılar (Biyoreseptörler):	5
1.2. Dönüştürücüler (Transduserler).....	8
1.3. Biyosensörlerin İletim Mekanizmaları	9
1.4. İdeal bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler	11
1.5. Biyosensörlerin Kullanım Alanları	14
1.6. Vitaminler.....	16
1.7. Streptavidin-biyotin İlişkisi.....	18
1.8. Tampon Çözeltiler	18
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1. Isısal Buharlaştırma Sistemi	20
2.2. Plazma ile Güçlendirilmiş Kimyasal Buhar Depolama Sistemi (PECVD).	21
2.3. Fotolitografi.....	24
2.4. Nano Aralık Temelli Kapasitif Biyosensörler.....	25
2.5. Sensör Tasarımı	29
2.6. Sensör Fabrikasyonu	34
2.6.1. Alttaş ve Yüzey Hazırlığı.....	35
2.6.2. Alt Elektrotun Büyütülmesi	35
2.6.3. Dielektrik Katmanların Büyütülmesi	36
2.6.4. Üst Elektrotun Desenlendirilmesi	38

2.6.5.	Üst elektrotun Kaplanması ve Kaldırma İşlemi (lift-off).....	38
2.6.6.	Nano Aralık Oluşturma	40
2.7.	Sensör yüzeyinin fonksiyonallığı ve biyotinle kaplanması	42
2.8.	Ölçüm Sistemi	47
2.9.	Biyosensör Uygulamaları İçin Empedans Spektroskopisi	49
2.9.1.	Dielektrik sabiti (Bağıl geçirgenlik ϵ_r).....	51
2.9.2.	Paralel levha kondansatörler	54
2.9.3.	Elektriksel çift katman	55
3.	ARAŞTIRMA BULGULARI	57
3.1.	Hedef proteini algılama hassasiyeti.....	57
3.2.	Dielektrik katman olarak sadece 42nm Al_2O_3 büyütülerek üretilen yeni biyosensörler ile farklı solüsyonların dielektrik sabitlerinin algılanması	65
3.3.	Güvenilirlik testleri.....	72
3.3.1.	Kararlılık testleri.....	73
3.3.2.	Tekrarlanabilirlik testleri	74
3.4.	Aşındırma süresi, Kapasitans değişimi ilişkisi deneyleri	76
3.5.	Streptavidin bağlanma süresi deneyleri.....	77
3.6.	Farklı geometrilere sahip aygıtların algılama hassasiyetlerinin karşılaştırılması	78
4.	SONUÇ	80
	KAYNAKLAR	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
1. 1. Bir biyosensörün temel bileşenleri.....	4
1. 2. Tipik bir biyosensör yapısı.....	5
1. 3. Biyosensörün yapısı ve çalışma prensibi	5
1. 4. Etiketli ve etiketsiz algılama sistemi.....	10
1. 5. BSA ve Pbs-t nin yüzeye spesifik bağlama işlemi esnasında kullanım şekli	12
1.6. Güvenilir bir biyosensörün tekrarlanabilirlik ve kararlılık ölçümünü gösteren grafik	13
1. 7. Cevap zamanı ve tolerans bandı gösterim grafiği	14
2.1. Isısal buharlaştırma sistemi (UNAM-Vaksis PVD Vapor – 3S).....	21
2.2. Plazma ile güçlendirilmiş kimyasal buhar depolama (PECVD) sistemi.....	23
2.3. PECVD Cihazı (UNAM-CVD-Handy)	24
2.4. Fotolitografi ile örneğin transferinin gösterimi.....	25
2.5. Yatay nano aralıklı aygıtlar a) klasik yatay aygıtın kesit görüntüsü. b, c ve d) literatürdeki bazı yatay aygıtlar	27
2.6 Dikey nano aralıklı aygıtlar a) tipik bir dikey nano aralıklı aygıtın kesit şekli b ve c) literatürdeki bazı dikey nano aralıklı aygıtlar	28
2.7. Tasarlanan sensörün görünümü ve çalışma prensibi. a) tasarlanan sensörlerin çalışma prensibi, b-c) parmakların önden kesit görünümü, d) tasarlanan sensörlerin boyutlarının gösterimi	30
2.8. Nano aralıklı biyosensörün devre modellemesi a) Nano aralık paralel kapasitörleri, (C_1 ve C_2) ve direnç (R_1 ve R_2) modellemesi, dielektrik katman kapasitör modellemesi (C_3). b) Eşdeğer devre modellemesi	32
2.9. a) Fabrikasyon aşamalarının gösterimi ve b) fabrikasyon sonunda elde edilen aygıtların gösterimi	34
2.10. Isısal buharlaştırma yöntemi ile alt elektrotun büyütülmesi aşaması.....	36

2.11. Dielektrik katmanların büyütülmesi aşaması	37
2.12. Isısal buharlaştırma yöntemi ile üst elektrotun kaplanma şekli	39
2.13. Kaldırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli	39
2.14. Islak aşındırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli.....	40
2.15.a ve b Üretilen biyosensörlerin fonksiyonalizasyon öncesi SEM görüntüleri ...	41
2.16. a) SiO ₂ yüzeyindeki serbest hidroksil grupların gösterimi, b) SiO ₂ yüzeyindeki serbest hidroksil grupları ile APTS'in bağlanma mekaniği ve biyotin streptavidin bağlanması, c) Biyotin streptavidin bağlanma mekaniği ve d) Yüzeyin biyotinle kaplanma mekaniği ve biyotin streptavidin bağlanmasının kimyasal gösterimi	44
2.17. Yüzey fonksiyonalizasyon işleminden sonra alınan XPS sonuçları. , a) SiO ₂ ile kaplanan test örneğinin yüzey XPS sonuçları ve b) Au ile kaplanan test örneğinin yüzey XPS sonuçları	45
2.18. Test örneklerinin fonksiyonalizasyondan sonraki XPS sonuçları.....	46
2.19. UNAM temiz odada bulunan parametre analizörü ve prob istasyonu	47
2.20. Vakum haznesindeki örneğin mikro-ığneler vasıtasıyla elektriksel ölçümler için bağlantı alınmış durumdaki görünümü	48
2.21. Parametre analizörü ile prob istasyonunun bağlantı şeması (CVU kullanma klavuzu).....	48
2.22. Voltaj-akım sinyali grafiği	50
2.23. Karmaşık düzlemde empedansın garifsel olarak gösterimi	50
2.24. Uygulanan elektrik alanda dipollerin dizilim şekli	53
2.25. Paralel levha kapasitör	54
2.26. Paralel plakalı kapasitörün kesit görünümü	55
3.1. Damıtılmış suyun örneğe mikro-pipetle uygulanma şekli	58
3.2. Yapıların üzerine streptavidinler damlatılmış durumdaki görüntüsü.....	59
3.3. a) 100µg/ml streptavidin uygulanan sensörün, b) 10µg/ml streptavidin uygulanan sensörün, c) 1µg/ml streptavidin uygulanan sensörün, c) 100ng/ml streptavidin uygulanan sensörün ve d) 10ng/ml streptavidin uygulanan sensörün edilen kapasitansın (C _p) frekansa (f) göre değişimi grafikleri	61

3.4.Farklı konsantrasyonlardaki streptavidin çözeltilerinin sensörlerde meydana getirdikleri kapasitans değişim yüzdesi- frekans grafikleri	62
3.5. Al ₂ O ₃ ’ lı yapıların şeması ve çalışma prensibi.....	65
3.6. Yapıların odaklandırılmış iyon demeti taramalı elektron mikroskobu (FIB SEM) görüntüleri.....	66
3.7. Tekrarlanabilirlik testi ölçüm şeklinin gösterimi	67
3.8. Farklı solüsyonlar için 10 kHz frekans değerinde kapasitans zaman değişim grafikleri.....	67
3.9 Ortalama C _p değerlerine göre çizilen ve fit edilen kapasitans dielektrik sabit grafiği	69
3.10. Deneysel ve tahmini C _p değerleri karşılaştırma eğrileri	70
3.11. a) Kısa yatay aşınma olması durumunda, b) daha uzun yatay aşınma olması durumunda, yüzey bağlanmalarının gösterimi	71
3.12. Islak aşındırma işlemleri sonrasında 10 kHz'de gerçekleştirilen ölçüm grafiği	71
3.13. Farklı aşındırma sürelerine göre DI su içerisinde alınmış kapasitans değerleri	72
3.14. Kararlılık doğrulama için, 50 kHz frekans değerinde 20 dk. boyunca alınan kapasitans (C _p)- zaman değişim grafiği (0-1400 s. aralığı)	73
3.15. Kararlılık doğrulama için, 50 kHz frekans değerinde 20 dk. boyunca alınan kapasitans (C _p)- zaman değişim grafiği (0-60 s. aralığı büyütülmüş grafik)	74
3.16. Üst üste altı kez alınan kuru ve DI sudaki kapasitans- zaman değişim grafiği.	75
3.17. Farklı aşındırma sürelerinin biyotinyelleme ve streptavidin bağlama sonrası kapasitans değerlerinin karşılaştırılması grafiği	76
3.18. Aşındırma süresi, kapasitans değişim yüzdesi grafiği.....	76
3.19. 30 dk ve 600 dk. Streptavidin beklemesi sonucu meydana gelen kapasitans değişimi grafikleri	77
3.20. 30 dk. Ve 600 dk. Streptavidin bekletilmesi sonucu meydana gelen kapasitans değişimlerinin karşılaştırılması	77
Şekil 3.21. Negatif kaldırma işlemine uygun olarak tasarlanan maske ve biyosensör çeşitlerinin boyutları	78
3.22.Farklı geometrilere sahip biyosensörlerin (21 nm Al ₂ O ₃ dielektrik) şekli.....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
1.1. Uygun algılayıcı-çevirici bileşenleri ve literatürde geçen günümüzdeki durumları	6
2.1. Bazı malzemelere ait referans faktörleri	21
2.2. Tasarladığımız sensörü oluşturan parçaların boyutları	31
2.3. Bu çalışmada kullanılan farklı solüsyonların, dielektrik ve biyolojik malzemelerin dielektrik sabit değerleri.....	33
2.4. Empedansla ilgili temel eşitlik ve tanımlar	51
2.5. Bu çalışmada kullanılan farklı solüsyonların, dielektrik ve biyolojik malzemelerin dielektrik sabit değerleri.....	53
3.1. Bu çalışmada kullanılan Streptavidin konsantrasyonları	57
3.2. Farklı konsantrasyonlardaki streptavidin çözeltilerinin sensörde meydana getirdikleri kapasitans değişimleri (50 kHz ve 10 kHz).....	63
3.3. Literatürde streptavidin algılama amaçlı uygulamaları bulunan etiketsiz biyosensör çalışmaları.....	64
3.4. Bu analizlerde kullanılan solüsyonlar ve dielektrik sabit değerleri (ϵ_r).....	66
3.5. Üç farklı sensor için ölçülen kapasitans değerlerinin ortalaması C_p (nF).....	68
3.6. Farklı geometrilere sahip biyosensörlerin ölçüm sonuçları	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve kısaltmalar

H_2O_2	Hidrojen Peroksit
O_2	Oksijen
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
KCl	Potasyum Klorür
NaH_2PO_4	Monosodyum dihidrojen Fosfat
KH_2PO_4	Monopotasyum Fosfat
Si	Silisyum
SiH_4	Silan
GeH_4	Germanyum tetrahidrit
N_2O	Diazot monoksit
H	Hidrojen
e^-	Elektron
Al_2O_3	Alumina
$(CH_3)_2CO$	Aseton
CO_2	Karbondioksit
Cr	Krom
Au	Altın
N	Azot
S	Sülfür
SiO_2	Silikondioksit

QCM	Kuartz kristal malzeme
FET	Alan etkili transistör
BSA	Bovin serum albumin
Pbs	Fosfat tampon çözelti
SA	Streptavidin
°C	Santigrad derece
K	Kelvin
A	Amper
V	Volt
CVD	Kimyasal buhar biriktirme
PVD	Fiziksel buhar biriktirme
PECVD	Plazma ile güçlendirilmiş kimyasal buhar depolama
MW	Mikrodalga
DC	Doğru akım
AC	Alternatif akım
UV	Ultraviyole
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
φ	Fazfarkı
ε _r	Dielektrik sabiti
ε ₀	Boşluğun dielektrik sabiti
C _p	Paralel kapasitans
C _s	Seri kapasitans
R	Direnç
d	Kondansatörün dielektrik kalınlığı

W	Watt
A°	Angstrom
s	Saniye
dk	Dakika
UNAM	Ulusal Nanoteknoloji Araştırma merkezi
DI	İyonlarından arındırılmış
DDI	İki kere iyonlarından arındırılmış
HMDS	Heksametildisilazan
HF	Hidroflorik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FIB SEM	İyon demeti odaklandırılmış taramalı elektron mikroskobu
SAM	Yüzeye kendiliğinden bağlanma
APTS	Aminopropiltrimetoksilan
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
XPS	X ışını fotoelektron spektroskopisi
Z	Empedans
X	İmajiner eksen
k	Kulomb sabiti
q	Elektriksel yük miktarı
F	Elektriksel çekim kuvveti
E	Elektriksel alan
kHz	Kilohertz
MHz	Megahertz
GHz	Gigahertz
ml	Mililitre
g	Gram

F	Farad
I	Akım
ALD	Atomik katman biriktirme
IPA	İzo propan alkol

1. GİRİŞ

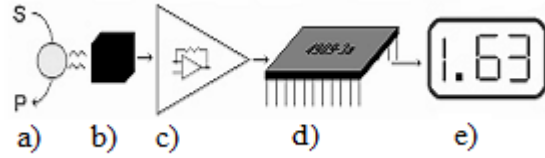
Sensörler genel olarak fiziksel olguları elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır. Bütün canlılar yaşadıkları ortamlardaki değişimleri çok hızlı bir şekilde algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere ayak uydurmaya çalışacak şekilde tasarlanmışlardır. Bu algılama mekanizması biyosensör teknolojisinin gelişimi için bilim insanlarına ilham kaynağı olmuştur. Canlılar bilim insanlarının hayal bile edemeyeceği düzeyde algılama hassasiyeti gösterirler. Örneğin, bazı köpeklerin koku alma hassasiyetleri insanlardan 100 bin kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları, tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi hemen algırlar. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdır [1]. İşte canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi sonucunda biyosensörler ortaya çıkmıştır. Genel anlamda biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, malzeme bilimi ve mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden çok-disiplinli bir anlayış çerçevesinde yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyosalgılayıcı cihazlar olarak tanımlanabilirler. Biyosensörler, biyolojik yapıları algılayan sensörler veya reseptör birimi biyomoleküler yapıda olan sensörlerdir. Elektronik duyu organları da diyebileceğimiz bu cihazlar, çalışma şekillerine göre ve dönüştürücü adı verilen yapılarına göre çeşitlere ayrılmaktadır. Isısal, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler ve biyosensörler bunlardan bazılarıdır. Bu tez çalışmada ürettiğimiz ve karakterizasyonunu yaptığımız biyosensörler, spesifik protein tespiti yapan cihazlar olarak tasarlanmışlardır [2].

En eski biyosensörler, kömür madencileri tarafından kullanılan kanaryalardır. 19. yüzyılda kömür madencileri yeraltına inerken yanlarında kafeste bir kanarya kuşu götürüyorlardı. Kanaryalar metan ve karbon monoksit gibi kokusuz zehirli gazları hızlı metabolizmaları sayesinde erken hissederek, susmak suretiyle madencileri uyarıyorlardı [3]. O zamandan günümüze gelene kadar biyosensör teknolojisi elektronik, fizik, kimya, malzeme bilimi gibi dalların disiplinler arası çalışması sonucu çok mesafe katetmiştir. Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine

bakıldığında bu alandaki literatüre geçen ilk bilimsel çalışmaların enzim sensörleri olduğu görülmektedir. Biyosensörlerin tarihi 1950’li yılların ortalarında L. C. Clark’ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons ile 1967’de Updike ve Hick tarafından yayınlanan glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmuştur [4,5]. Böylece, Clark ve Lyons glukoz oksidaz enzimini O₂ elektrotu ile birleştirerek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini, diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Biyosensörler bugün sağlık (diagnostik, pronostik vb.), gıda, su, kalite kontrol, çevresel incelemeler gibi birçok alanda kullanılır hale gelmiştir. Anyon ve katyonları belirleyen sensörler klasik elektrokimya sayesinde hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin (enzim gibi) de katılmasıyla diğer birçok materyalin tayini mümkün olmaktadır. Bu şekilde hazırlanan analiz sistemleri biyosensör olarak ifade edilir [6]. Biyolojik moleküllerin yüksek duyarlılık ve seçicilikte tespiti konusunda farklı ölçeklerde gerçekleştirilen çalışmaların yanı sıra nano boyutta geliştirilen biyosensörler gelecek açısından olumlu bir bakış açısı sağlamaktadır. Bu anlamda literatürün bize sunduğu verileri teorik anlamda ele aldığımızda; bu çalışmaların, ilerleyen dönemde nano boyutlardaki organizmaları, canlı hücre ortamında gerçekleşen olayları herhangi bir belirtiye ihtiyaç duymadan çok hassas ve tam zamanlı algılama imkanı sağlayacak potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu tez çalışması da etiketsiz nano aralıklı impedimetrik biyosensörlerin nanogram seviyesinde algılama hassasiyeti gösteren, hızlı, kararlı, tekrarlanabilir protein algılamasını içermektedir. Günümüzde birçok alanda biyosensör uygulamaları bulunmaktadır: Çevre uygulamaları, hava ve sudaki zararlı organizmaları tespit için kullanılır. Gıda uygulamaları, gıda izleme, gıda kaynaklı patojenleri tespit için kullanılır. Askeri uygulamaları, biyolojik bir savaş tehdidinin tespitinde kullanılır. Sağlık uygulamaları, hastalıkların erken teşhis ve tedavisinde, takip edilmesinde kullanılır [7,8]. Sağlık uygulamaları arasında glukoz ölçüm sensörleri belki de en iyi bilinen ticari örneklerdir. Bu sensörler dünya nüfusunun % 1-2’sini oluşturan diyabet hastalarına büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Genellikle Glukoz Oksidaz enzimi ile elektrokimyasal bir sensör yardımı ile şerit üzerine bir damla kan damlatarak kullanılır [8,9].

Kanser, günümüz dünyasının başlıca ölüm nedenlerindedir. 2008 yılında tüm dünyada toplam 7,6 milyon insanın kanser hastalığı nedeniyle öldüğü tespit edilmiştir. Tüm araştırmacıların bir umut arayışına devam ediyor olmasına karşın, bu sayının 2030 yılında 13,1 milyona ulaşması öngörülmektedir [10,11]. Malesef günümüz teknolojisi kanserin erken tanı ve teşhisi konusunda yardım bekleyen milyonlarca insana şimdilik yardım edememektedir [12,13]. Kanser hastalığında, erken teşhis başarılı tedavide önemli rol oynamaktadır. İnsan kanında yapılan analizlerle kanserli hücrelerin varlığı anlaşılabilir. İnsan kanındaki kanser işaretlerini erken tespit edecek, hassas, hantal olmayan ve ucuz biyosensörlere ihtiyaç vardır. Bu amaca hizmet eden sensörlere yerinde bakım biyosensörleri denmektedir. Araştırmacılar halen erken teşhiste katkı sağlayacak biyosensörleri geliştirmek için çalışmaktadır. Belki ileride kol saati gibi basit bir araç sayesinde anlık algılamalarla hassas ve erken teşhisler yapılabilecektir. [7,14]. Bu tez çalışması bu araştırmalara kısmen katkı sağlamak amacıyla yapılmıştır.

Biyosensörler birçok sensör gibi algılayıcı (Reseptör) ve dönüştürücü (Transduser) olmak üzere iki ana yapıdan oluşmaktadır. Eğer algılayıcı kısmı biyomoleküler bir yapıda ise buna biyoalgılayıcı adı verilir. Biyoalgılayıcılar hedefi fark edebilen biyomoleküllerdir. Dönüştürücüler ise biyoalgılayıcıların hedefi fark ettiği esnada ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyali elektrik sinyallerine dönüştüren yapılardır. Biyosensörler sayesinde normalde uzun tahliller gerektiren analizler daha kısa sürede yapılabilir. Kısa sürede sonuca ulaştırması ve uygulama kolaylığı biyosensörlerin en önemli avantajlarından. Bir biyosensörün basitleştirilmiş işleyiş şeması Şekil 1. 1’de verilmiştir;

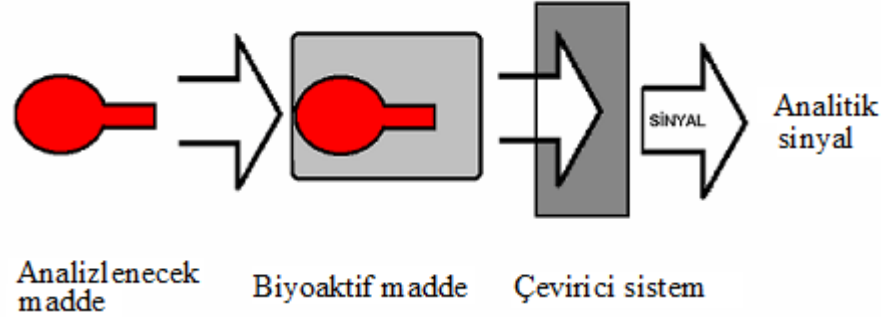


- a) Biokatalizör
- b) İletici
- c) Yükseltici
- d) Mikroişlemci
- e) Gösterge

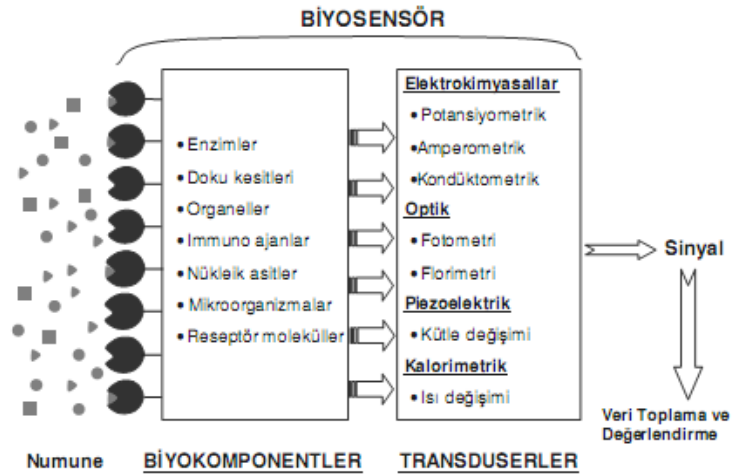
Şekil 1. 1. Bir biosensörün temel bileşenleri [4,5]

Biyosensörler birbirini içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal çeviricinin görevi analiz edilecek maddeyle etkileşerek onu tanımdır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir [15,16]. Aşağıda bir biosensörün şematik gösterimi verilmektedir (Şekil 1.2). Canlı hayatının önemli unsurlarından olan görme, koklama, işitme, dokunma, tat alma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biosensör sistemleri oldukları için biosensör çalışmalarına en güzel örnekleri oluşturmaktadır. Aslında her bir canlı türü mükemmel biosensörlere sahip olarak tasarlanmıştır. Meselâ beş duyumuz; görme, işitme, dokunma, koklama, ve tat almamız yine alıcılar tarafından hissedilen verilerin kimyasal ve elektriksel sinyallere dönüştürülüp, beynin değerlendirilmesine sunulmasıdır. Modern teknolojinin ürünü olan biosensörler ile bir ya da birkaç molekülü tanımaya, algılamaya çalışırken, üretmeye çalışılan sensörlerden çok daha hassas, kararlı ve tekrarlanabilir ölçümler alan sensörlerle donatıldığı unutulmamalıdır.

Biyosensörler genel olarak, biyo-algılayıcılar (Biyo komponentler, biyo reseptörler) ve çevirici sistemlerden meydana gelmektedir (Şekil 1.2 ve 1.3).



Şekil 1. 2. Tipik bir biyosensör yapısı [4,5]



Şekil 1. 3. Biyosensörün yapısı ve çalışma prensibi [17]

1.1. Biyoalgılayıcılar (Biyoreseptörler)

Biyosensörlerin yapısında yer alan biyokimyasal bileşenler biyoalgılayıcı (biyolojik algılayıcı) olarak adlandırılırlar. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal algılayıcılar sensörlerde biyoalgılayıcı olarak kullanılırlar.

Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Biyoalgılayıcılar analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler çevirici tarafından algılanır ve elektriksel sinyallere dönüştürülür. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyo algılayıcılardır. Teorik olarak algılayıcı ve çeviricilerin birçok değişik şekilde birleştirilmesi mümkün olmasına rağmen bu bileşimler bir elektrik sinyali oluşturamazlarsa biyosensör fonksiyon göstermez. Çizelge1.1 uygun algılayıcı-çevirici bileşimleri ve literatüre geçmiş olan günümüzdeki durumları hakkında bilgi vermektedir [18].

Çizelge 1.1. Uygun algılayıcı-çevirici bileşenleri ve literatürde geçen günümüzdeki durumları [18]

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

* Araştırma aşaması

**Araştırma ve prototip geliştirme aşaması

*** Araştırma ve ticari ürün aşaması

Biyo-algılayıcı olarak kullanılan moleküller, enzimler, antikorlar, aptamerler ve proteinlerdir. Antikorlar bir glikoproteindir. Kandaki proteinlerin %20'sini oluştururlar ve immünoglobulinler diye de adlandırılırlar. Y şeklinde olup iki adet

antijen tanıma bölgesi ihtiva ederler. Bağışıklık sisteminde antikolar tarafından tanınan ve immün cevap oluşumuna sebep olan yabancı moleküllere antijen adı verilir. Antikorları genelde birbirlerinden ayıran farklılık antijen tanıma bölgeleridir. Her farklı antikor kendine özgün olan antijeni tanır ve ona geçici olarak bağlanır. Kovalent olmasa da güçlü bir bağlanma yaptığından antijen-antikor bağlanma stratejisi birçok modern tanı yönteminde kullanılmaktadır. Özellikle monoklonal antikor üretim teknolojisi sayesinde artık herhangi bir antijene özgün IgG tipi monoklonal antikolar üretilmekte ve üretilen bu antikolar biyosensör teknolojisinde de kullanılmaktadır [19].

Aptamerler ise, genel olarak rastgele sentezlenmiş tek zincirli oligonükleotidlerdir. Önce oligonükleotid sentezleyicisine zincir dizim sekansı bakımından rastgelelik gösteren trilyon adet farklı sentetik oligonükleotid ürettirilir. Baz dizimi farklı olan herbir molekül, farklı üç boyutlu yapıya sahiptir. Dolayısıyla bu kadar farklı molekül, tanınması düşünülen hedefle muamele edilir ve hangi rastgele üretilen oligomerik molekülün analite karşı yüksek bağlanma kapasitesine sahip olduğu SELEX adı verilen özel bir yöntemle tesbit edilir. Sonrasında tesbit edilen oligomerin sekansı belirlenip sentezleyiciye ikinci defa ama bu sefer bilinçli olarak bu molekülden ürettirilir; ürünler ise biyosensör teknolojisinde biyoalgılayıcı olarak kullanılır. Monoklonal antikolara rakip olan bu moleküller gün geçtikçe uygulamada kendini daha fazla göstermektedir. Hatta son 10 yıl içinde özel yöntemlerle üretilen aptamer proteinlerin bazılarının altın ve bakır gibi madenlere karşı bile özgün bağlanma gösterdikleri görülmüştür. Bu da, özellikle yer altı suları üzerinden maden aramaları yapmak için orijinal biyosensör imalatının yapılabileceğinin işaretini vermektedir [20]. Algılayıcı proteinler biyolojik aktif bileşikler için yüksek ama özgün bağlanma gücüne sahiptirler. Yani, her bir farklı algılayıcı protein yalnızca kendine has bileşiğe bağlanabilir. Bu özelliklerinden dolayı biyo-algılayıcı olarak biyosensör teknolojisinde kullanılmaktadırlar. Mesela, normalde hücrelerdeki ölüm algılayıcıları apoptosis sinyali veren ligandlara karşı kullanılır. Hücre bu ligandları bu reseptörlerle hisseder ve apoptosisi (planlı hücre ölümü) başlatır. Sensör teknolojisinde bu reseptörler kullanılarak çevremizde üretilen hangi kimyasalın apoptotik sinyale sebebiyet verdiği anlaşılmaktadır. Dünyamızda, biyosensörlerde biyo-algılayıcı olarak kullanılmaya aday birçok biyolojik materyal

bulunmaktadır. Bakteriler, hücreler, organeller, membran tabakaları bunlardan bazılarıdır. Herhangi bir biyomateryalin biyo-algılayıcı amaçlı kullanımını için tek koşul, materyalin algılamak istenilen hedefi bir şekilde özgün olarak tanıma kapasitesine sahip olmasıdır [19].

1.2. Dönüştürücüler (Transduserler)

Dönüştürücüler, algılayıcıların biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyonun özelliğine göre farklı farklı dönüştürücüler kullanılır. Bunlar, genenekselsel dönüştürücüler, piezoelektrik dönüştürücüler, iletkenselsel dönüştürücüler, elektrik kapasitans dönüştürücüleri, termoelektrik dönüştürücüler, Alan etkili transistörler (FET: Field effect transistors) tipi dönüştürücüler.

Gelenekselsel dönüştürücüler 3 çeşittir. Bunlar; H_2O_2 veya O_2 ölçümlerine odaklanan amperometre, pH veya iyon ölçümleri yapan potansiyometre ve fiber optik kablo kullanan fotometrelerden ibarettir. Biyo-tanıma reaksiyonları genelde kimyasal ürünler üretir ki bunlar elektrokimyasal metotlarla kolayca tesbit edilebilirler. H_2O_2 (veya reaktif O_2) bir çift eletrot vasıtası ile ölçülebilir. Önce referans elektrotun karşısında olan elektrotta (Ag/AgCl veya Kalomel) uygun bir voltaj uygulanır. Bu durumda hedef moleküller olan H_2O_2 veya O_2 elektrotta yükseltgenir ve ardından bir akım oluşur ve oluşan bu akım amperometre ile algılanır. Potansiyometre ise bir membranın iki tarafındaki H^+ farkına bakarak çalışır. Fotometre, oluşan ışığı sinyal olarak algılar. Fiber optik kablolar oluşan bu ışığı yönlendirmede kullanılırlar [19].

Piezoelektrik materyalleri ve yüzey akustik dalga cihazları kütle değişimine karşı hassas bir ortam sunar. Bu tip dönüştürücüler, biyoalgılayıcıda tanıma reaksiyonu sonrasında kütle artışı oluyor ise, çok uygundur. Mesela kuartz kristal mikrobalsans (QCM) adı da verilen piezoelektrik silikon kristalleri hali hazırda pikogramlık kütle değişimlerini bile hissedebilmektedirler. QCM'lere sabitlenen

antikorların antijenleriyle karşılaşmalarıyla oluşacak kütle değişimi işte bu şekilde algılanıp sinyallere dönüştürülerek, okunabilir hale getirilir.

İletkensele dönüştürücü sistemlerinde, solüsyon iletkenliğindeki değişimler bir reaksiyonun hızını belirlemede kullanılabilir. Oluşan iyonların yaptığı hareket sonucu iletkenlikteki değişimleri baz alan bu teknik bir çok enzim ile alakalı reaksiyon hızlarının ölçülmesinde kullanılmaktadır. Elektrik kapasitans dönüştürücüleri ise, kapasitans ölçüm yöntemi kullanılarak oluşan bir dönüştürücüdür. Mesela, iki farklı elektrotlu levha üzerine antikorlar immobilize edilirse ve bir antijen-antikor reaksiyonu oluşursa sonuç doğal olarak iki levha arasındaki ortamın dielektrik sabitinde dikkate değer bir değişim meydana gelir. Bu değişim de kolayca okunabilir. Bu tez çalışmasında impedimetrik ölçüm sonuçlarına dayalı olarak kapasitif biyosensörlerin dielektrik sabitlerinde meydana gelen değişimler algılanmaya çalışılmıştır.

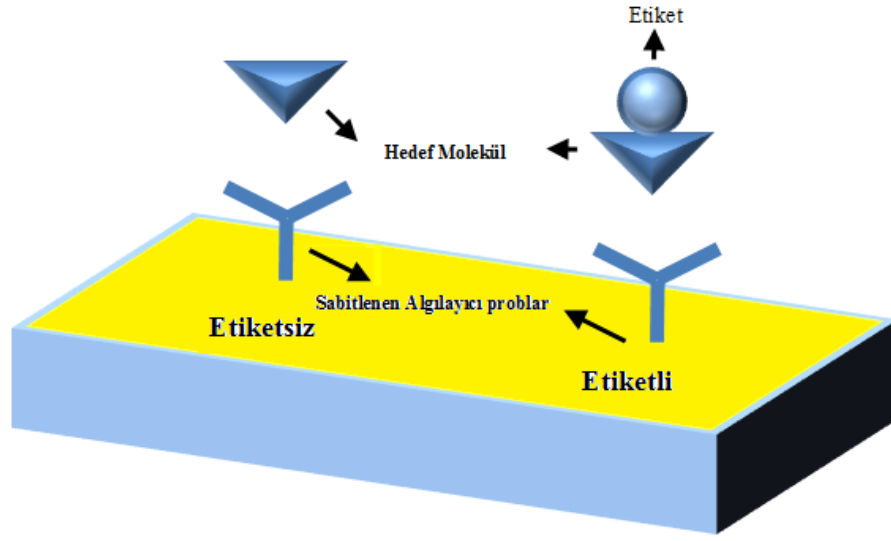
Bazı biyotanımlama reaksiyonları esnasında ortam sıcaklığı değişir. Bu değişim gözlenerek reaksiyon dolayısıyla analit varlığı hakkında yorum yapılabilir. Mesela ATP'nin hidrolizlenmesinde veya antijen-antikor kompleksi oluşumları esnasında meydana gelen reaksiyon sonucu ortam sıcaklığı değişir. Bu tür sistemlerde kullanılan dönüştürücüler, Termoelektrik dönüştürücülerdir. Ayrıca iyon konsantrasyonlarındaki değişimi algılayabilen FET'ler oldukça kullanışlıdır [19].

1.3. Biyosensörlerin İletim Mekanizmaları

İletim, ışık temelli [14,21,22], manyetodirenç temelli [23,24] ve elektriksel temelli olmak üzere çok çeşitli algılama mekanizmaları üzerinden gerçekleştirilebilir [25,26]. Bu mekanizmalar arasında, elektrik temelli algılama, sadeliği, çip olarak tümlenebilir olması, oldukça düşük maliyetli olması nedeniyle yerinde bakım sağlık uygulamalarında güçlü bir aday olarak gösterilebilir [2].

Biyosensör iletiminde önemli bir ayrım da etiketli olup olmadığıdır Etiketli biyosensörler hedef moleküllerinin etiketini kullanmayı gerektirir. Etiketli

biyosensörlerle algılama yapılabilmesi için hedef moleküle onun etiketinin bağlanması gerekmektedir (Şekil 1.4).



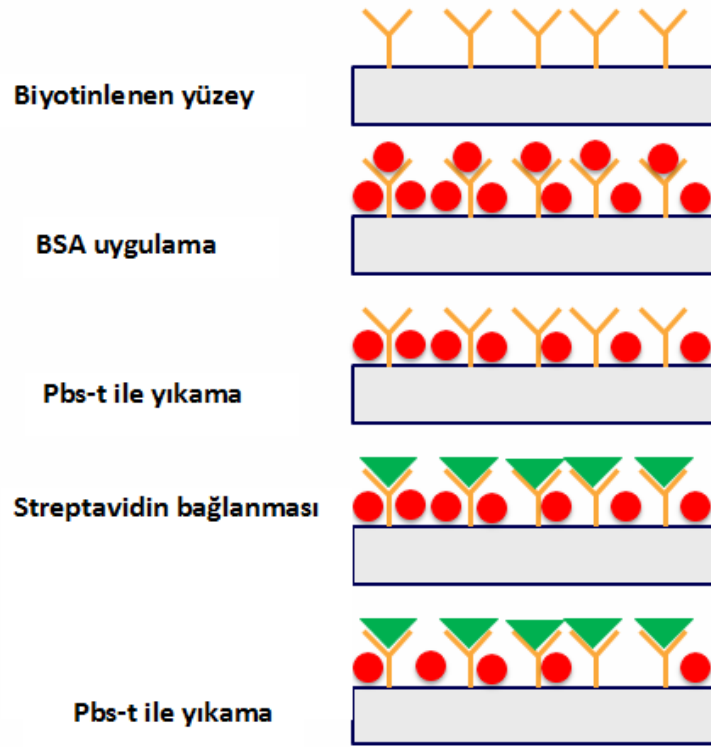
Şekil 1. 4. Etiketli ve etiketsiz algılama sistemi [27]

Etiketli biyosensörlerden ışıldar etiketli biyosensörler, kuantum noktalar, elektrokemiluminesent moleküller, boya etiketli liposomlar, floresan supersöndürücüler (quenching) son yılların ilgi alanıdır [28]. Etiketli biyosensörler immünolojik analizlerde sık kullanılmaktadır. ELISA sensörü en eski örneklerden biridir [29]. Ne yazık ki, bu tür sensörler genel etiketleme işlemi ve numune alma işlemi için uzun süreler ve uzmanlıklar gerektirmektedir. Ayrıca etiketli işlem, düşük konsantrasyonları algılama konusunda problem oluşturmaktadır [2,30]. Tüm bu hususların yanı sıra, etiketli biyosensörlerin yüksek maliyeti, tüm kanser uygulamaları için etiketsiz sensörleri cazip hale getirmektedir. Sonuç olarak etiketli biyosensörler, numune alma, zaman ve maliyet sorunları sebebiyle yerinde bakım sağlık hizmetleri uygulamaları için çok uygun değildir. Bu tür uygulamalar için, düşük maliyetli, hızlı algılayan, basit etiketsiz biyosensörler daha yatkındır [2].

1.4. İdeal bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler, kısaca seçicilik, kullanım ömrü, kalibrasyon gereksinmesi, tekrarlanabilirlik, kararlılık, yüksek duyarlılık, tayin sınırı, ölçüm aralığı, hızlı cevap zamanı, hızlı geriye dönme zamanı, basitlik ve ucuzluk, küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik olarak sıralanabilir [8].

Seçicilik sensörün sadece hedef analite yanıt verme yeteneğidir. Seçicilik etiketsiz sensörlerin en büyük zorluklarından biridir. Biyosensörün aktif yüzeyi, spesifik bağlanmaya spesifik olmayan bağlanmaya göre daha yüksek bir hassasiyet sağlamak üzere geliştirilmediği takdirde, çıkış sinyali güvenilir olmayacaktır ve bu düşük biyo-performans anlamına gelmektedir. Prostat kanseri için, prostat spesifik antijeninin kan serumunda, bir kaç ng/ml oranında algılanması gerekmektedir. Bu oran 10000'de 1 algılama anlamına gelmektedir [31,32]. Spesifik olmayan bağlanma, aktif yüzeye istenmeyen moleküllerin yapışmasından kaynaklanır. Bu problem aktif yüzeyi bloke edici ajanlar kaplanarak çözülebilir. Sığır serum antijen (BSA) ve somon serum DNA literatürde iyi bilinen bloke edici ajanlardır. Bir diğer strateji de insan kanının proteinler açısından saflaştırılmasıdır. Fonksiyonelize edilmiş yüzeyin aktif bölgesine, BSA uygulandığında, BSA tüm yüzeyi kaplar ve sadece spesifik olarak algılamak istenilen biyoyapıların gelip aktif yüzeye yapışmalarını sağlar (Şekil 1.5)

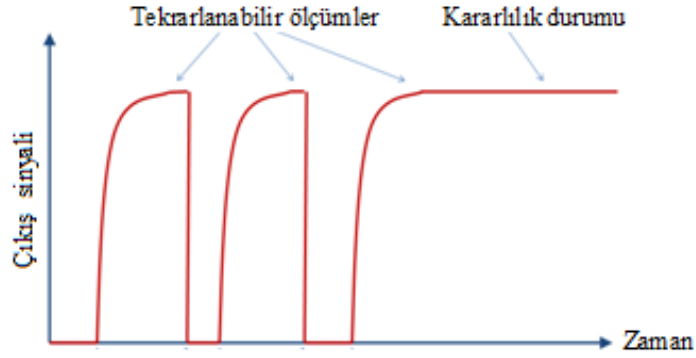


Şekil 1. 5. BSA ve Pbs-t nin yüzeye spesifik bağlama işlemi esnasında kullanım şekli

Seçiciliğin testi için hedef molekülle benzer özelliklere sahip ya da hedef molekülle aynı ortamda bulunma ihtimali olan moleküllerin bulunduğu bir düzenek gereklidir. İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi, seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse, bu eksikliği giderecek uzun işlemler eklenmesi gerekir. Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör, biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleri de etkilemektedir. İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması, ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planlandığı gibi değildir, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler [33].

İdeal bir biyosensör için, aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı değerlerin okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak, yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün

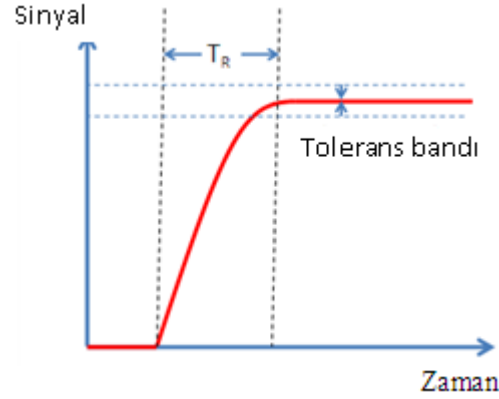
uygulamalarının o denli iyi olduğundan söz edilebilir. Bir biyosensörün ölçüm esnasında sürekli aynı değeri vermesi kararlılık olarak tanımlanır ve elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır; ayrıca pH, ısı, nem, ortamdaki oksijen konsantrasyonu gibi parametrelerden de etkilenmektedir. Şekil 1.6'da güvenilir bir biyosensörün tekrarlanabilirlik ve kararlılık ölçüm grafiği gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Güvenilir bir biyosensörün tekrarlanabilirlik ve kararlılık ölçümünü gösteren grafik [27]

Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması, ideal biyosensörlerin özelliklerindedir. Yüksek duyarlılık ise hedeflenen molekülün, düşük konsantrasyonda olsa bile algılanabilmesi anlamına gelmektedir. Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye olan çekiciliği, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir. Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım- konsantrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığıdır. Farklı konsantrasyonların algılanması için ölçüm aralığının geniş olması, ideal biyosensörlerde tercih edilmektedir. Fakat genellikle ölçüm aralığı ve duyarlılık ters orantılı olduğundan dolayı, biyosensörün kullanılacağı uygulamaya bağlı olarak bu iki parametre optimize edilir.

Bir biyosensör elektrotunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli basık ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısadır (hızlı). Şekil 1.7’de bir biyosensörün cevap zamanı grafiği verilmiştir.



Şekil 1. 7. Cevap zamanı ve tolerans bandı gösterim grafiği [27]

Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa, ikinci örnekte aynı süre sonra ilave edilebilecektir. Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar, daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da ucuzlaştırılmıştır. Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

1.5. Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Biyosensör teknolojisinde çeşitli birçok disiplinler kullanılır. Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180’den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir [34]. Biyosensörler; gıda

maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında, biyolojik oksijen gereksinimi (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde de başarı ile uygulanmaktadırlar. Biyosensörler en çok biyomedikal sektörde uygulama imkanı bulmuştur. Bu alanda uygulama imkanı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise, diyabet hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz biyosensörüdür. Bunu renal fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin biyosensörleri ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat biyosensörü izlemiştir [35]. İnsan vücuduna yerleştirilebilen biyosensörler de geliştirilmiş olup bunlar biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz imkanı verirler ki, özellikle ameliyat sırasında bu bilgilerin kesintisiz sağlanması çok önemlidir. Biyosensörlerin, ilaçların vücuttaki düzeylerinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilecektir. Biyosensörlerin gelecekte önemli uygulamalarından biri de süper oksit ve nitrik oksit gibi kısa ömürlü, hormonlar ve nörotransmitterler gibi düşük konsantrasyonlu maddelerin hücre içerisinde tayinidir. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere bir çok monosakkarit, aminoasitler, organik asitler (laktik asit), üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler için de biyosensörler hazırlanabilmektedir. İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilir. Uyuşturucu arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir. Böylece özellikle gümrüklerde, karakollarda zaman kazanılacaktır. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır.

Sağlık alanı biyosensörlerin temel uygulama alanıdır. Kan, gaz, iyon ve metabolik ölçümleri genellikle hastaların metabolik durumunu göstermek için gereklidir. Bu işlemlerin çoğu tıbbi analitik laboratuvarlarında saatlerce hatta günlerce sürebilen klasik analizlerde geçen kan ve üre örnekleri tarafından belirlenir. Biyosensörlerin kullanımı analitik sonuçların birkaç dakikada elde edilmesine olanak sağlar. Medikal telesensörler olarak da adlandırılan çipler vücut ısısını, nabızı, kan basıncını, kandaki şeker ve oksijen miktarlarını ve vücuttaki bazı metallerin

konsantrasyonlarını ölçebilmektedir. Çeşitli şekerler, mayalar ve alkoller gibi reaktant ve ürünleri gösteren biyosensörlerde mevcuttur. Bu sayede, ürün kalitesi artar, üretim seviyesi yükselir enerji tasarrufu sağlanır, bitki otomasyonu gelişir ve insan gücüne ihtiyaç azalır. Genellikle yiyecek ve içecek endüstrisinde geniş bir kullanım alanı vardır [36].

Havada suda toprakta ve diğer durumlarda yüksek seviyede potansiyel analit vardır. Mevcut kirlilik durumlarının yanı sıra çiftçilik, bahçecilik, veterinerlik ve madencilik, biyosensörler için potansiyel birer kullanım alanıdır. Biyoreportörler yoluyla petrol sızıntıları, yeraltı sularındaki uranyum miktarı, zehirli atıkların, kanserojenlerin ve içme sularını kirleten mikroorganizmaların derişimleri belirlenmektedir [36].

Zamanında ve etkin bir tanı tıp alanında tedavilerin temelini oluşturmaktadır. Nano-biyosensörler kanser hastalığının erken teşhisinde kullanılabilirler. Duyarlılık, algılama aralığı ve tekrarlanabilirlik bu nano-biyosensörlerin üretimindeki önemli sorunlardır. Etiketsiz ve elektrik tabanlı biyosensörler sağlık alanında umut vericidir. Seçicilik, karmaşık klinik ortamlarda ve herhangi bir özel uzmanlık gerektirmeden basit yöntemlerle uygulanabilir olması önem arz etmektedir. Performans ölçümlerini biyosensör uygulama alanları tanımlar. Tüm biyosensörlerde olduğu gibi yerinde bakım biyosensörlerinde güvenilirlik en önemli kıstastır. Kapasitif nano-biyosensörler, kolay uygulanabilir, ekonomik ve hızlı ölçümler yapabilmektedir, ayrıca boyutları küçük olduğu için taşınabilirler.

1.6. Vitaminler

Vitaminler insanların ve hayvanların gelişmesi, yaşaması ve büyümesi için gerekli olan diğer bir anlatımla dokuların normal eylemlerinin sürdürülmesinde etkinlikleri yüksek bazı organik bileşiklerdir. Yaşam için gerekli bu maddeye yaşam (vitus) ve amin sözcükleri birleştirilerek vitamin denir [37]. Vitaminler, yağda veya suda çözünebilmelerine bağlı olarak yağda ve suda çözünen vitaminler diye iki gruba ayrılırlar. Yağda çözünen vitaminler; A, D, E ve K vitaminleridir. Suda çözünenler

ise B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12 ve C vitaminleridir [37]. Doğada B vitaminleri adı altında bazı ortak nitelikler gösteren vitaminler bulunur. Kimyasal yapıları farklı olmakla birlikte bu vitaminlerin ortak nitelikleri, genel olarak suda çözünmeleri, azot kapsamaları, ısıya dayanıklı olmaları ve bazı enzimlerin kofaktör (prostetik grup veya koenzim)'lerini teşkil etmeleridir.

Biyotin, karboksilasyon ve transkarboksilasyon reaksiyonlarında koenzim fonksiyonu gören, suda çözünebilir ve çift halkalı bir vitamindir. H vitamini olarak da adlandırılır. Biyotin yapısındaki zincir sistemi nedeniyle sekiz adet stereoizomer oluşturur. Bunlardan sadece bir tanesi yani D-biyotin doğal ve biyolojik olarak aktiftir. Biyotin, bitki ve hayvansal ürünlerin yapısında da geniş olarak yer almaktadır [38]. Biyotin; oksijen, ışık ve ısıya karşı çok dayanıklıdır. En yüksek ve en düşük üç pH değerlerinde indirgenmeye uğrar. Çünkü biyotin, zincir sistemindeki N-C=O (Amit) bağları hidrolize uğrar. Oksitlenme durumlarında hidrojen peroksitle biyolojik olarak aktif olmayan biyotin sülfoksit oluşur. İnsanın sütten depoladığı biyotinin stabilitesi şartlara bağlıdır, bir süt örneğindeki biyotin konsantrasyonu sabit sıcaklıkta 1 hafta 5°C'de, 1 ay -20°C veya daha düşük sıcaklıkta 1,5 yıla kadar stabil kalır [38]. Biyotin için analitik yöntemler, besinlerdeki biyotin varlığının tespiti mikrobiyolojik yöntemle veya ligand bağlama prosedürünü içeren avidin bağlama proteini olarak kullanılarak yapılabilmektedir. Birçok yöntem geliştirilmektedir. Bu yöntemlerle serbest biyotin ve biositin ölçülmektedir [38]. Diğer vitaminlere göre biyotin oldukça kararlıdır. 4 M sülfürik asitle 120 °C'de 2 saat muamele edildiğinde bile dayanıklıdır. Bu işlemle biyolojik örneklerden toplam biyotin ekstraktı elde edilir. Sıvı veya ince tabaka kromatografisi de biyotinin biyolojik örnekten eldesinde kullanılabilir [39]. Biyotin tüm yaşayan canlılar için gereklidir. Ama sadece bitkiler değil, funguslar ve mikroorganizmaların çoğundan da biyosentezlenmektedir. Hayvanlar için biyotin kaynağı maya ekstraktlarında, yumurta sarısında, sütte, hububatlarda bulunmaktadır [40]. Biyotin 3 sınıf enzime bağlıdır. Bunlar karboksilaz, transkarboksilaz ve dekarboksilazlardır. Tüm reaksiyonlar bu enzimlerin katalizörülüğünde gerçekleşir ve biyotin CO₂ taşıyıcısı olarak rol alır [40]. İnsanlar için günlük en az alınması gereken biyotin miktarı 100 mg'dır. Çünkü biyotin birçok besin maddesinde bulunur. Çiğ yumurta beyazı yiyerek beslenen hayvanlardan da biyotin elde edilir [41]. Biyotin en çok proteinlerden avidin ile düzenli bağ yapar.

Biyotin avidin arasındaki bu ilişki moleküler biyolojideki araştırma ve teknolojilerde kullanılmaktadır. Bunun sebebi glikoprotein olan avidinin yumurta beyazından eldesindedir. Molekül ağırlığı 15.600'dır. Biyotin için ilk antikor 1970 yılında Berger tarafından keşfedilmiştir. Şimdilerde daha fazla çeşidi geliştirilmiştir [41].

1.7. Streptavidin-biyotin ilişkisi

Streptavidin ve biyotin, doğada bilinen en güçlü kovalent olmayan bağ yapma yeteneğine sahiptir [42]. Literatürde bu etkileşim sensör teknolojisi için genelde bir başlangıç konsepti olarak kullanılmaktadır [43,44]. Streptavidin ve biyotin, yüksek sıcaklık, pH, çözücülere ve deterjanlara karşı dayanıklıdır. Sert çevre koşullarına olan dayanıklılığı, bize biyoalgılayıcı uygulaması için empedans spektroskopisi nano aralıklı yapıların verimli çalışması için bir fırsat sunmaktadır. Boyutları itibariyle biyotin 3 nm civarında olduğu bilinmektedir [45]. Diğer taraftan streptavidinin ise atomik kuvvet mikroskobu (AFM) verilerine göre, 5.0 x 4.5 x 4.5 nm boyutlarında olduğu bilinmektedir [46].

1.8. Tampon Çözeltiler

Az miktarda asit veya baz ilavesiyle pH'ını fazla değiştirmeyen çözeltilere tampon çözeltiler denir. Bu tip çözeltiler genellikle zayıf bir asit ve bunun tuzunun karıştırılmasından veya zayıf bir baz ve bunun tuzunun karıştırılmasından elde edilir. Başka bir deyişle tampon çözelti bir asit ve onun konjuge bazının karışımıdır [47]. PBS (fosfat tampon çözelti)'nin pH'sı, iyon konsantrasyonu ve iyonları insan kanımızla aynıdır. Bu solüsyon, biyosensörlerin sağlık uygulamalarında kullanılabilirliğinin araştırılması açısından bu yönüyle bulunmaz avantajlar sunmaktadır. Dolayısıyla, proteinler işlevsel oldukları ve bağlanmalarını sağlayan üç boyutlu hallerini bu sıvının içinde alıyorlar. Başka bir sıvıda farklı bir morfolojiye girip biyotine bağlanan bölgelerin yapısı değişir düşüncesiyle bağlanma deneyleri bu sıvı içinde gerçekleştirilmektedir. Hazırlanışı: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g NaH₂PO₄,

0.24 g KH_2PO_4 , 800 ml distile su içerisinde çözdürülür ve pH'ı 7.4'e ayarlanır. Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlanır. Otoklav ile steril edilerek saklanır. PBS-T ise, PBS içine % 0.05 Tween 20 adında bir deterjan eklenmiş halidir. PBS-T protein-antibody reaksiyonu arasında, bağlanmamış proteinleri yıkayarak, istenmeyen bağlanmaları azaltmak için kullanılmaktadır. Toksik olmadığı için bağlanma deneylerinde en çok bu malzeme kullanılmaktadır. BSA (Bovine serum albumin) ise, streptavidin gibi bir proteindir ve genelde inekten alınır. Herhangi bir yüzeye bağlanmak için bir enzime ihtiyaç duymaz ve birçok yüzeye, kendisine hassas antikolar olmasa bile kolayca bağlanır. Ancak ortamdaki diğer proteinlerin yapılarını ve aktivitelerini engellemez. Bağlanma kinetiği hızlı ama bağlanma sabiti düşüktür. Bağlanma deneylerinde streptavidinden önce aktif yüzeye BSA koyulmaktadır. Bunun sebebi, ortamdaki her yüzeye streptavidin'den önce bağlanması içindir. Daha sonra streptavidin aktif yüzeye geldiğinde, biyotin ile streptavidin arasındaki etkileşim çok daha fazla olduğundan, BSA aktif yüzeyden çekilip streptavidin'e yer verecektir (Şekil 1.5). Ancak streptavidin ile biyotin olmayan (aktif olmayan) yüzeyler arasındaki etkileşimi streptavidin'den fazla olduğundan, oralarda kalacak ve streptavidin'e izin vermeyecektir. Sonuç olarak, biyotin olmayan yüzeyleri kapatarak streptavidin'in istenmeyen yüzeylere bağlanmasını önleyip, sadece aktif yüzeylere streptavidin bağlanmasını sağlayacaktır. Ayrıca aktif yüzeylere spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçecektir.

Bu tez çalışması Bilkent Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Okyay araştırma grubu ile ortak yapılan çalışmanın ürünüdür. Tezde yer alan deneysel verilerin bir kısmı ortak alınan ölçümlerdir. Yüzey fonksiyonizasyon işlemleri ve biyotin kaplama işlemleri Bilkent Üniversitesi Ulusal nanoteknoloji araştırma merkezinde bulunan Dr. Mustafa Özgür Güler'in araştırma grubu tarafından yapılmıştır.

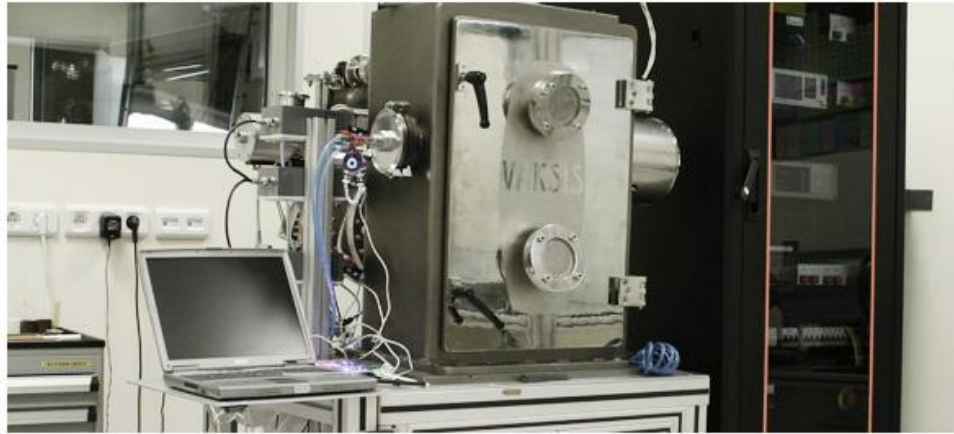
2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Isısal Buharlaştırma Sistemi

Isısal buharlaştırma yöntemiyle metal kaplama, en çok kullanılan tekniklerden biridir. Bu yöntem, katı bir metalin rezistif olarak ısıtılması sonucu buharlaştırılarak, serin bir yüzey üzerinde biriktirilmesiyle oluşur. Alttaş kaplama esnasında sabit bir hızda döndürülerek eşit dağılımı sağlanabilmektedir. Adından da anlaşılacağı gibi ısıtma işlemi tekne ya da pota şeklinde metal bir malzemenin üzerinden yüksek akım geçirerek oluşturulmaktadır. Tekne kısmına kaplanmak istenen malzeme yerleştirilir ve ısıtılması bu şekilde sağlanır. Bu tekne malzemenin cinsi buharlaşma sıcaklığına bağlı olarak seçilmektedir. Bu teknik dolaylı Isısal buharlaştırma olarak da bilinir. Metal buharlaştıktan sonra yüzeye yapışana kadar ortamdaki gaz molekülleriyle çarpışmalara uğrar. Bu çarpışmalar sonucunda bir kısmı saçılmalara uğrayarak kaplanma istenen yüzeye ulaşamaz. 20°C’de hava için ortalama serbest yol, sırasıyla 1e-4 ve 1e-6 Torr basınçlarda 45 ve 4500 cm’dir. Bu nedenle vakum odasındaki kaynak ile alttaş arasındaki 10-50 cm mesafe boyunca metal buharının düz bir şekilde giderek yüzeye yapışabilmesi için 1e-5 Torr’dan daha düşük bir basınçta çalışmak gerekmektedir. İyi bir vakum, kaliteli bir kaplama için önemli bir ön şarttır. Tez çalışmasında metal kaplama işlemlerinin tamamında Vaksis PVD Vapor – 3S Isısal buharlaştırma ile kaplama cihazı kullanılmıştır. Bu cihazda kaplanan metalin kalınlığını ölçmek için kaplama bölgesine bir kalınlık dedektörü yerleştirilmiştir ve bu dedektörün cihazın dış kısmında kalınlık monitörü bulunmaktadır. Kaplanan kalınlığın izlenmesi için kullanılan kristal dedektör ile alttaş arasında yatay mesafe olduğu için bu iki yüzeyde biriktirilen metal miktarlarının oranı belirlenmelidir. Bu oran “Referans faktörü (Tooling factor)” olarak adlandırılır. Çizelge 2.1’de bazı malzemelere ait referans faktörleri verilmiştir [48,49].

Çizelge 2.1. Bazı malzemelere ait referans faktörleri [50]

Metal	Yoğunluk [g/cm³]	Akustik empedans	Referans faktörü	Akım [A]
Al	2.70	8.20	1.71	44.0
Au	19.30	23.17	1.55	54.0
In	7.30	10.49	1.30	34.0
Zn	7.04	17.17	1.55	25.0
Cr	7.20	28.95	1.55	50.0



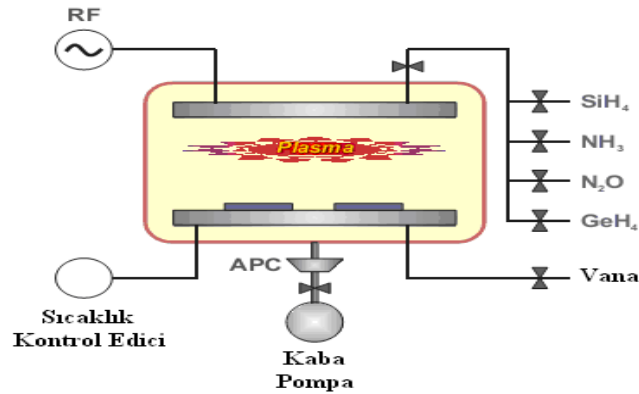
Şekil 2.1. Isısal buharlaştırma sistemi (UNAM-Vaksis PVD Vapor – 3S)

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

İnce film üretmek için çeşitli teknikler kullanılır. Özellikle ultra ince film hazırlamak için farklı teknikler uygulanmaktadır. Bunlar fiziksel buhar biriktirme (PVD) ve kimyasal buhar biriktirme (CVD) teknikleridir. Bu prosesler içinde ince polimer film kaplamalarda en sık kullanılan CVD yöntemidir. CVD işleminin daha

düşük sıcaklıklarda yapılabilmesine olanak tanımak amacı ile bu tekniğin plazma destekli türü olan plazma-destekli kimyasal buhar biriktirme (PECVD) ve Radyo frekansı (RF) yöntemleri son yıllarda üzerinde en çok yoğunlaşılacak kaplama yöntemlerindedir. Bu tekniklerin diğer yöntemlere göre en önemli üstünlüğü kaplanacak malzemeyi yüksek sıcaklığa çıkarmadan kaplamaya olanak sağlamasıdır. Plazma terimi, ilk defa 1929 da Langmuir tarafından iyonlarına ayrılmış bir gaz olarak tanımlanmıştır. İyonlarına ayrılmış gaz olan plazma, içerisinde iyon, elektron, uyarılmış atom, foton, nötral atom veya molekül içeren bir karışımdır. Plazma maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinden oldukça farklılık göstermesinden dolayı maddenin dördüncü hali olarak da ifade edilir. Bu haller arasında esas fark sahip oldukları enerjidir. 8000 K in üzerinde madde katı ve sıvı halini koruyamaz ve sıcaklığın 10000 K'in üzerine çıkmasıyla tüm atomlar ve moleküller iyonlaşır. Aslında evrenin bilinen kısmının % 99 u plazma olarak değerlendirilir. Plazma, doğada güneş ve bazı yıldızlar içinde (gaz sıcaklığı 106-108 K), yıldırım ve elektrik boşalmasında (gaz sıcaklığı 104-105 K) görülür. Plazmalar genellikle, plazma türlerinin sıcaklıklarına bağlı olarak sıcaklıkları 106-108 K ulaşabilen yüksek sıcaklık plazmaları (yıldızlar, termonükleer reaktörler), buna karşılık sıcaklıkları 106 K in çok aşağısında olan düşük sıcaklık plazmaları diye iki temel gruba ayrılırlar. Plazma haline geçiş için, gaz halindeki maddeye enerji vermek gerekir. Gerekli olan bu enerjiyi, ısı, ışın, manyetik ve elektrik enerjisi şeklinde vermek mümkündür. Bunlardan pratikte en çok kullanılan ve en önemli olan elektrik boşalmasıyla plazma elde etmektir. Bu tür plazma için güç kaynakları doğru akım (DC), düşük frekans, radyo frekansı (RF) veya mikrodalga frekansdır (MW). CVD tekniğinde büyütme sıcaklığı 700–900 °C arasında değişirken PECVD büyütme sıcaklığı daha düşük sıcaklıklarda, 150 – 350 °C arasında kullanılabilir. Plazma oluşumu ile birlikte, CVD tekniğindeki yüksek sıcaklıklarda çalışma gereksinimini ortalama olarak düşük sıcaklıklarda sağlayabilmektedir. Yüksek büyütme sıcaklıkları altında IC uygulamalarda bazı malzemeler arasında oluşabilecek difüzyonlar ve benzer sorunların en aza indirgenmesi sağlanmış olacaktır. Plazma biriktirme sistemi ana hatlarıyla, içerisinde plazmanın elde edildiği reaktör, birbirine paralel, disk şeklinde, iki elektrot, gazların bileşenlerine ayrılması için radyo frekanslı gerilim uygulayan RF jeneratörü, reaktöre kontrollü bir şekilde gaz akışını sağlayan: iğne vana, akış ölçer ve düzenleyicilerin olduğu gaz girişleri ile çıkıştaki mekanik vakum

pompasından oluşmaktadır. Paralel iki elektrot arasında doğru akım (DC) uygulanarak elektrik alanın katkısıyla elektrotlar arasında bir kaç pF değerinde bir kapasitans oluşur ve RF sinyali buraya uygulanır. Gazlar anot-katot arasında gönderilerek plazmanın sadece bu iki elektrot arasında oluşması sağlanmaktadır. Bu plazma oluşması istenilen kaplamanın cinsine göre ortamda bulunan SiH₄, GeH₄, N₂O gibi gerekli bulunan gazları bileşenlerine ayırır ve alttaş üzerinde ince bir film tabakası halinde kaplanmasını sağlar. Başlangıç olarak bu teknikte tabakalar arasında uygulanan elektrik alan ortamda bulunan gazların kinetik enerjilerinin artmasına ve bu sayede gaz ortamından ayrılan bazı gaz moleküllerin iyonize olmasına sebep olur ve iyonize olmuş moleküllerin birbirleri arasında etkileşimleri sonucunda reaksiyon başlatılır. İşlem devam ederken ortamda yeni elektronlar üretilmesi durmaz ve bu oluşum plazmanın oluşumu ile sonuçlanır [51].



Şekil 2.2. Plazma ile güçlendirilmiş kimyasal buhar depolama (PECVD) sistemi [51]

Reaksiyonu Silan gazı için şekillendirecek olursak [51];



Plazma elektronların, iyonların radikallerin (çiftlenmemiş elektronlu atom veya moleküller) birbirleri arasında etkileşmeleri sağlamak açısından kullanılan etkili bir kimyasal ortamdır. Özellikle 1970'lerden sonra, RF yardımı ile plazma oluşturma sıklıkla kullanılmaya başlanmış olup, bu yöntemle yüksek teknoloji gereksinimi duyulan özellikle büyük boyutlu elektronik devrelerde, ince film üretimi ve inceltme yöntemlerinde çoğunlukla kullanılmaktadır. RF, diğer plazma türlerinden büyük boyutlarda uygulanabilir olması sebebiyle öne çıkarmaktadır [51]. Şekil 2.3'te PECVD sistemi gözükmektedir.

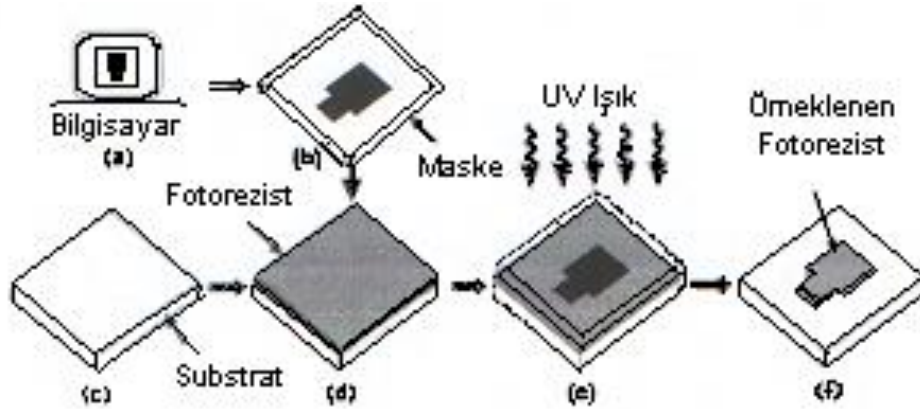


Şekil 2.3. PECVD sistemi (UNAM-CVD-Handy)

2.3. Fotolitografi

Fotolitografi tasarımcı tarafından belirlenen bir kalıbın materyal üzerine aktarılmasında kullanılan bir tekniktir. Bunun için bir bilgisayar programı (CAD) ile çizilen örnek Şekil 2.4.a ve b'de görülen maske üzerine aktarılır. Maske cam

levhadan yapılmıştır ve yüzeyinde, istenilen şekli taşıyan ışıkla tanımlanabilir opak bir materyal (genellikle krom) yer alır. Maske hazırlandıktan sonra alttaş (Şekil 2.4.c), ışığa duyarlı organik bir polimerle kaplandığı zaman şekil aktarılması başlar (Şekil 2.4.d). Alttaş ile maske birleştirilir. UV ışık maske içinden ışığa duyarlı organik polimer üzerine gönderildiğinde, (Şekil 2.4.e) maskenin şeffaf kısımları altındaki ışığa duyarlı polimer çözünerek çözelti haline geçer. Bu kabartma şekil pozitif fotorezist olarak bilinir. (negatif fotorezist te şekil ters yönde oluşmaktadır). Levha ile maske ayrılarak çözelti ortamdan uzaklaştırılır (Şekil 2.4.f) [52,53].

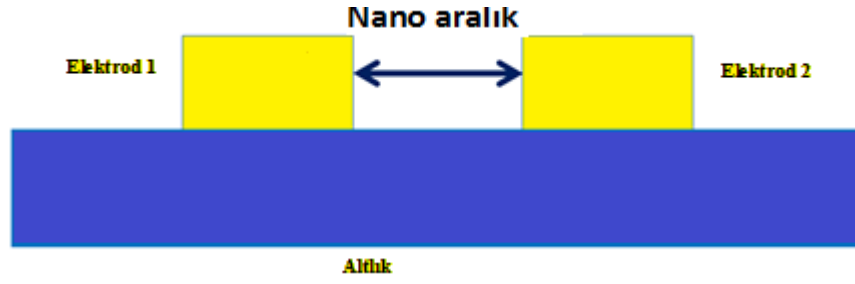


Şekil 2.4. Fotolitografi ile örneğin transferinin gösterimi [52,53]

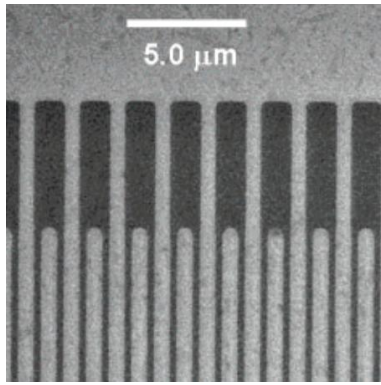
2.4. Nano Aralık Temelli Kapasitif Biyosensörler

Nano aralık, sağladığı minimum örnek hacmi ve düzgün elektrik alan sayesinde çok az miktardaki hedef moleküllerini hassas bir şekilde algılama yeteneğine sahiptir. Çeşitli üretim tekniklerine dayalı olarak çok sayıda aygıt, nano aralık literatüründe de rapor edilmiştir [54]. Bu aygıtlar yatay veya dikey nano aralıklı aygıtlar olarak kategorize edilebilir (Şekil 2.5 ve 2.6). Yatay aygıtlar, litografi veya kimyasal depolama gibi yöntemlerle üretilebilmektedirler. Fakat bu yapılar yüksek verimli aygıtları ortaya koyamamaktadır. Standart optik litografisi, mikron altı mesafeler oluşmasında etkili değildir. Ancak bakteri gibi mikron ölçeğindeki hedefleri algılama noktasında standart optik litografiden yararlanmak hala mümkündür. Bu durumda, sıvı içerisindeki iyonların elektriksel çift tabakası

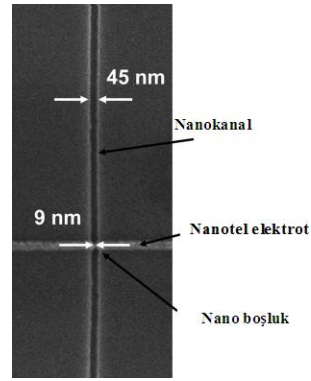
oluşturamaması için çok yüksek frekans değerlerinde ölçümler almak gerekmektedir [55]. İyonlar için relaksasyon frekansı saflaştırılmış su içerisinde 280 kHz civarındadır [56,57]. Bu durumda yüksek frekans parazitik etkileri ortaya çıkar ve yüksek maliyetli ölçüm araçları gerekmektedir. Gölge buharlaştırma tekniği, çözünürlüğü arttırmak için örneği eğerek, litografiyi kullanmaktadır [58]. Ancak yüksek verimli üretim için uygun değildir. Elektron demeti litografisi, nanoboyutta aralık oluşturmak için bir alternatif sunmaktadır, ancak yüksek fabrikasyon maliyeti ve aygıt başına uzun fabrikasyon süresi gibi dezavantajları da beraberinde getirmektedir [59]. Derin UV litografisi 250 nm altıntanda elektrot ayırma başarısı gösterebilmektedir [60], ancak bu üretim tekniği yüksek maliyetler gerektirmektedir. Elektrokimyasal depolama yöntemi de nano aralık formasyonu sağlama olanağı sunmaktadır. Fakat, iyi tanımlanmış desenler sağlamakta güçlük çekilmektedir [61]. Sonuç olarak düşük verim ve yüksek maliyet gibi sorunlar çözülmüncedey kadar, yatay nano aralıklı aygıtlar yerinde bakım biyosensör uygulamaları için uygun görülmektedir. Şekil 2.5.a'da yatay nano aralıklı aygıtların genel yapısı görülmektedir. Şekil 2.5.b, c ve d'de ise literatürde bulunan bazı yatay aygıtların görüntüleridir. Şekil 2.6.a'da ise dikey nano aralıklı aygıtların genel yapısı gösterilmekte olup, Şekil 2.6.b ve c'de ise literatürde bulunan bazı dikey nano aralıklı yapılar görülmektedir.



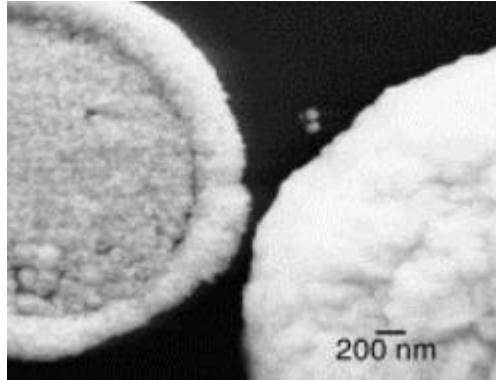
a)



b)



c)

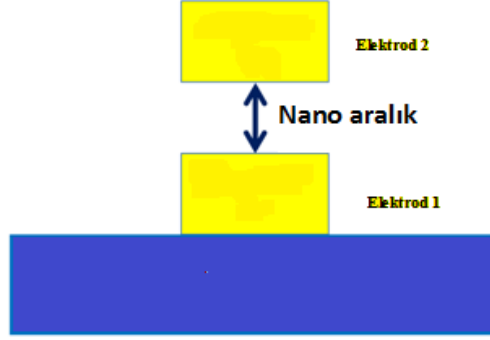


d)

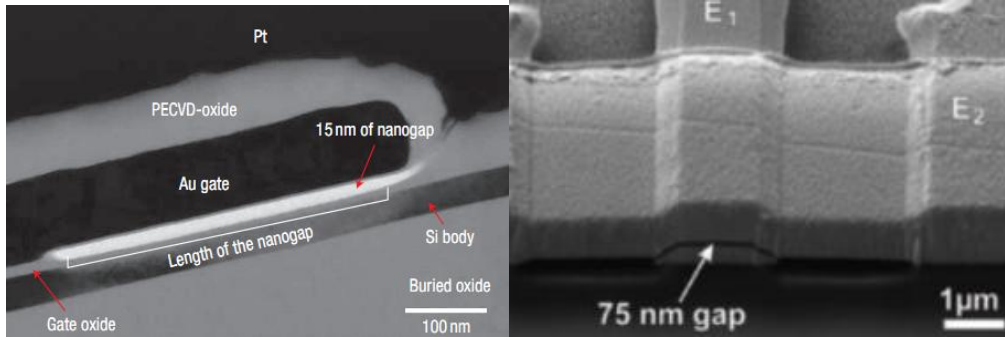
Şekil 2.5. Yatay nano aralıklı aygıtlar a) klasik yatay aygıtın kesit görüntüsü, b, c, d) literatürdeki bazı yatay aygıtlar [27,58, 61,62]

Dikey nano aralıklı aygıtlar, dikey olarak tasarlanmış elektrotlar ile oluşturulur (Şekil 2.6.a). Bu tür sensörler genellikle elektrotlar arasında nanometre boyutunda yükseklik içerecek şekilde [63], daha sonra kısmen aşındırılacak olan katmanlar

içercek şekilde oluşturulmaktadır [45,64]. Bu tür aygıtların en önemli avantajı, düşük maliyetli oluşudur. Bu teknikler, düşük maliyetinin yanısıra iyi bir kalınlık, düzgün bir yapı, ve kontrol edilebilir bir fabrikasyon işlemi sunmaktadır. Bu tez çalışmasında dikey nano aralık cihazları, nano aralık temelli impedimetrik biyosensör uygulaması için tercih edilmiştir.



a)



b)

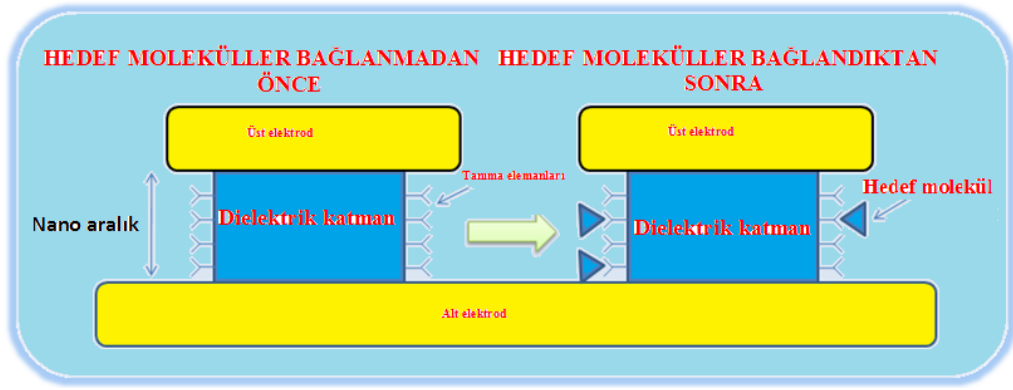
c)

Şekil 2.6 Dikey nano aralıklı aygıtlar a) tipik bir dikey nano aralıklı aygıtın kesit şekli b ve c) literatürdeki bazı dikey nano aralıklı aygıtlar [27, 45, 63, 64]

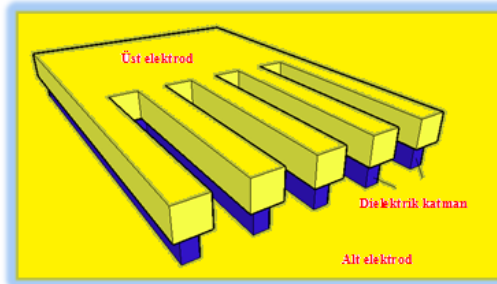
2.5. Sensör Tasarımı

Bu tez çalışmasında yapılan sensörün tasarımı, Şekil 2.7’de gösterilmiştir. Çalışma prensibi ise, hedef moleküllerin bağlanması ile impedimetrik değişiklikler tesbit etmektir. Bu amaç için, Şekil 2.7.a’da gösterildiği gibi dikey nano aralıklı aygıtlar üretilmiştir. Algılanması istenen elemanlar, dielektrik malzemenin bulunduğu bölgeye yerleştirilmiştir. Bu dielektrik katman, iki elektrotu birbirinden ayırma ve algılanacak moleküller için bir tutucu görevi görmektedir.

Ölçümler saflaştırılmış su içerisinde yapılmaktadır. Hedef moleküller dielektrik bölgeye bağlandığında suyun yerini alarak, aralıklı bölgenin dielektrik sabitini değiştireceklerdir. Bu şekilde impedasn değişikliği ortaya çıkacaktır. Saf su, yüksek debye uzunluğu sunmaktadır. Böylece nano boşluğun her yerinde düzgün bir elektrik alanı oluşturulmaktadır. Ayrıca, elektrik çift tabakasının istenmeyen etkilerini ortadan kaldırılır. Elektrotların boyutları nano elektrotlar arasındaki mesafeye nazaran çok büyük olduğu için saçak alan etkisi ihmal edilmiştir. Şekil 2.7.b ve c’de tasarlanan sensörün parmak kısımlarının önden kesit şekli görülmektedir. Şekil 2.7.d’de ise tasarlanan sensörleri oluşturan kısımların boyutları görülmektedir.



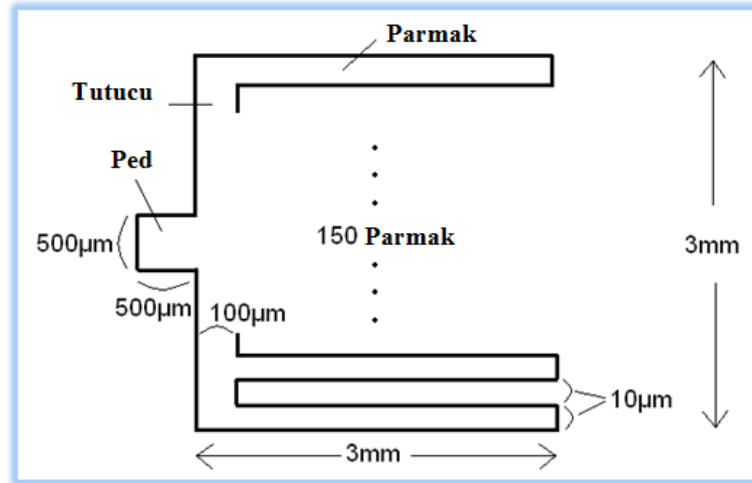
a)



b)



c)



d)

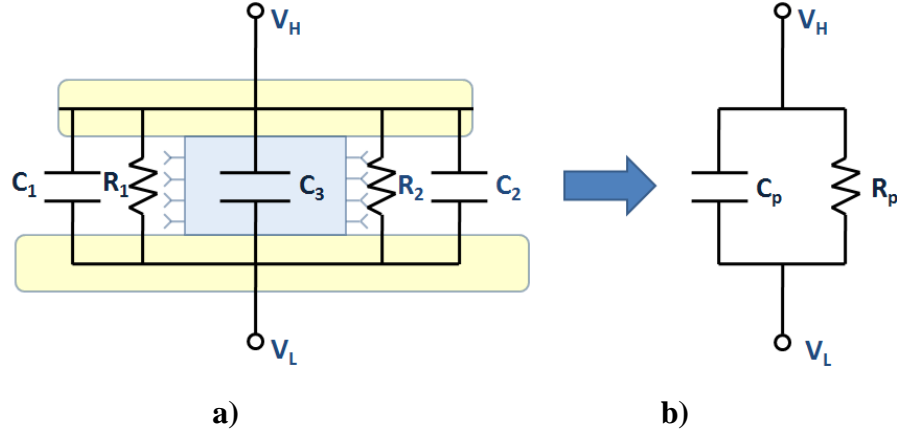
Şekil 2.7. Tasarlanan sensörün görünümü ve çalışma prensibi. a) tasarlanan sensörlerin çalışma prensibi, b-c) parmakların önden kesit görünümü, d) tasarlanan sensörlerin boyutlarının gösterimi [27]

Hedef moleküller olarak streptavidin ve biyotin seçilmiştir, bunun sebebi doğadaki en güçlü kovalent olmayan bağlanma kuvvetinin streptavidin ve biyotin arasında olduğunun iyi bilinmesidir [42]. Streptavidinin dielektrik sabiti (ϵ_r) yaklaşık 2 civarındadır [45]. Streptavidin ve saflaştırılmış (DI) su ($\epsilon_r=80$) arasındaki dielektrik sabit farkının çok büyük olması, saflaştırılmış su kullanılmasının ayrı bir avantajıdır. Bu büyük fark streptavidin-biyotin bağlanmasından sonra diğer alternatiflere göre, örneğin havaya göre ($\epsilon_r=1$) mukayese edildiğinde büyük bir empedans değişimi meydana getirmektedir. Nano aralıklı yapılar, biyomoleküler olayları hassas bir biçimde nano boyutlarda gerçekleştirmeye odaklanmıştır. Algılanacak olan elemanın hacmi ve yüzel alanı sensör geometrisiyle ayarlanabilir. Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi bu tez çalışmasında tasarlanan sensörlerde parmakların alanı tüm alanın %89’unu oluşturmaktadır.

Çizelge 2.2. Tasarlanan sensörü oluşturan parçaların boyutları

Bölüm	Birim ve boyutu		Sayı	Toplam alan	Alan (%)
	En(μm)	Boy(μm)	#	(μm^2)	
Parmaklar	10	3000	150	$4,500 \times 10^3$	89
Tutucu	100	3000	1	300×10^3	6
Ped	500	500	1	250×10^3	5
Elektrot				$5,050 \times 10^3$	100

Tasarlanan biyosensörün yapısı, empedans ölçümlerinin analizi açısından eşdeğer devre modeli ile modellenmiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Nano aralıklı biyosensörün devre modellemesi, a) Nano aralık paralel kapasitörleri, (C_1 ve C_2) ve direnç (R_1 ve R_2) modellemesi, dielektrik katman kapasitör modellemesi (C_3). b) Eşdeğer devre modellemesi [27]

Şekil 2.8'deki modellemeyle ilgili iki tane eşitlik vardır.

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

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

C_1 ve C_2 birbirine paraleldir. C_1 ve C_2 , C_{ng} . Eşdeğer kapasitörüyle gösterilebilir.

$$C_{ng} \triangleq C_1 // C_2 = C_1 + C_2 \quad (2.6)$$

İki farklı malzeme, (SiO_2 ve Al_2O_3) biyosensörün dielektrik katmanı olarak kullanılmıştır. Bunların beraber oluşturdukları kapasitans değeri 6. 1 eşitliğinde Cdl olarak gösterebilir.

$$C_{dl} = \frac{C_{\text{Al}_2\text{O}_3} C_{\text{SiO}_2}}{C_{\text{Al}_2\text{O}_3} + C_{\text{SiO}_2}} \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.6 ve 2.7 kullanılarak, C_p aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$C_p = C_{ng} // C_{dl} = C_{ng} + C_{dl} \quad (2.8)$$

Her bir kapasitörün kapasitans değeri aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$$C = \frac{\epsilon_D \epsilon_r A}{d} \quad (2.9)$$

Burada A, plakanın yüzey alanıdır, d ise iki plaka arasındaki mesafedir, ϵ_0 dielektrik sabittir ($8.854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$). ϵ_r ise plakalar arasındaki dielektrik sabittir. Bu hesaplamalarda kullanılacak dielektrik sabiti Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Bu çalışmada kullanılan farklı solüsyonların, dielektrik ve biyolojik malzemelerin dielektrik sabit değerleri [65,45]

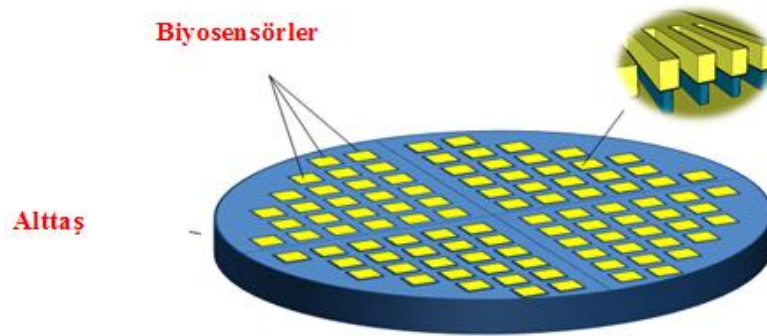
Ad	Dielektrik sabiti (ϵ_r)
Damıtılmış su	80
Metanol	33
Isopropanol	18
Al ₂ O ₃ (ALD)	8
SiO ₂ (PECVD)	5
Biyotin	2
Streptavidin	2
Hava	1

2.6. Sensör Fabrikasyonu

Fabrikasyon bir alttaş üzerine metal katmanlar ve katmanların arasında dielektrik tabaka biriktirmek suretiyle tamamlanır. Tüm bu süreçler, UNAM'da (Ulusal Malzeme Bilimi ve Teknoloji Enstitüsü), 100 sınıf temiz oda bölümünde yapılmaktadır (Şekil 2.9.a ve b).



a)



b)

Şekil 2.9. a) Fabrikasyon aşamalarının gösterimi ve b) fabrikasyon sonunda elde edilen aygıtların gösterimi [27]

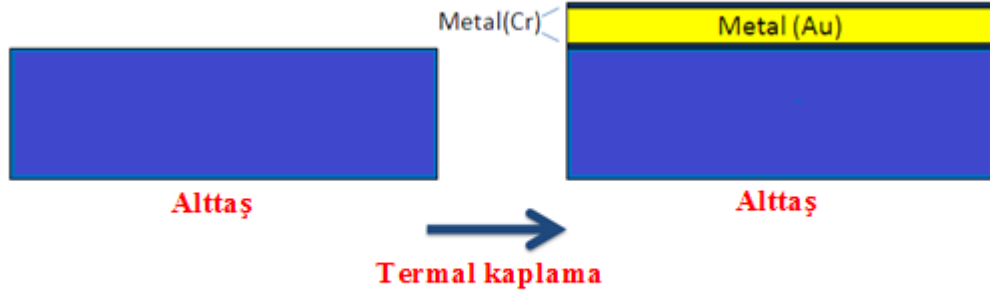
2.6.1. Alttaş ve Yüzey Hazırlığı

Fabrikasyonda alttaş olarak, silikon, kuartz, veya pyrex kullanılabilir. Bu çalışmada alt ve üst elektrotlar altın tabaka olacaktır. Altının yüksek iletkenliğinden dolayı, altlığın vazifesi sadece aygıtları taşımak olacaktır. Bu çalışmada alttaş 250 °C'den daha yüksek sıcaklığa maruz kalmayacaktır, ayrıca yüzey iyi parlatılmış ve yüzey pürüzlülüğü en fazla bir kaç nanometre seviyesinde olmalıdır.

Fabrikasyona başlamadan önce, yüzey temizliği büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple, aseton ((CH₃)₂CO), metanol ve izopropil alkol ((CH₃)₂CHOH) içerisinde 5'er dakika ultrasonik titreşime tabi tutuldu. Ardından damıtılmış (DI) su musluğunun altına tutularak, yüzeyin temizliği tamamlandı. Ardından Azot gazı ile yüzey kurutuldu. Bu temizlik, yüzeyi fabrikasyondan önce güvenilir hale getirecektir.

2.6.2. Alt Elektrotun Büyütülmesi

Altın elektrotun büyütülmesinde ısısız buharlaştırma (VAKSIS, PVD Vapor-3S Thermal) cihazı kullanılmıştır. Elektrot malzeme olarak Altın kullanılmasının başlıca 2 nedeni vardır: 1) Altın, iletkenliği yüksek bir malzemedir. 2) Metallerin çoğu, oksit oluşumuna negatif serbest enerji göstererek, oksijenle reaksiyona girerken, altın pozitif serbest enerjiye sahiptir (oksijen atomu başına 227°C'de 10,5 k.kalori) ve havaya maruz kaldığı zaman kararlıdır, oksitlenmez. Bu özelliği altını biyosensör uygulamaları için iyi bir elektrot malzemesi kılmaktadır. Oksitlenme, kararlılık ve tekrarlanabilirlik gibi özellikleri olumsuz yönde etkilediği için altın bu konuda bulunmaz bir metaldir. Yüksek vakum altında 100 nm kalınlığında altın kaplanmıştır. Altının altına ve üstüne 10 nm kalınlığında krom kaplanmıştır. Krom kaplanmasının sebebi altının iyi yapışmasını sağlamaktır (şekil 2.10).



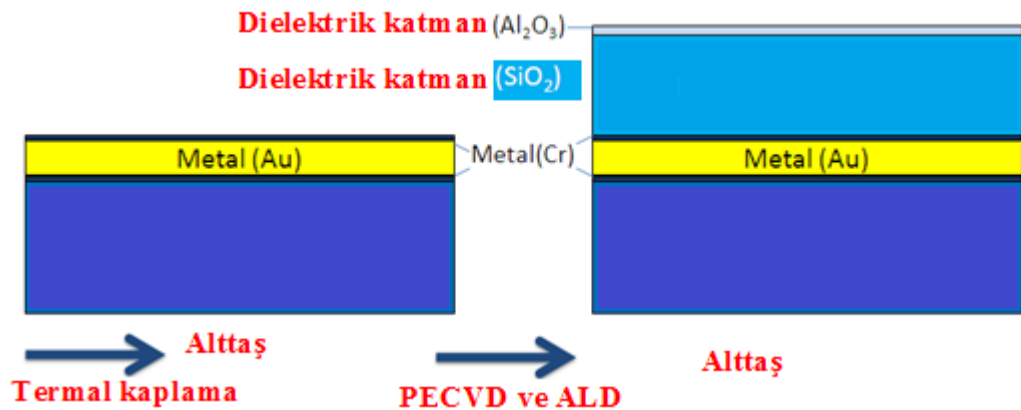
Şekil 2.10. Isısal buharlaştırma yöntemi ile alt elektrotun büyütülmesi aşaması

Buharlaşma hava molekülleriyle çarpıştığında altlığa ulaşmadan saçılmaya uğrayabileceği için, buharlaştırma ve kaplama işlemi yüksek vakum altında yapılmaktadır. (10^{-6} torr). Yüksek vakumda buharlaştırma öncesi ısısal buharlaştırma ile kaplama cihazının kazanında temizlik işlemleri yapılmaktadır, bu temizlik işlemlerinin önemli olmasının çeşitli nedenleri vardır: 1: Vakum parçaları üzerinde kalan küçük parçacıklar, yetersiz sızdırmazlık oluşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle cihazın kapağı isopropan alkol ile silindi. 2: Kirlilik nedeniyle vakum süresi oldukça artabilmektedir. Bu yüzden elektrikli süpürge ile gevşek bağlı parçacıklar ve pulları kaldırıldı. Bu sebeplerle gevşek bağlı parçacıklar ve pulları kaldırmak, kontaminasyonu önlemek amacıyla elektrikli süpürge kullanıldı. Kazan temizlendikten sonra kaplama malzemeleri altın ve krom, buharlaşma sürecinde bir kaç yüz santigrad dereceye kadar ısıtılacağı teknelere yerleştirildi. Arkasından vakum pompası çalıştırılarak, gerekli vakum değerine ulaşması beklendi. Kaplama başlatıldığında alttaş belirli sabit bir rotasyonla döndürülerek, her yere eşit oranda kaplama yapılması sağlandı. Malzeme kaplama hızı $0,5 \text{ \AA} / \text{s}$ olarak ayarlandı.

2.6.3. Dielektrik Katmanların Büyütülmesi

Dielektrik katmanların kalitesinin bu üretimde çok önemi vardır. Kaliteli ölçümler alabilmek ve çalışan aygıt sayılarının yüksek olması için dielektrik katmanın kaliteli olması ve sızıntı akımlarına meydan vermemesi gerekmektedir. Bu

nedenle SiO₂ katmanının üzerine sızıntı akımlarını engellemesi amacıyla çok ince (21 nm) Al₂O₃ kaplanması uygun görülmüştür ve bu sayede karşılaşılan problemler büyük ölçüde çözülmüştür. SiO₂, kimyasal plazma buhar biriktirme yöntemi (PECVD) tekniği ile kaplanmıştır. Bu teknikte kimyasal reaksiyon, çok düşük basınçta (0.45 Torr) kimyasal gazlar (200 sccm SiH₄ and 200 sccm N₂O) arasında oluşur. RF güç sayesinde (10 Watt), reaksiyon düşük sıcaklıkta (250°C) meydana gelir. Plazmadaki enerjik elektronlar, kimyasal reaksiyon için ek enerji sağlarlar. Plazma gelişmiş tekniği denmesinin sebebi budur. Bu kaplama için UNAM'da bulunan PECVD sistemi kullanılmıştır. Kaplama kalınlığı elipsometre (J. A. Woolam V-VASE) ile ölçülmüştür. Kaplanan kalınlık orta kısımda yaklaşık, 168 nm, kenar kısımlarda ise 340 nm olarak ölçülmüştür. Bu düzensizlik sebebiyle alttaş üzerinde üretilen cihazların hepsinin aynı özellikte olması sağlanamamıştır. Ayrıca sızıntı akımı gibi problemlerin çözülmesi için ek bir dielektrik katman biriktirmeyi gerektirmektedir. Çok ince Al₂O₃ katmanı bu sebeple büyütülmektedir. Bu katman atomik katman biriktirme tekniği (ALD) ile büyütülmüştür (Şekil 2.11). Bu teknik sırasıyla iki kimyasal gazlar (precursors) ile gerçekleştirilir. Bu teknik aynı anda iki farklı gaza yüzeyin maruz bırakıldığı PECVD tekniğinden farklıdır. ALD tekniğinde film yüzeye katman katman biriktirilir ve angstrom ölçekli film kalınlığı doğruluğu sunar. Al₂O₃ katmanı, ALD sistemi ile (Cambridge Nanotech, Savannah 100) 250°C'de büyütülmüştür. Elipsometri ölçümleri, alttaş yüzeyinin her yerinde yüksek kalitede tekdüze bir kalınlık (22±1 nm) sunar.



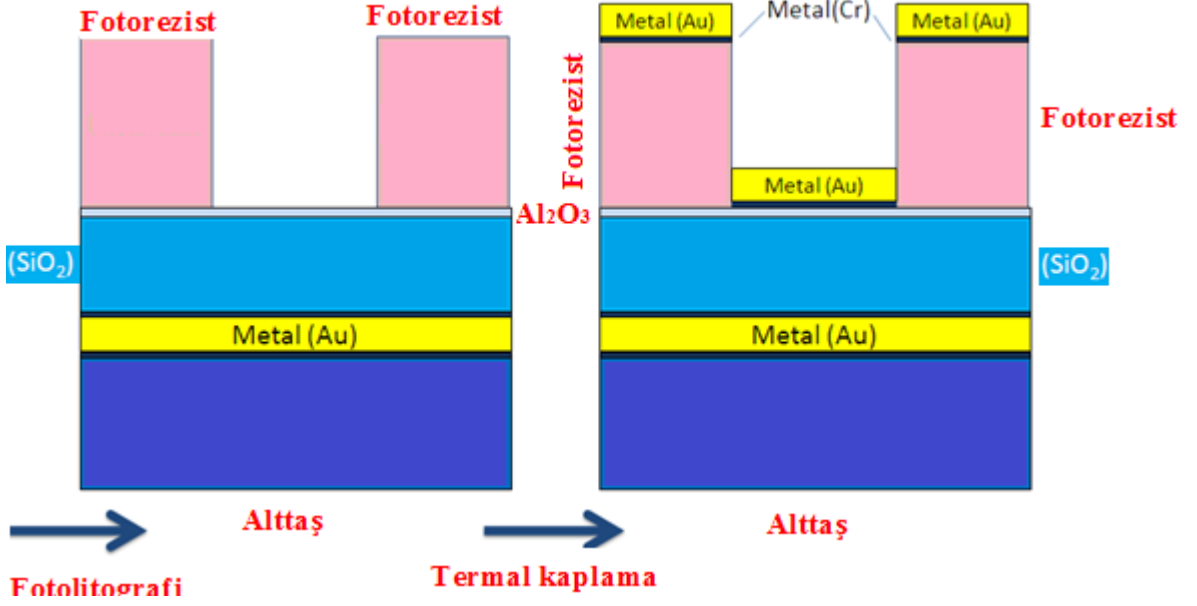
Şekil 2.11. Dielektrik katmanların büyütülmesi aşaması

2.6.4. Üst Elektrotun Desenlendirilmesi

Üst elektrotun kaplanmasından önce, istenen tasarımı aktarmak için fotolitografi tekniği kullanılır. Maske tasarımı, Layout Editor (GNU GPL) kullanılarak yapılmış ve UNAM da maske yazılımı (Heidelberg Instruments DWL-66) gerçekleştirilmiştir. Fotorezist fotolitografi işleminin en önemli elemanıdır. Bu ışığa duyarlı malzeme, maskedeki şeffaf bölgelerden gönderilen UV ışığa maruz bırakıldığında developer içerisinde çözünerek, çözeltiye karışmaktadır. Böylece maskedeki şekiller alttaş üzerinde kalmaktadır. Fotolitografi, 110 °C sıcak plaka üzerinde malzemenin 5 dk. bekletilerek, yüzeydeki nemlerden arındırılması işlemiyle başlar. Bu süre daha uzun da tutulabilir. HMDS (heksametildisilazan) 40 saniye boyunca dakikada 5000 tur dönme hızıyla yüzey üzerine kaplanır. Bu malzemenin kaplanmasının sebebi, fotorezistin yüzeye iyi yapışmasını sağlamaktır. Fotorezist, AZ5214, 50 saniye boyunca 5000 dakikada 5000 tur dönme hızıyla 1,3µm kalınlığında kaplanmıştır. Fotomaske örneğin üzerine gelecek şekilde ayarlanarak, 50mJ UV ışığa EVG620 cihazı kullanılarak maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonrasında malzeme AZ400K developer'a maruz bırakılarak, istenmeyen bölgelerin çözeltiye karışması sağlanarak, istenen desenin alttaş üzerinde kalması sağlanır. Burada developer içerisinde kalma süresi önemlidir, fazla kalma durumunda yüzeydeki ince parmaklar kalkarak havada asılı kalmaktadır, az kaldığında ise desen tam olarak elde edilememektedir.

2.6.5. Üst elektrotun Kaplanması ve Kaldırma İşlemi (lift-off)

Alt elektrota benzer şekilde üst elektrot da ısıl buharlaştırma ile metal kaplama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önce 10 nm krom ve ardından 120 nm altın büyütülerek kaplama işlemi sonlandırılmıştır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Isısal buharlaştırma yöntemi ile üst elektrotun kaplanma şekli

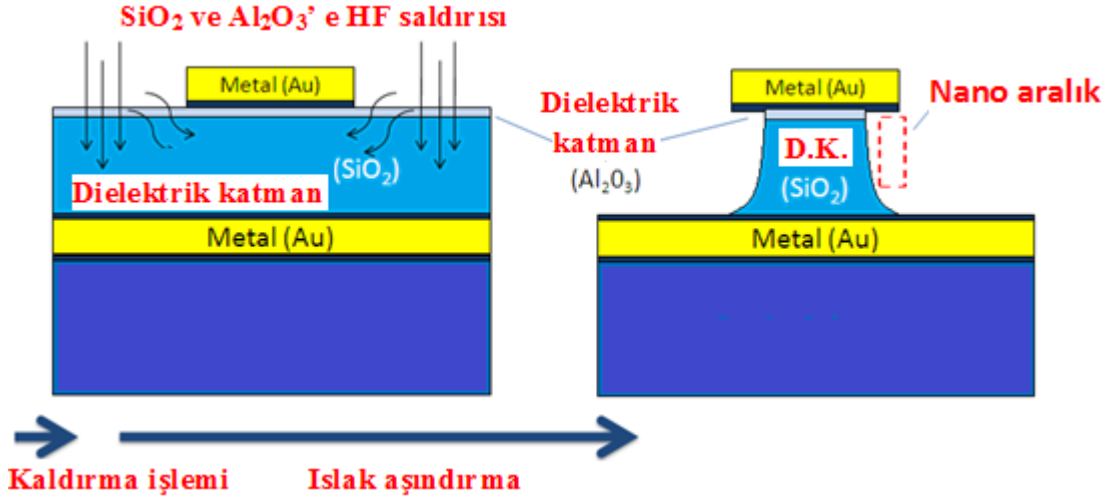
Buharlaştırma ile metal kaplama işleminden sonra malzeme, istenmeyen kısımları kaldırma işlemleri için asetonun (CH_3CO) içerisinde bekletilir. Bu işlem birkaç saat sürer. Asetonun kaldırma işlemini daha iyi yapabilmesi için kısa süreli ultrasonik titreştirme yapılabilir. Bu işlemin ardından desenli üst elektrotumuz elde edilmiş olur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Kaldırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli [27]

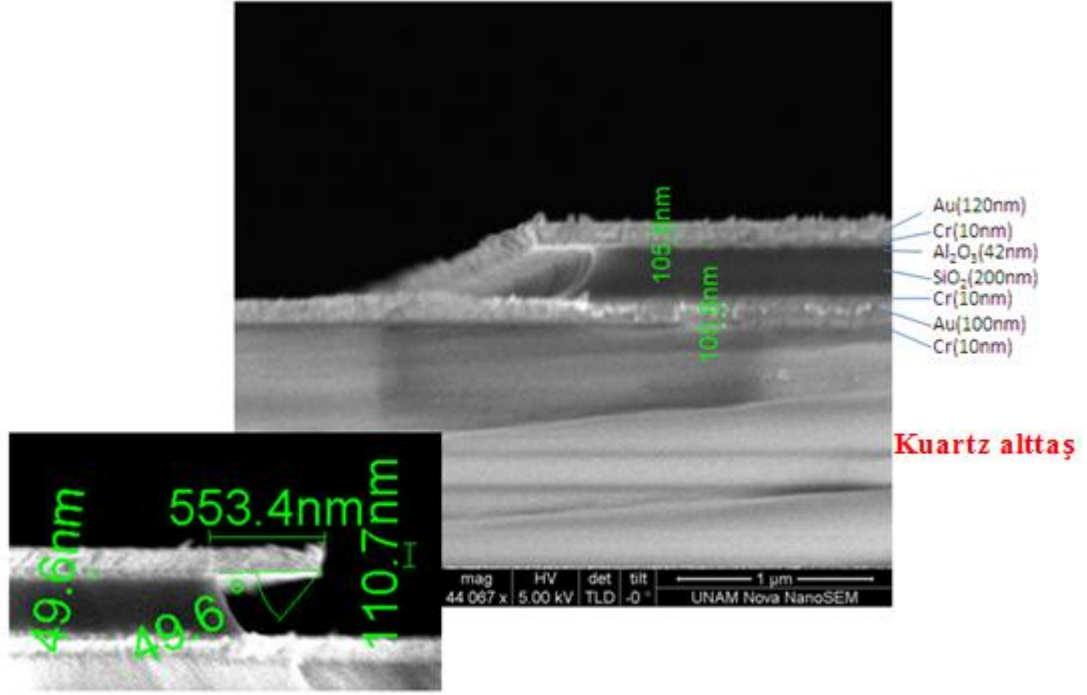
2.6.6. Nano Aralık Oluşturma

Nano aralık oluşturmak için ıslak aşındırma işlemi yapılmıştır. SiO_2 ve Al_2O_3 , 70: 1 oranında seyreltilmiş, hidroflorik asit ile aşındırılır. Bu süreçte HF altını aşındıramadığı için üst elektrot bir maske gibi davranır (Şekil 2.14).

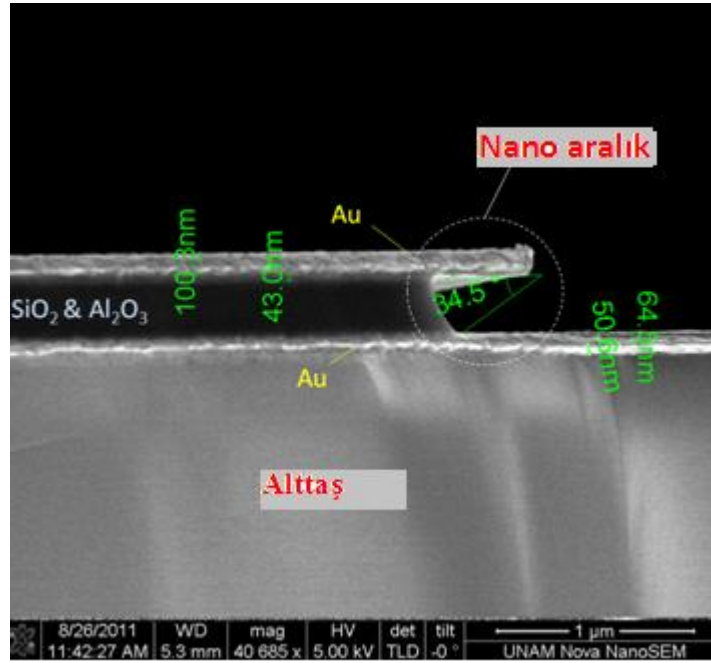


Şekil 2.14. Islak aşındırma işlemi ve sonrasında sensörün şekli [27]

Islak aşındırma işleminde aşındırma süresi çok önemlidir. Test örnekleri ile yapılan deneylerde 70: 1 oranında seyreltilmiş hidroflorik asidin, Al_2O_3 'ü dakikada 20-24 nm aşındırdığı, SiO_2 'i ise 23-28 nm aşındırdığı görülmüştür. Aşındırma kısa süreler halinde yapılarak kapasitans ölçümleri ile yatay aşınma miktarı kontrol altında tutularak yapılmıştır. Şekil 2.15.a ve b'de aygıtların taramalı elektron mikroskobu (FEI Nova Nanosem 430 and Nova 600i Nanolab) ile çekilmiş görüntüleri görülmektedir.



a)



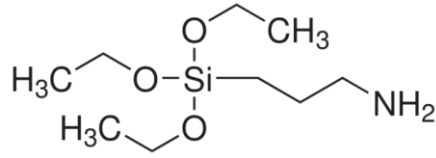
b)

Şekil 2.15.a ve b Üretilen biyosensörlerin fonksiyonalizasyon öncesi SEM görüntüleri

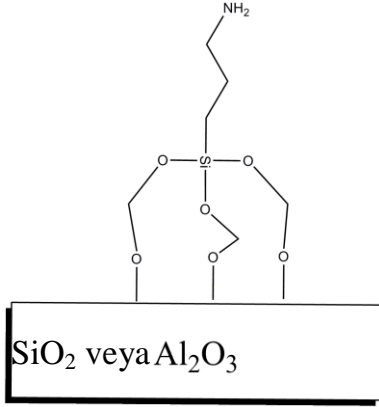
Dielektrik katman olarak sadece SiO₂ kullanılan aygıtlarda nano aralık başarılı bir şekilde elde edilmiş olmasına rağmen, sızıntı akımları sebebiyle bu aygıtların performansı çok azdır.

2.7. Sensör yüzeyinin fonksiyonizasyonu ve biyotinle kaplanması

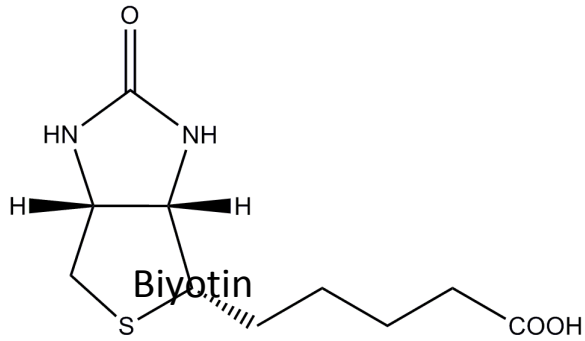
Fabrikasyonu tamamlanan sensörlerin yüzey fonksiyonizasyonu ve biyotinleme işlemi Dr. Mustafa Özgür Güler'in araştırma ekibi tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada hedef tanıma sistemi olarak streptavidin ve biyotin belirlenmiştir. Streptavidin ve biyotin, doğadaki bilinen en güçlü kovalent olmayan bağ yapma yeteneğine sahiptir [42]. Literatürde bu etkileşim sensör teknolojisi için genelde bir başlangıç konsepti olarak kullanılmaktadır [43,44]. Streptavidin ve biyotin, yüksek sıcaklık, pH, çözücülere ve deterjanlara karşı dayanıklıdır. Sert çevre koşullarına olan dayanıklılığı, bize biyoalgılayıcı uygulaması için empedans spektroskopisi nano aralıklı yapıların verimli çalışması için bir fırsat sunmaktadır. Boyutları itibariyle biyotinin 3 nm civarında olduğu bilinmektedir [45]. Diğer taraftan streptavidinin ise Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) verilerine dayanılarak 5,0 x 4,5 x 4,5 nm boyutlarında olduğu bilinmektedir [46]. Biyosensörün çalışma prensibi, hedef proteinlerin (streptavidin) tanıma elemanına (biyotin) bağlanması sonucu nano aralıktaki etkin dielektrik sabitinin değişimini tesbit etmeye dayalıdır. Bu nedenle, streptavidin uygulamadan önce, aktif bölgelere biyotinlerin bağlanması gerekmektedir. Bununla birlikte, biyotin SiO₂ tabakasına doğrudan bağlanmamaktadır. Bu nedenle, yüzey fonksiyonizasyon işleminde kimyasal modifikasyon yaparak yüzeye biyotinlerin bağlanması sağlanmalıdır. Yüzey, kendiliğinden bağlanma tek tabaka (SAM) işlemiyle kaplanır. Literatürde, SAM işlemi lipidler [65], aromatik moleküller [66], DNA [67] ve peptidler [68] gibi çeşitli biyo malzemelelerin fonksiyonizasyonu için kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında yüksek etikili yüzey fonksiyonizasyon işlemi olan APTS (Aminopropiltrimetoksilan) fonksiyonizasyon prosedürü kullanılmıştır [69,70]. APTS, etoksi ve ucunda amin gruplarına sahip bir moleküldür.



a)

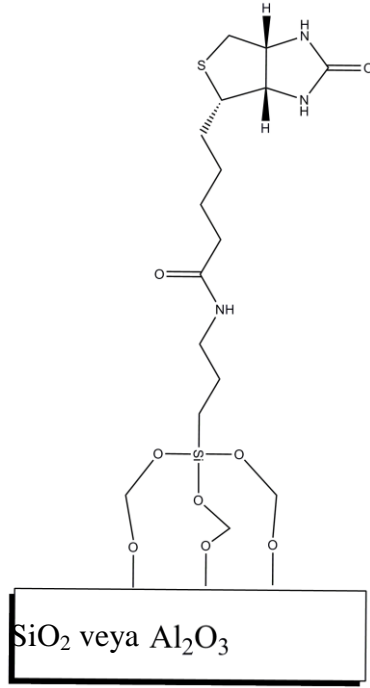


b)



c)

Şekil 2.16. a) SiO₂ yüzeyindeki serbest hidroksil grupların gösterimi, b) SiO₂ yüzeyindeki serbest hidroksil grupları ile APTS'in bağlanma mekaniği, biyotin streptavidin bağlanması, c) Biyotin streptavidin bağlanma mekaniği

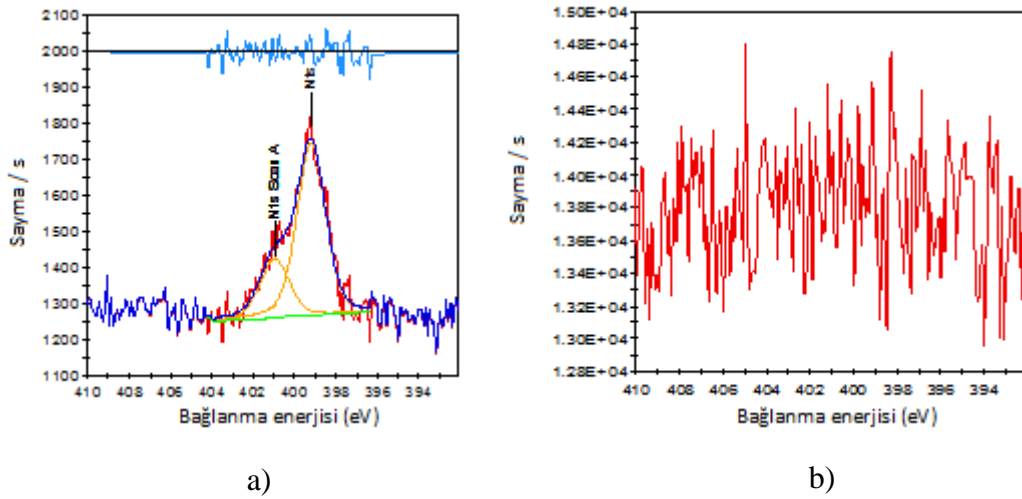


d)

Şekil 2.17 (devam). d) Yüzeyin biyotinle kaplanma mekaniği ve biyotin streptavidin bağlanmasının kimyasal gösterimi

SiO₂ yüzeyinde, havanın nem şartlarına bağlı olarak, bir kaç saat içerisinde serbest hidroksil grupları oluşmaktadır. APTS, etoksi grupları ile, bu hidroksil grubuna bağlanabilir. Diğer taraftan, APTS, biyotinin serbest karboksil gruplarıyla peptit bağı oluşturacak serbest amin gruplarına sahiptir. Bu nedenle, APTS, SiO₂ yüzeyi ve biyotin molekülleri arasında bir bağlantı kablosu görevi görebilmektedir. Yüzey fonksiyonizasyon işleminden önce, örnek yüzeyi, aseton, % 50 metanol, %50 toluen karışımı ve % 100 toluenle temizlenmektedir. APTS, Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir ve toluen içerisinde %5 APTS solüsyonu hazırlanmıştır. Temizlenen örnek, oda sıcaklığında 5 saat boyunca bu hazırlanan solüsyon içerisinde bekletildi ve toluen ve metanolla durularak, azot gazı ile kurutuldu. Bu aşamadan sonra örneğin yüzey özelliklerinin incelenmesi, X ışınları fotoelektron spektroskopisi ölçümleri ile incelenmiştir. Ölçümler, UNAM yüksek performanslı XPS spektrometresi (Thermo, K-Alpha) ile yapılmıştır. SiO₂ katmanı, nano aralıkta, üst elektrotun altında olduğu için XPS oradan ölçüm alamamaktadır. Bu sebepten dolayı, ölçümler, üzeri SiO₂ ile kaplanarak hazırlanan test örnekleri üzerinden yapılmıştır.

Bu yüzeylere, biyosensörlerle özdeş bir fonksiyonizasyon işlemi yapılmıştır. Azot (N) atomu APTS için bir göstergedir. Yüzey fonksiyonizasyon işleminde biyotin ve streptavidinler, altın elektrota bağlanmalarını gerekmektedir. Seçicilik açısından sadece SiO₂ yüzeye bağlanmaları gerekmektedir. Bu yüzden aynı şekilde üzeri altın ile kaplı test örnekleri oluşturularak onlar üzerinde de XPS ölçümleri yapılmıştır. Beklendiği gibi sadece SiO₂ yüzeyinde azot atomlarına rastlanmıştır (Şekil 2.17). SiO₂ kaplı olan yüzeyde azot atomları XPS analiz grafiğinde tepe noktası vermiştir ve Azot atomları APTS'e atfedilir. Buna benzer bir tepe grafik noktası Au kaplı olan yüzeyde gözükmemektedir (Şekil 2.17).

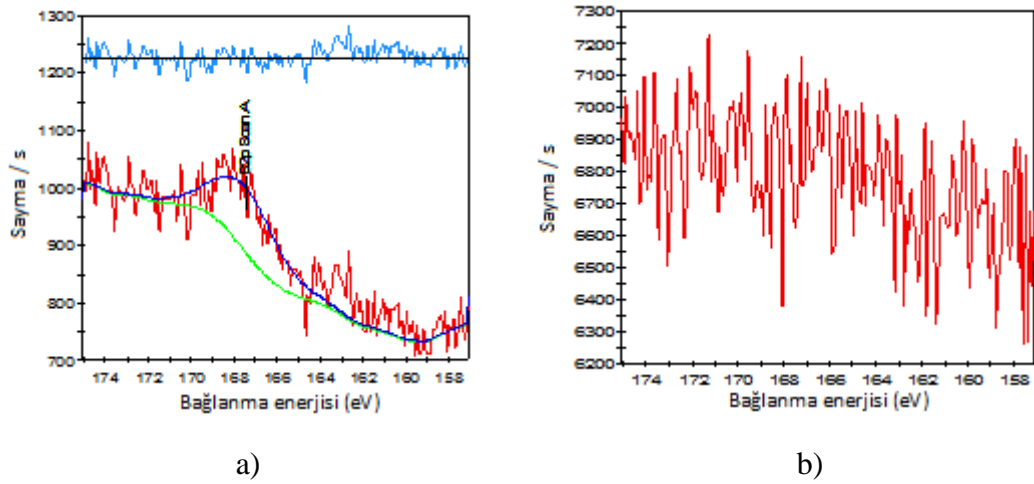


Şekil 2.18. Yüzey fonksiyonizasyon işleminden sonra alınan XPS sonuçları, a) SiO₂ ile kaplanan test örneğinin yüzey XPS sonuçları, b) Au ile kaplanan test örneğinin yüzey XPS sonuçları

Yüzey fonksiyonizasyon işleminin ardından, biyotinleme işlemi, biyotin moleküllerini fonksiyonize edilmiş nano aralık duvarlarda düzenlemekle başlar. Biyotinizasyon solüsyonu, 30 ml Dimetilformamid (DMF, Sigma-Aldrich'den satın alınan)'in içinde 2 mol biyotin (Sigma-Aldrich'ten satın alınan), 1,95 mol O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametil-uronium-heksafluoro-fosfat (HBTU), 3mol N,N-Diizopropiletilamin (DIEA, Merck) peptit bağ oluşmasına uygun olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu biyotin miktarı, yüzeydeki APTS'i kaplamak için gerekli olduğundan 10 kat daha fazladır. HBTU ve IDEA, karboksil gruplarını

biyotinizasyon için aktif hale geçirmek için kullanıldı. DMF ile yıkama işleminden sonra, malzeme oda sıcaklığında bu solüsyon içerisinde yaklaşık 2 saat kadar bekletildi. Sonunda, malzeme, diklormetan, etanol, iki kere damıtılmış su ile yıkandı ve azot gazı ile kurutuldu.

Biyotinizasyon işleminin sonucunda, fonksiyonalize edilen yüzeyin serbest amin grupları biyotinlerin karboksil gruplarıyla bağlanır (Şekil 2.16). Bu işlemler XPS ölçüleriyle doğrulanmıştır. XPS ölçümleri için test örnekleri hazırlanarak SiO₂ ve altın ile kaplanarak, yukarıda anlatılan fonksiyonalizasyon işlemleri uygulandı. Biyotin varlığını gösteren kükürt (S) atomu, yüzey üzerinde incelenmiştir (Şekil 2.18).

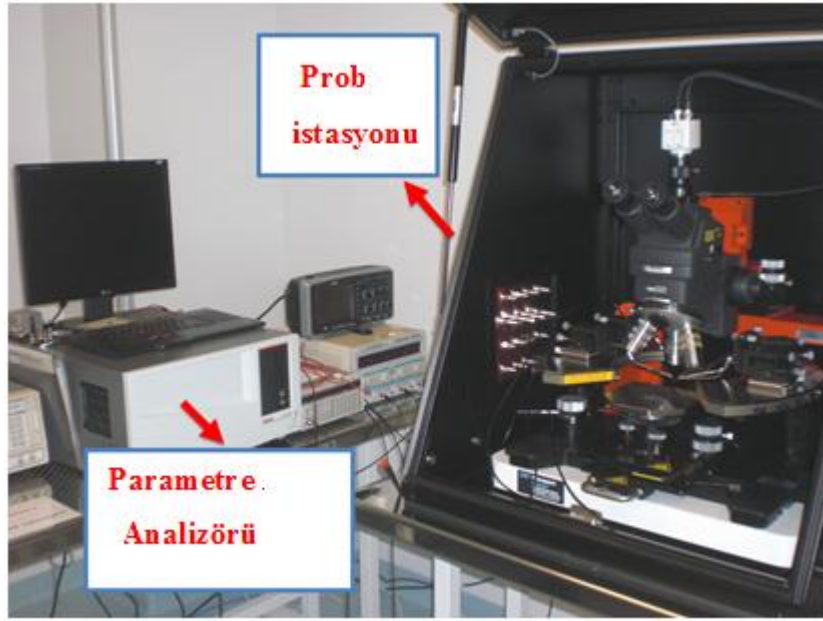


Şekil 2.19. Test örneklerinin fonksiyonalizasyondan sonraki XPS sonuçları, a) Yüzeyi SiO₂ ile kaplı olan test örneğinin yüzey XPS sonuçları, b) Yüzeyi Au ile kaplı olan test örneğinin yüzey XPS sonuçları

Sülfür atomlarının varlığı biyotine atfedilmektedir. Beklendiği gibi sadece SiO₂ yüzeyinde sülfür atomlarına rastlanmıştır (Şekil 2.18). Yüzey fonksiyonalizasyon işleminin ve biyotinizasyon işleminin ardından, aygıtlar etiketsiz streptavidin algılamak için hazır hale gelmiştir. Nano aralıklı yapılar, empedans spektroskopisiyle, hassas etiketsiz, yerinde bakım uygulamaları için, çekici özellikler sunmaktadır. Literatürde, yatay, ve dikey nano aralıklı aygıtların üretim teknikleri ele alındığında, dikey nano aralıklı aygıtların düşük maliyetli ve yüksek verimli ince filim büyütme teknikleri büyük avantajlar sağladığı görülmektedir.

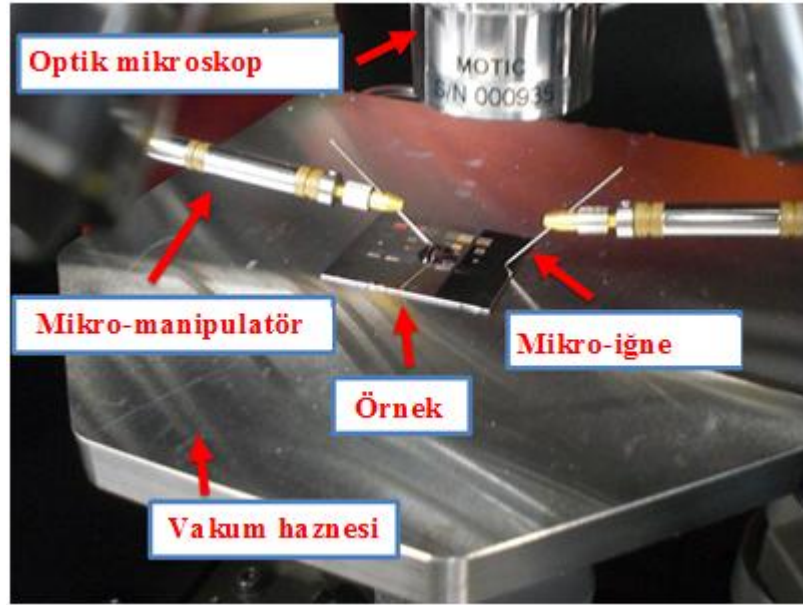
2.8. Ölçüm Sistemi

Üretilen biyosensörlerin empedans ölçümleri UNAM temiz odada yapılmıştır. Empedans ölçümleri için düşük frekanslı ölçümler yapabilen bir parametre analizörü (Keithley 4200-SCS with 4200-CVU) ve manuel prob istasyonu (Cascade PM-5) kullanılmıştır. Şekil 2.19’da Parametri analizörü ve prob istasyonu gözükmektedir.



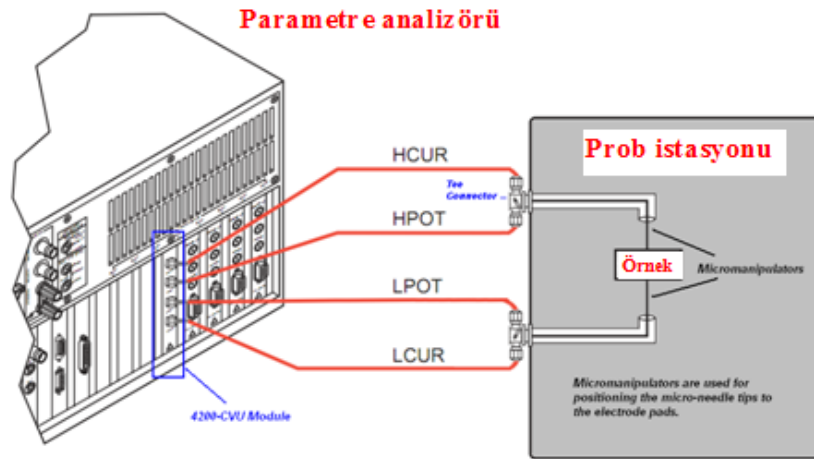
Şekil 2.20. UNAM temiz odada bulunan parametre analizörü ve prob istasyonu

Örnek, prob istasyonunun vakum haznesine yerleştirildi, mikro iğne uçları yardımıyla üst ve alt elektrotlardan bağlantı alındı (Şekil 2.20).



Şekil 2.21. Vakum haznesindeki örneğin mikro-ığneler vasıtasıyla elektriksel ölçümler için bağlantı alınmış durumundaki görünümü

Parametre analizörünün CVU modülü ile elektriksel bağlantı, herhangi bir parazit oluşmasını önlemek amacıyla koaksiyel kablolar üzerinden yapılmaktadır (Şekil 2.21).



Şekil 2.22. Parametre analizörü ile prob istasyonunun bağlantı şeması (CVU kullanma klavuzu)

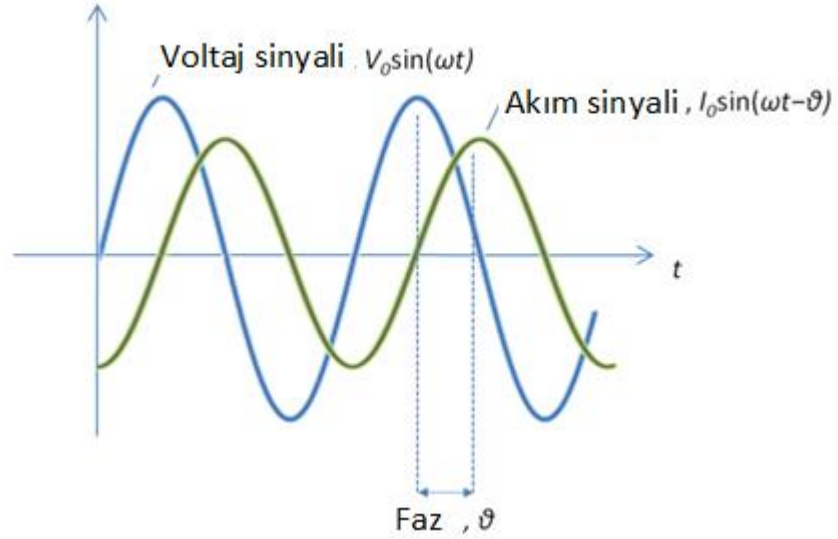
Parametre analizörü, numune üzerine AC kaynak voltajı uygulayarak AC akım ölçme prensibine dayalı olarak ölçüm almaktadır. Bu ölçümlerle empedansın

değerlerini elde etmek mümkündür. Şekil 2.8’de paralel kapasitans ve direnç modeli kullanılarak ölçülen empedans değerleri, C_p ve R_p ye dönüştürülür. C_p ’nin frekans ve zamana göre değişimleri ölçülerek, hedef proteinlerin bağlanması sonrasındaki C_p değerinde oluşan değişimler tesbit edilmiştir. Diğer taraftan R_p ’nin zamana bağlı olarak kararsız olduğu görülmüştür. Bunun muhtemelen alternatif elektrik alanında çözelti içerisinde bulunan iyonların hareket ediyor olması sebep olmuş olabilir. Uygulanan AC voltaj sinyal genliği 10 mVrms olarak ayarlanmıştır.

2.9. Biyosensör Uygulamaları İçin Empedans Spektroskopisi

Empedans spektroskopisi, ilgilenilen sistemin karakterizasyonunda kullanılan elektriksel temelli bir tekniktir. Empedans spektroskopisinin pek çok yönden avantajları vardır. Bunlardan bazıları, özgünlük, düşük maliyet, düşük güç gereksinimi, boyutta küçüklük ve kolay adapte edilebilirliktir [27].

Malesef, iyonik solüsyonlarda, empedans spektroskopisi, elektriksel çift katmanı adı verilen bir yük perdelemesi ile engellenir. Bu perdeleme empedans ölçümlerini etkilemektedir ve kapasitans artışına sebep olmaktadır. Bu perdelemenin önüne geçebilmek için nano aralıklı biyosensörler üretmek gerekmektedir. Empedans spektroskopisi, impedimetrik tepkilerle ilgilenir. Bu tepki, örneğin elektrik geçirgenliğine ve direncine bağlıdır. Empedans (Z) bir örneğin, uygulanan AC voltaja ve onun bir fonksiyonu olan frekansa karşı gösterdiği tepkidir. Eğer bir örnek ortama doğrusal değişkenlerle, AC voltajı uygulanırsa, geçen akıma ait bir sinyal elde edilir. Şekil 2.22’de örneğe uygulanan voltaj ve akımın gösterimi, V_0 ve I_0 akım ve voltajın büyüklüğü, ϕ ise aradaki faz farkıdır. V_0 ve I_0 büyüklükleri ve aradaki faz farkı ölçülebilir. Örneğin empedansı şu şekilde ifade edilir:



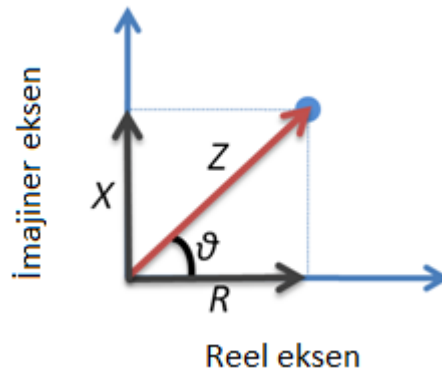
Şekil 2.23. Voltaj-akım sinyali grafiği

$$Z = \frac{V_0}{I_0} e^{j\theta} \quad (2.6)$$

Empedans, akım ve gerilim fazörlerinin oranıyla ifade edilen karmaşık bir büyüklüktür.

$$Z \triangleq \frac{V}{I} \quad (2.7)$$

2.7 bağıntısı Şekil 2.23’de gösterilen karmaşık düzlemde daha rahat anlaşılır.



Şekil 2.24. Karmaşık düzlemde empedansın grafiksel olarak gösterimi

Çizelge 2.4'te empedansla ilgili temel eşitlikler gözükmektedir, burada geçen Z Empedans, Y Admitans, R Direnç, G İletkenlik, X Reaktans, B Alınganlık, θ Faz açısıdır.

Çizelge 2.4. Empedansla ilgili temel eşitlik ve tanımlar

$Z = R + jX$	$R = Z \cos(\theta)$
$ Z = \sqrt{R^2 + X^2}$	$X = Z \sin(\theta)$
$\theta = \arctan\left(\frac{X}{R}\right)$	$Y = \frac{1}{Z} = G + jB$

2.9.1. Dielektrik sabiti (Bağıl geçirgenlik ϵ_r)

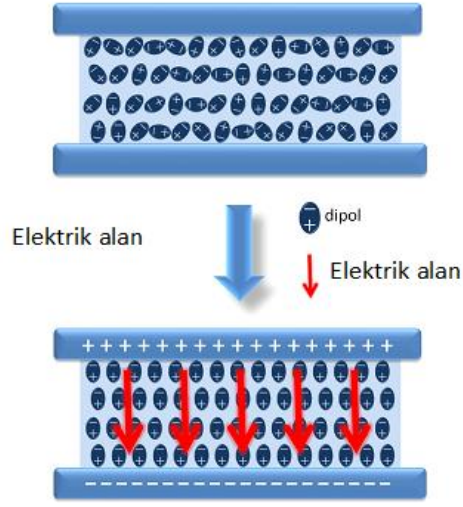
Dielektrik sabiti (ϵ_r), daha genel bir tanım olarak geçirgenliğe denk gelen bir tabirdir. 1787 yılında, Fransız bilim adamı Charles-Augustin de Coulomb tarafından ortaya atılan elektrostatik'in temel kavramlarına göre, iki yüklü parçacık arasındaki elektriksel etkileşim:

$$|F| = k \frac{|q_1 q_2|}{r^2} \quad (2.8)$$

Şeklinde verilir. Bu kanuna (Coulomb kanunu) göre, F , q_1 ve q_2 noktasal yüklerine etkileyen kuvvettir, r aralarındaki uzaklık, k ise orantı sabitidir. R kadar mesafedeki birim yük üzerine q noktasal yükü tarafından, etkileyen kuvvet elektriksel alan olarak adlandırılır.

$$|E| = k \frac{|q|}{r^2} \quad (2.9)$$

Burada k , orantı sabiti olup ortama bağlıdır. Boşlukta k 'nın değeri, $\frac{1}{4\pi\epsilon_0}$ 'dır ve aynı zamanda Coulomb sabiti olarak da bilinir ve değeri, yaklaşık $8.9876 \times 10^9 \text{ N m}^2 \text{ C}^{-2}$ dir. ϵ_0 , boşluğun geçirgenliğini ifade eder ve yalıtkan ortamın göreceli geçirgenliği ile çarpılır. Bir dielektriksel malzemenin içerisindeki elektrik alan, elektriksel malzemenin geçirgenliği ile ters orantılıdır. Bu sebeple, geçirgenlik, ortama uygulanan elektrik alana karşı, gösterdiği direnç olarak da açıklanabilir. Geçirgenliğin temeli, dielektrik içindeki dipollerle ilgilidir. Bir dielektrik molekülü, makroskopik olarak nötr olsa da, elektrik alan uygulandığında pozitif ve negatif yüklerin, küçük yerdeğiştirmeleri sözkonusu olur ve molekül bir dipole dönüşür. Elektrik alan uygulandığında dipole dönüşen bu moleküllere, kutupsal olmayan moleküller denir. Ayrıca H_2O gibi bazı moleküller ise, elektrik alan uygulanmasa da kutuplanma etkisi gösterebilirler. Bunlara ise kutupsal moleküller denir. Dielektrik bir malzemede, polar moleküller bulunsu bile kutuplanma etkisi gözlenmez. Bunun sebebi, moleküllerin rastgele yerleşimi ve birbirinin etkilerini yok etmeleridir. Bir elektrik alan uygulandığında, dipollere bir kuvvet etkir. Yerlerindeki rastgelelik kaybolur, hepsi elektrik alan doğrultusunda dizilirler. Şekil 2.23'de gösterildiği gibi, dipoller elektrik alana paralel olacak biçimde dizilirler. Geçirgenlik, bu yerleşim durumuyla ilgili bir kavramdır. Bu olaya dielektrik polarizasyon denir ve uygulanan elektrik alana zıt yeni bir elektrik alan oluşur. Bu da geçirgenlik ve orantı sabiti arasındaki ters orantıyı açıklar. Geçirgenlik, uygulanan tahrik frekansının bir fonksiyonudur. Dolayısıyla, elektrik alanın yönü ve şiddeti değiştiği zaman, dipoller de yön değiştirecek ve kendilerini elektrik alana göre konumlandıracaklardır. Maddenin tepkisi anında olamayacağından dolayı, frekans arttıkça dipollerin alana uyum sağlama başarıları azalacaktır ve geçirgenlik azalmaya başlayacaktır. Bu olay, çok yüksek frekanslarda gerçekleştiğinden (Su molekülleri için 2,5 GHz civarı), Bu tez çalışmasında çalıştığımız 1-100 kHz frekans aralığında, göreceli geçirgenlik sabit kabul edilmiştir. Şekil 2.24'te plakalar arasında elektrik alan uygulandığı zaman dipollerin dizilim şekilleri gözükmetedir.



Şekil 2.25. Uygulanan elektrik alanda dipollerin dizilim şekli

Düşük frekanslarda göreceli geçirgenlik, genellikle dielektrik sabiti olarak adlandırıldığından, bu tez çalışmasında dielektrik sabiti olarak adlandırılacaktır. Bu tez çalışmasında kullanılan solüsyonların dielektrik sabit değerleri Çizelge 2.5'te görülmektedir.

Çizelge 2.5. Bu çalışmada kullanılan farklı solüsyonların, dielektrik ve biyolojik malzemelerin dielektrik sabit değerleri [45,71]

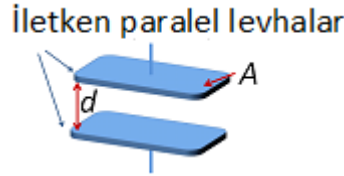
Ad	Dielektrik sabiti
Damıtılmış su	80
Metanol	33
Isopropanol	18
Al ₂ O ₃ (ALD)	8
SiO ₂ (PECVD)	5
Biyotin	2
Streptavidin	2
Hava	1

2.9.2. Paralel levha kondansatörler

Kapasitans, sistemin yük depolama kabiliyeti, kapasitör ise bu amaç için kullanılan sistemin adıdır. Kapasitans (C), uygulanan birim voltaj (V) başına düşen yük (Q) miktarı olarak açıklanabilir.

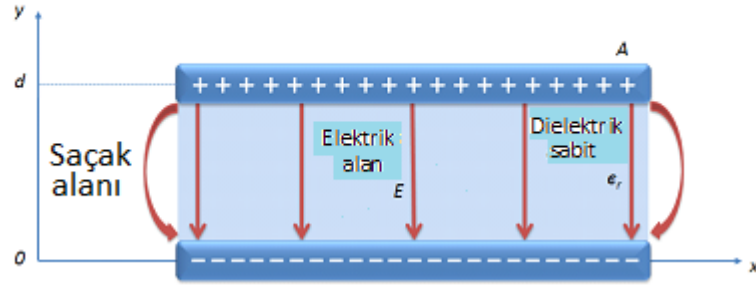
$$C = \frac{Q}{V} \quad (2.10)$$

En çok kullanılan kapasitör çeşidi paralel levha kapasitörlerdir (Şekil 2.25). Kapasitörler sadece elektrik devrelerinde kullanılan bir araç değildir. Kapasite temelli olaylarda kullanılan temel bir araçtır. İki yüklü paralel levhanın düşünüldüğü, her yerde kullanılabilir. (Yarı iletkenler, foto dedektörler, biyosensörler). İki levha arasındaki boşluk, dielektrik sabiti (ϵ_r) olan dielektrik malzeme ile doldurulmuştur.



Şekil 2.26. Paralel levha kapasitör

Şekil 2.26'da gözüktüğü gibi elektrotlara bir voltaj uygulandığından elektrotlar arasında bir elektrik alan oluşur. Kenarlarda oluşan saçaklanma alanı, bu tez çalışmasında levhaların boyutu ile levhalar arasındaki d boşluğu karşılaştırıldığında, yeterince küçük olduğundan ihmal edilebilir. Dolayısıyla elektrik alan dielektrik malzemeye dolu olan bölgeyle sınırlandırılmış olur ve Gauss kanunu kullanılarak bulunur.



Şekil 2.27. Paralel plakalı kapasitörün kesit görünümü

$$\oint E \cdot ds = \frac{Q}{\epsilon} \quad (2.11)$$

Paralel levha kapasitörün kapasitansı ise,

$$C = \epsilon \frac{A}{d} = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d} \quad (2.12)$$

dir. Bu formül paralel olan iletken levhaların bulunduğu, çeşitli durumlarda kapasitans hesaplamalarında kullanılan, çok faydalı bir formüldür. Fakat, levhalar arasındaki d mesafesinin levha boyutlarına yaklaştığı durumlarda saçak alanlarına dikkat edilmelidir.

2.9.3. Elektriksel çift katman

Paralel plakalı kondansatörlerde bir plakanın yüzey alanı A , plakalar arasında kalan mesafe d olacak şekilde dielektrik solüsyonun içerisinde konumlandırıldıklarında, oluşan kapasitörün kapasitans değeri, denklem 2.12’de verildiği gibidir. Ancak genellikle durum gözüktüğünden farklı olmaktadır. Bunun sebebi plakaların yakınında iyonların birikmesiyle oluşan katmanlardır. Bir elektrik alan uygulandığında iyonlar ters yükle yükle plakalara doğru hareket ederler ve onun

çevresinde bir elektriksel katman çifti oluştururlar. Bu durum kapasitansı arttıracak bir etki meydana getirmektedir [27].

Yerinde bakım biyosensör uygulamalarında empedans spektroskopisi kullanılabilir. Etiketsiz ve düşük maliyet gibi pek çok faydaları vardır. Ancak, empedans spektroskopisi elektriksel çift tabaka oluşumunu beraberinde getirmektedir. Bu kapasitansı arttıran bir etki olduğu için, ölçümlerin güvenilirliğini olumsuz etkileyeceğinden dolayı istenmeyen bir durumdur. Bu tez çalışmasında, elektrotlar arası nano aralık uygulaması yapıldığı için ve DI su kullanıldığı için, bu durum bertaraf edilmeye çalışılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

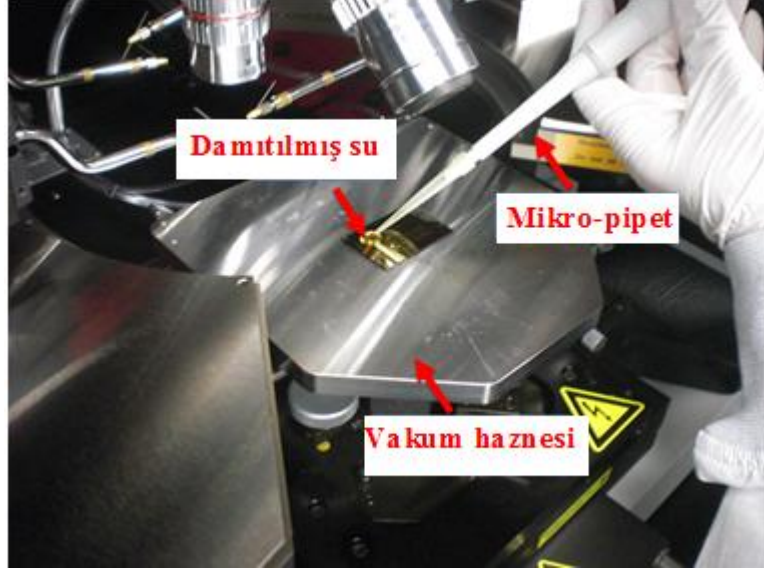
3.1. Hedef proteini algılama hassasiyeti

Bu bölümde Streptavidin-biyotin çifti yerinde bakım uygulamaları için nano aralıklı yapılarda empedans spektroskopisinin verimliliğinin doğrulanması için çalışılmıştır. Streptavidin ve biyotin arasında doğada bilinen en güçlü kovalent olmayan bağ olduğu iyi bilinmektedir [42]. Bu biyomoleküler sistem ayrıca bazı hastalıkları teşhis için uygulamalara fikir verebilir [45] Streptavidin, Sigma-Aldrich'den alınmıştır ve proteinin bozulmasını önlemek için fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS, pH 7.4) kullanılmıştır. PBS çözeltisi, KCl, 80 g NaCl, 2,4 g KH₂PO₄, 14,4 g K₂HPO₄ 1000 ml iki kere damıtılmış su içerisinde çözülerek hazırlanır. Streptavidin 100 µg/ml den başlayarak, onar kat azalarak 10 ng/ml seviyesine kadar seyreltilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan Streptavidin konsantrasyonları

Konsant.	µg (50 µl'de)	Pmole	Protein (#)	Molar kon. (µM)
100 µg/ml	5.00e+00	8.20e+01	4.93e+13	1.64e+00
10 µg/ml	5.00e-01	8.20e+00	4.93e+12	1.64e-01
1 µg/ml	5.00e-02	8.20e-01	4.93e+11	1.64e-02
100 ng/ml	5.00e-03	8.20e-02	4.93e+10	1.64e-03
10 ng/ml	5.00e-04	8.20e-03	4.93e+09	1.64e-04

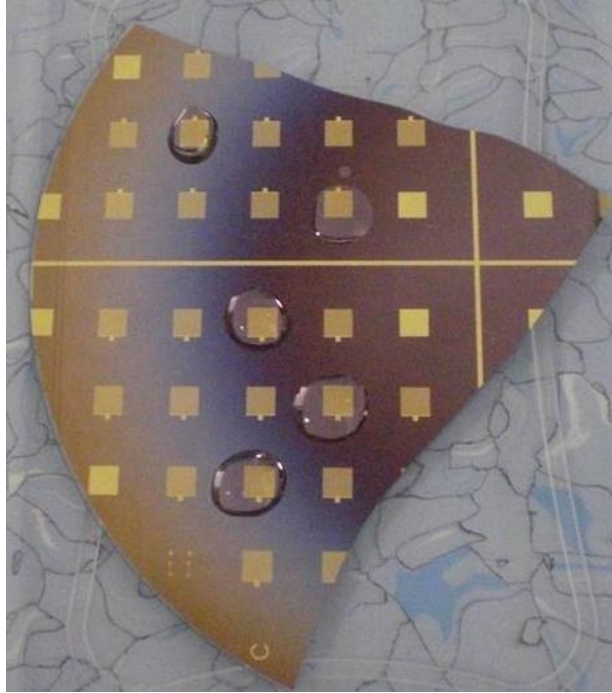
Biyotin uygulamadan önce, aygıt iki kere damıtılmış su (DDI) içerisinde ölçülerek, referans ölçümleri alınmış olur (Şekil 3.1). Referans ölçümleri nano aralıkların DDI su ile doldurularak alınmıştır. Bunun sebebi suyun dielektrik sabiti ile streptavidinin dielektrik sabiti arasında yaklaşık 40 kat gibi bir fark olmasıdır. Aygıtın üzerine 30 µl DDI su damlatılarak ölçümler alınmıştır. Bu hacimdeki su, aygıtın her yerini kaplamak için yeterli olmaktadır. Damlatılan suyun hacminin artırılması ölçüm sonuçlarını değiştirmedeği ölçümler esnasında görülmüştür.



Şekil 3.1. Damıtılmış suyun örneğe mikro-pipetle uygulanma şekli

Bundan sonra, optik mikroskop altında sensöre bağlantı alındı. 1kHz-100kHz aralığında empedans ölçümleri yapıldı. Parametre analizörü, 10MHz'e kadar geniş bir frekans yelpazesi sunar, ancak yüksek frekans değerlerinde güvenilir sonuçlar elde edilememiştir. Bunun sebebi, kablo indüktansının ($j2\pi fL$, seri bağlı) yüksek frekanslarda baskın olmasıdır. Böylece ölçülen empedans yüksek frekanslarda hızla artış göstermektedir. Benzer bir etkiye literatürde, ticari seramik kapasitörlerin test ölçümlerinde rastlanmıştır [72]. Ölçüm işleminin sonunda, aygıt damıtılmış su ile yıkandı, azot gazı ile kurutuldu ve sonuçlar streptavidin öncesi olarak kayıt edildi. Streptavidin solüsyonu mikropipet yardımıyla, aygıtların üzerine damlatıldı (Şekil 4.15) ve bağlanma işlemi için on saat kadar bekletildi. Bu süre, nano aralıklardaki duvarlara streptavidinlerin bağlanması için oldukça yeterli bir süredir ve süre kısaltılabilir. Mikro akışkan kanallar kullanılarak aktif bölgelerden defalarca geçirilmek suretiyle bu süre birkaç dakikaya kadar indirilebilir. Bilindiği kadarıyla bu immobilizasyon için literatürde standart bir süre yoktur. Bazı çalışmalarda 15 dakika [73], bazı çalışmalarda ise 4 saat uygulanmıştır [45]. Bununla birlikte, bu sürenin belirlenmesinde konsantrasyon da önemlidir. Örnek verilecek olursa, eski yapılan bir çalışmada [73] $2,5\mu\text{M}$ konsantrasyonundaki streptavidin solüsyonu için 15 dakika, farklı bir çalışmada ise 300 nM konsantrasyonundaki streptavidin solüsyonu [45] için 4 saat uygulanmıştır. Böylece, bu tez çalışmasında en az

konsantrasyonu 164 pM (Çizelge 3.1) olduğundan dolayı, streptavidin solüsyonunun sensörün aktif duvarlarına bağlanma süresi olarak 10 saat uygun gözükmektedir. Streptavidinin bağlanma süresinin belirlenmesi ile ilgili deney sonuçları ilerideki bölümlerde tartışılacaktır. Streptavidin solüsyonunun sensörün üzerinden 10 saat boyunca beklerken buharlaşmaması için, örnek vakumlu bir kap içerisinde muhafaza edilmiştir. Şekil 3.2’de streptavidin solüsyonlarının sensörlerin üzerine, nano aralıklara bağlanmaları amacıyla damlatıldığı anki görüntüsü gözükmektedir.

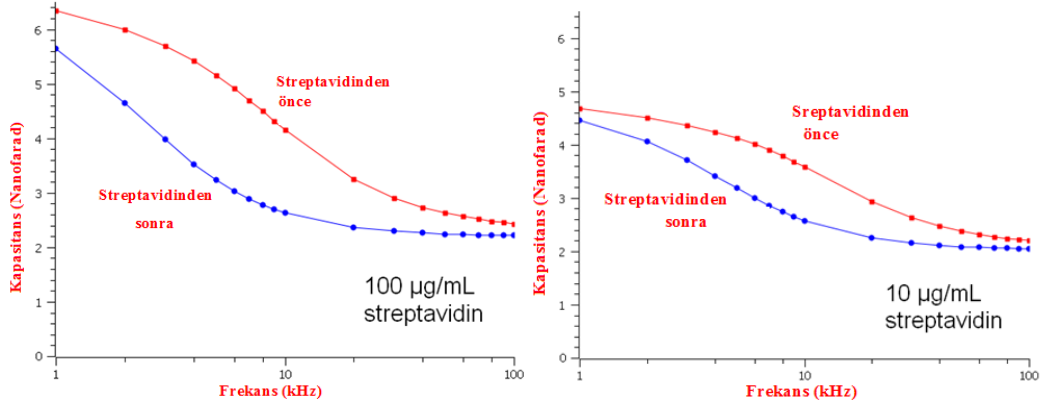


Şekil 3.2. Yapıların üzerine streptavidinler damlatılmış durumdaki görüntüsü

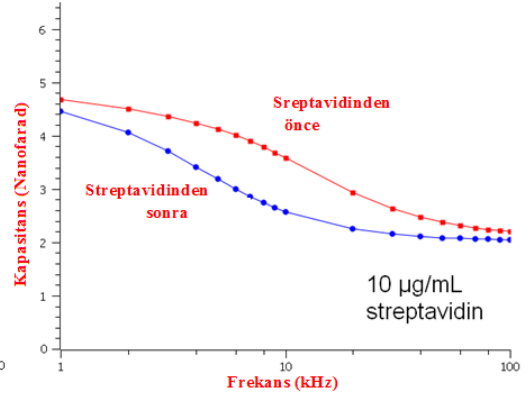
Bu bekleme süresinin ardından sensörler DI su musluğunun altına tutularak yıkanmış, ardından azot gazı ile kurutulmuştur. Spesifik olmayan bağlanmaların olması ihtimaline karşın, su ile yıkama bu bağlanmaları çıkaracaktır. Bu aşamanın sonunda streptavidinler, nano aralıklı yapıların duvarlarında bulunan biyotinlere çok sıkı bağlarla bağlanmışlardır. İmmobilizasyon işleminden sonra örnek, vakum haznesine koyularak streptavidin sonrası empedans ölçümleri için hazırlanır. Bu ölçümler, aynı frekans değerlerinde alınmıştır ve streptavidin bağlanmadan önceki değerlerle mukayese edilmiştir. Şekil 3.3’de beş farklı streptavidin konsantrasyonu uygulanan aygıt için, kapasitans değişim grafikleri gözükmektedir. Streptavidin

bağlanmadan önce alınan DI su içerisindeki ölçümlerde nano aralıkları DI su doldurmuştur, streptavidin bağlandıktan sonra alınan empedans ölçümlerinde ise nano aralıklardaki duvarlara bağlanan streptavidinler, daha önceki ölçümlerde su olan yerlere yerleşmişlerdir ve streptavidinin dielektrik sabiti suyun dielektrik sabitinin yaklaşık kırkta biridir. Bu nedenle kapasitans değerlerinde azalma beklenmektedir (Çizelge 2.3). Şekil 3.3’de gözüktüğü gibi, kapasitans değerlerinde beklendiği gibi bir azalma görülmüştür.

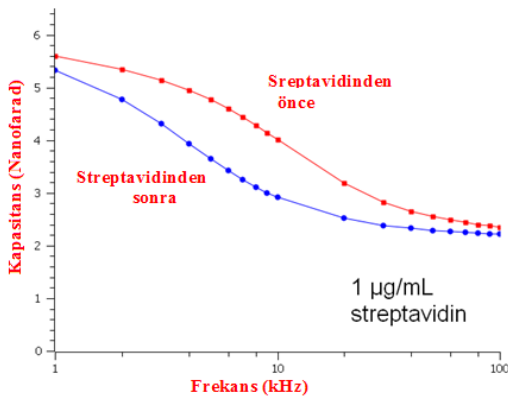
Şekil 3.3’de gözüktüğü gibi, streptavidin öncesi değerler tüm aygıtlar için aynı değildir. Ölçümler aynı alttaş üzerindeki farklı aygıtlar üzerinde alındığı için ve SiO₂ kalınlığı altlığın her yerinde aynı olmadığı için bu değerlerin farklı olması zaten beklenmektedir. Bu sebeple, altlığın merkezinden kenarlara doğru gidildikçe dielektrik katmanın kalınlığı azaldığından dolayı kapasitans değeri de azalacaktır. En yüksek konsantrasyon değerindeki streptavidin solüsyonu uygulanan aygıtta (100 µg/ml) yapılan kapasitan ölçümlerinde, streptavidin bağlanmadan önceki değerlerine göre 1.93 nF civarında bir azalma gözlenirken, en düşük konsantrasyon değerindeki (10 ng/ml) streptavidin solüsyonuna tabi tutulan aygıtta bu azalma, 475 pF civarındadır. Yani biyosensör bu konsantrasyon aralığını algılayabilmektedir.



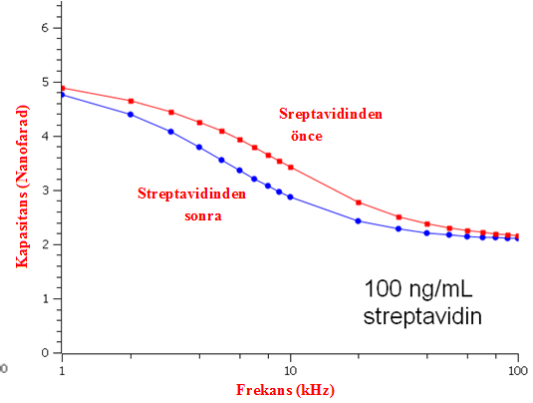
a)



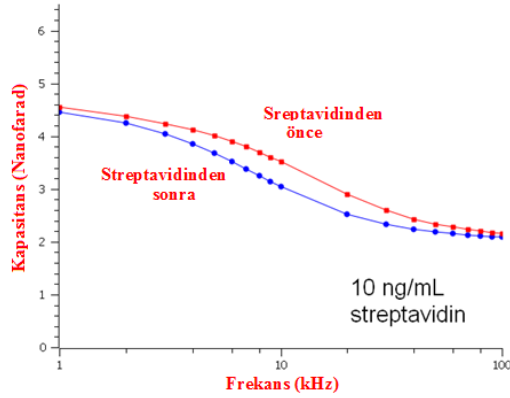
b)



c)



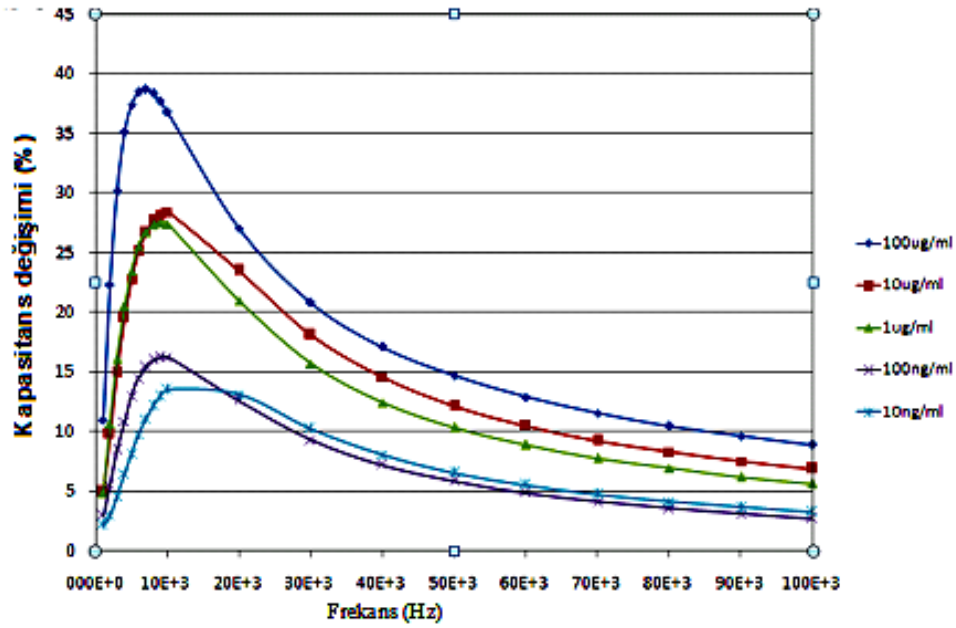
d)



e)

Şekil 3.3. a) 100µg/ml streptavidin uygulanan sensörün, b) 10µg/ml streptavidin uygulanan sensörün, c) 1µg/ml streptavidin uygulanan sensörün, c) 100ng/ml streptavidin uygulanan sensörün ve d) 10ng/ml streptavidin uygulanan sensörün edilen kapasitansın (C_p) frekansa (f) göre değişimi grafikleri

Streptavidin bağlanmadan önce ve sonra ölçülen kapasitans değerleri karşılaştırıldığında; bütün aygıtların DI su içerisinde ölçülen kapasitans değerlerinin azaldığı gözlenmektedir. Farklı konsantrasyonlarda damlatılan streptavidinlerin meydana getirdiği azalmalar karşılaştırıldığında en yoğun olan çözeltinin meydana getirdiği azalmanın en fazla olduğu, en az yoğun olanın ise en az olduğu ve yoğunluklarla kapasitans değişim değerlerinin doğru orantılı olduğu görülmektedir. Yoğun olan çözeltilerde streptavidin sayısı fazla olduğundan aktif yüzeye bağlanan streptavidin sayıları da fazla olması beklenmektedir. Ölçüm sonuçları bunu doğrulamaktadır. Şekil 3.4'te farklı konsantrasyonlardaki streptavidin çözeltilerinin sensörlerde meydana getirdikleri kapasitans değişim yüzdesi- frekans grafikleri görülmektedir.



Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlardaki streptavidin çözeltilerinin sensörlerde meydana getirdikleri kapasitans değişim yüzdesi- frekans grafikleri

Kapasitans ölçümleri frekans değerlerine göre incelendiğinde, 10 kHz frekans değerinde alınan ölçümlerin daha hassas sonuçlar verdiği belirlenmiştir. 50 kHz de alınan ölçümlerde 100ng/ml ve 10ng/ml konsantrasyonlarını birbirinden ayırt

edemediğimiz gözükmemektedir, bu problemin deneysel hatalar içerisinde kabul edilebileceği düşünülmektedir. 10 kHz de alınan ölçümlerde bu problemin gözükmediği, 100ng/ml konsantrasyonundaki solüsyonla 10ng/ml konsantrasyonundaki solüsyonu birbirinden ayırt edebildiğimiz görünmektedir (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. Farklı konsantrasyonlardaki streptavidin çözeltilerinin sensörde meydana getirdikleri kapasitans değişimleri (50 kHz ve 10 kHz)

Konsantrasyon	Streptavidinden önceki kapasitans değeri (nF) (10 kHz)	Streptavidinden sonraki kapasitans değeri (nF) (10kHz)	50 kHz'de alınan streptavidin sorası kapasitans değişimi (%)	10 kHz'de alınan streptavidin kapasitans değişimi (%)
100µg/ml	2.62	2.24	%14.67	%38.6
10µg/ml	2.37	2.08	%12.16	%28.5
1µg/ml	2.55	2.28	%10.32	%27.5
100ng/ml	2.30	2.17	%5.82	%16.5
10ng/ml	2.33	2.18	%6.63	%13.3

Çizelge 3.3'de gözüktüğü gibi, bu tez çalışmasında ortaya koyulan algılama aralığı, literatürde daha önce yapılmış olan streptavidin-biyotin algılama aralıklarıyla karşılaştırılmıştır. Bu tez çalışması, nano aralıklı impedimetrik temelli streptavidin-biyotin algılama uygulamasıdır ve daha önce yapılan benzer bir çalışma bulunamamıştır. Optik algılama sistemleriyle karşılaştırıldığında, bizim kullandığımız ölçüm yönteminin maliyeti çok daha düşük olmasına rağmen, algılama

aralıkları karşılaştırılabilir seviyede olduğu gözükmektedir. Buna göre, gelecekte, impedans tabanlı, tek kullanımlık, çip uygulaması şeklindeki biyosensörler, pahalı, optik tabanlı biyosensör sistemlerinin yerini alarak, erken teşhis için umut bekleyen kanser hastalarına nokta bakım test teknolojisi sunabilir.

Çizelge 3.3. Literatürde streptavidin algılama amaçlı uygulamaları bulunan etiketsiz biyosensör çalışmaları

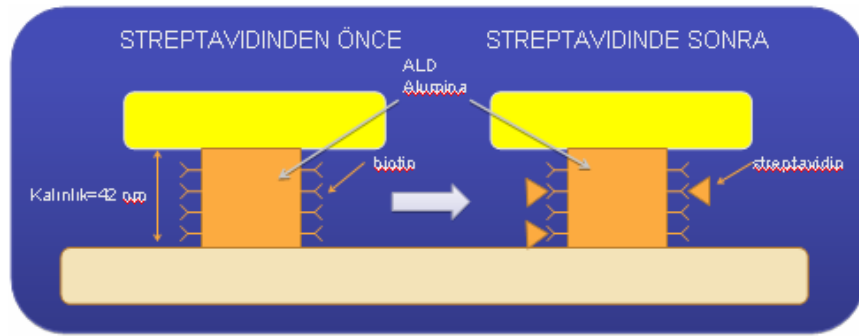
Yapı	Algılanan sinyal	Algılama aralığı		Yıl	Ref.
		Alt limit	Üst Limit		
Interferometre	Işık faz kaydırma	100 ng/ml	50 µg/ml	2011	[74]
Dielektrik modülasyonlu alan etkili transistör	Eşik voltajı	20 µg/ml		2007	[45]
Dikey yerleştirilen elektrotlar	Akım	100 ng/ml	20 µg/ml	2007	[75]
Nano tüp temelli alan etkili transistör	Akım	170 ng/ml		2003	[76]
Fiber Optik	Işık yoğunluğu	6.5 ng/ml	2 µg/ml	2002	[76]
Nanotel temelli alan etkili transistör	Akım	1.7 ng/ml	17 µg/ml	2001	[77]
Dikey yerleştirilen elektrotlar	Kapasitans	< 10 ng/ml	> 100 µg/ml	Bu tez çalışması	

Elde edilen ölçüm sonuçları aynı zamanda teorik değerlerle tutarlılık göstermektedir. Çizelge 2.2 ve Şekil 2.15 (yatay aşınma uzunluğu 500 nm alındığında), C_p değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuç C_{dl} (0.90 nF) ve C_{ng} (1.32 nF) eklendiğinde 2.22 nF'tır. Bu teorik hesaplama sonucu, özellikle yüksek

frekanslarda alınan ölçüm değerlerine çok yakındır (Şekil 3.3). Nano aralık tasarımı ve DI su kullanılması, ara elektriksel çift oluşumunu engellemek amacıyla olmasına rağmen bunun tam olarak elimine edilemediği gözükmektedir. Şekil 3.3’de 10 kHz’deki kapasitans değişimleri gözükmektedir. Bu elektriksel çift tabaka etkisinin hala geçerli olduğu düşük frekans değeridir. Bununla birlikte, boyutları açısından mukayese edildiğinde, streptavidin 5 nm civarındadır. Yatay aşınma miktarı ise 100 nm civarındadır. Böylece, nano aralık duvarları üzerinde streptavidinler bağlandığında elektriksel çift katman ile çok küçük bir kesişim alanı vardır (Şekil 3.3).

3.2. Dielektrik katman olarak sadece 42nm Al₂O₃ büyütülerek üretilen yeni biyosensörler ile farklı solüsyonların dielektrik sabitlerinin algılanması

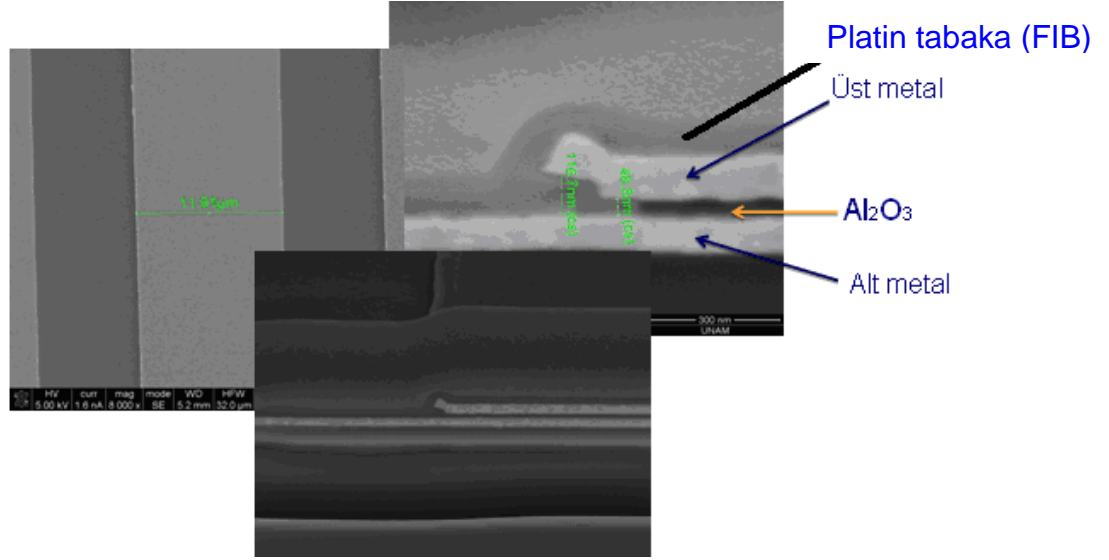
Nano aralık temelli impedimetrik biyosensörler, doğrudan kapasitans değişimi ölçümüne dayalı olarak çalışmaktadır. Bu yüzden sensörün hassasiyetine kapasitans değişim miktarına bakarak karar verebilmekteyiz. SiO₂ + Al₂O₃ katmanlarından oluşan yalıtkan katman yerine yalnızca 42 nm kalınlığında atomik katman depolama yöntemiyle büyütülen Al₂O₃ kullanılarak sensör yapıları üretildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Al₂O₃’ lü yapıların şeması ve çalışma prensibi

Şekil 3.6, üretilen sensörlerin FIB SEM ile alınmış kesit görüntülerini göstermektedir. Üst elektrotun yukarıya doğru büküldüğü gözükmektedir, bu bükülmenin kaldırma (lift-off) işlemi esnasında olduğunu düşünülmektedir, negatif

kaldırma (negative lift-off) yapılarak bu problem rahatlıkla çözülebilir [78]. Bu analizlerde, ölçümler 10 kHz’de alınmıştır. 10 kHz frekans değerinin tercih edilmesinin sebebi, daha önce yapılan streptavidin algılama deneylerinde en büyük kapasitans değişiminin, Şekil 3.3’de de gözüktüğü gibi bu frekans değerinde elde edilmiş olmasıdır.



Şekil 3.6. Yapıların odaklandırılmış iyon demeti taramalı elektron mikroskobu (FIB SEM) görüntüleri

DI su, metanol ve isopropanol olmak üzere üç farklı solüsyon seçilmiştir. Bu solüsyonların seçilmesinin sebebi literatürde bilinen dielektrik sabitlerinin birbirlerinden oldukça farklı olmasıdır. (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Bu analizlerde kullanılan solüsyonlar ve dielektrik sabit değerleri (ϵ_r) [65]

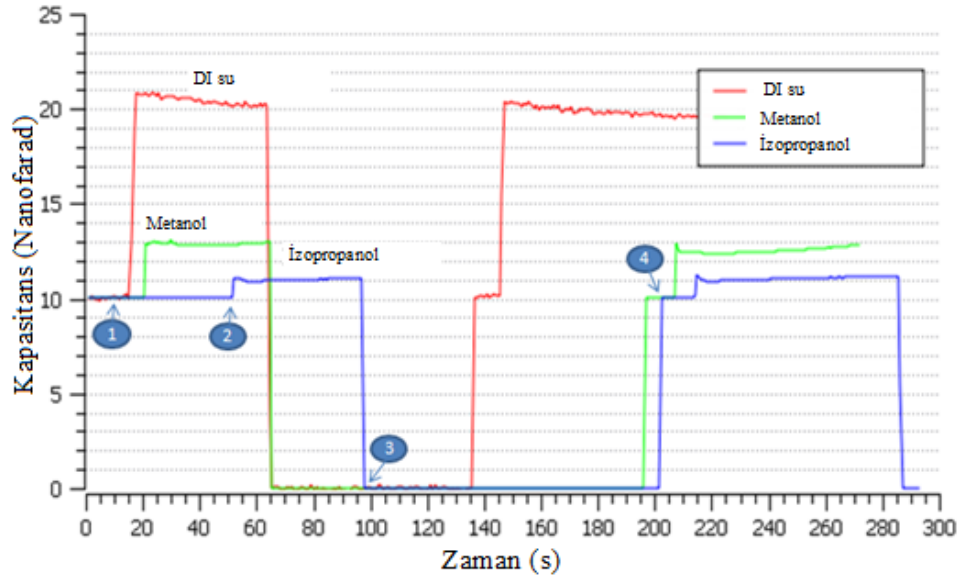
Solüsyon	Dielektrik sabit (ϵ_r)
DI su	80
Metanol	33
Izopropanol(IPA)	18

Örnek, vakum haznesine yerleştirilerek bağlantı alındıktan sonra ölçümlere başlandı. Şekil 3.8'e göre, ölçüm adımları, (1) Kuru ölçüm alındı. (2) Mikropipet vasıtasıyla solüsyon sensörün üzerine boşaltıldı. (3) Bağlantı kaldırıldı ve senör DI su ile yıkandı. Ardından azot gazı ile kurutuldu. Tekrarlanabilir olduğunun test edilmesi için tekrar 1. adıma geri dönüldü (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Tekrarlanabilirlik testi ölçüm şeklinin gösterimi

Şekil 3.8'de üç farklı solüsyon için alınan kapasitans zaman değişim grafikleri görülmektedir.



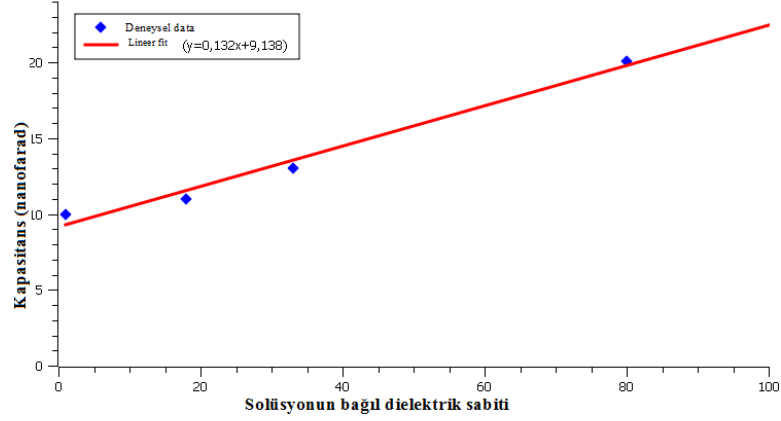
Şekil 3.8. Farklı solüsyonlar için 10 kHz frekans değerinde kapasitans zaman değişim grafikleri

Sensörlerin en az altı yaş-kuru ölçüm döngüleri için tekrarlanabilirliği kanıtlandı. Daha sonra, duyarlılık analizinde kullanılacak olan ortalama C_p değerlerini elde etmek için ortalama, 30 saniyeden daha fazla bir zaman içinde kendi en yüksek ve en düşük değerlerini dikkate alarak, üç sensörün çıkış sinyalleri alındı (Çizelge 3.5)

Çizelge 3.5. Üç farklı sensör için ölçülen kapasitans değerlerinin ortalaması C_p (nF)

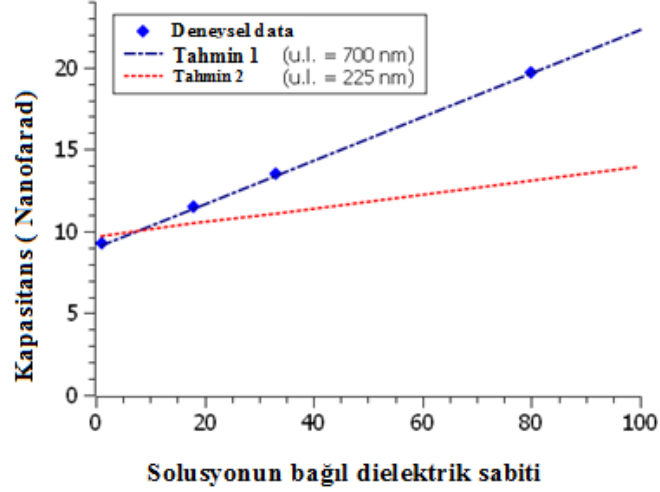
Aygıt	Hava (kuru) $\epsilon_r=1$		IPA $\epsilon_r=18$		Metanol $\epsilon_r=33$		DI Su $\epsilon_r=80$	
	En düşük	En yüksek	En düşük	En yüksek	En düşük	En yüksek	En düşük	En yüksek
#2	9.9	10.2	10.9	11.1	12.3	12.9	19.4	20.8
#8	10.0	10.0	11.0	11.3	12.4	13.6	19.5	21.1
#9	10.0	10.1	10.8	11.1	12.5	14.3	19.4	20.6
Ortalama	10.0		11.0		13.0		20.1	

İlgili solüsyonların, dielektrik sabitlerine bakıldığında, C_p - R_p modeli ile de beklendiği gibi C_p değerleri doğrusal değişim gösterir. Şekil 3.9'da gösterilen doğrusallaştırma, dielektrik sabitindeki birim değişiklik bakımından 132 pF olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, düşük maliyetli, yüksek çözünürlüklü bir sensör olduğunu bize göstermektedir. Üretilen bu sensörler, yüksek hassasiyetli, kimyasal ve gaz sensörleri gibi diğer uygulamalar için de uygulanabilir avantajlar sağlamaktadır [79,80].



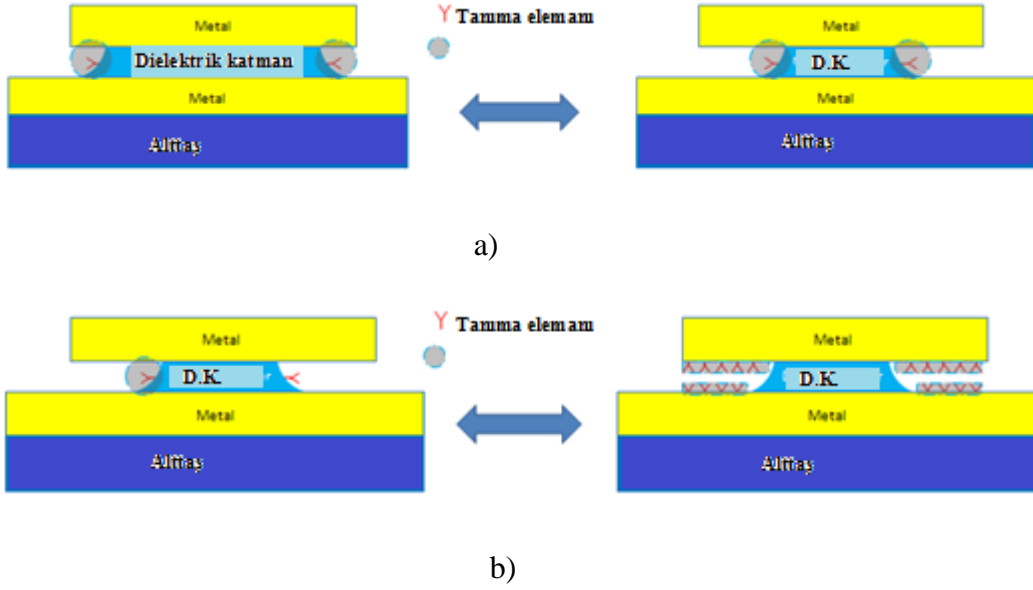
Şekil 3.9 Ortalama C_p değerlerine göre çizilen ve fit edilen kapasitans dielektrik sabit grafiği

Şekil 3.6'daki boyutlar kullanılarak, C_p değerleri yatay aşınma miktarları dikkate alınarak tahmin edilmektedir. Parmak genişliği olarak FIB SEM ile ölçülen 11.91 μm değeri alınmıştır. Parmakların kenarlarında gözlenen bükülmeler bazı bölgelerdeki dielektrik kalınlığını değiştirmektedir, ancak modellemeyi basitleştirme açısından bu durum ihmal edildi ve her yerde 42 nm dielektrik kalınlığı alındı. Yatay aşınma miktarı 700 nm olduğunda tahminin deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir (Şekil 3.9, Tahmin1). Fakat bu değer SEM ile ölçülen değerden çok fazladır (Şekil 3.6). Yüksek yatay aşınma miktarları, saçak alanlarına atfedilebilir. Bununla birlikte, burada saçak alanlarını ihmal edebilecek bir dayanağımız bulunmamaktadır ki; burada ayrılma mesafesi (42 nm) parmak genişliği (11,91 μm) açısından çok küçük bir değerdir. Şekil 3.6'daki SEM görüntüsünden elde edilen yatay aşınma miktarı 225 nm uzunluğu kullanılarak başka bir hesaplama yapabiliriz. Bu yatay aşınma değerinde tahmin edilen sonuç, Şekil 3.10 Tahmin2'de gösterilmektedir. Gözlenen kapasitans, özellikle yüksek frekanslarda tahmin edilenden daha fazladır. Bu farklılık, nano aralık yüksekliğinde yapılan ihmalden kaynaklanmamaktadır, çünkü bu ihmal, deneysel değerlerle tahmin arasındaki farkı azaltır, arttırmaz. Bu fark elektriksel çift tabaka oluşumuna bağlanabilir. Elektriksel çift tabaka oluşumu, uygulanan elektrik alanı korur ve bu kapasitans değerinin artmasına sebep olur.



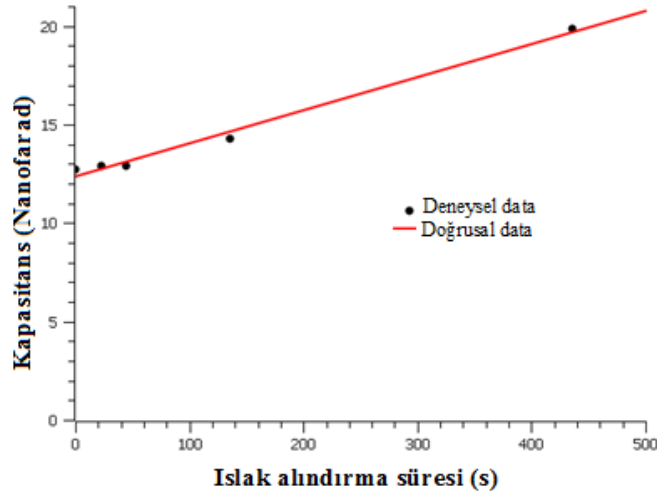
Şekil 3.10. Deneysel ve tahmini C_p değerleri karşılaştırma eğrileri

Bu deney 100 kHz gibi yüksek frekanslarda yapılırsa, iyonlar hızla değişen elektrik alana karşılık veremeyebilirdi ve deneysel C_p değerleri muhtemelen daha düşük ve 225 nm yatay aşınma uzunluğu olan tahmini C_p değerlerine daha yakın olurdu; fakat, bu da Şekil 3.3'e göre duyarlılığı azaltacağı için yüksek frekanslar bu bölümde tercih edilmemektedir. Duyarlılık yatay aşınma uzunluğu ile ayarlanabilir. Hemen hemen hiç Al_2O_3 'ün kalmadığı nihai durumlarda, hassasiyet dielektrik katsayısındaki birim değişim başına 1250 civarında pF olarak hesaplanmaktadır. Fakat yatay aşınma uzunluğunu artırmanın dezavantajları da vardır: 1. Bu parmak çökmesine neden olabilir. 2. Sıvılar mekanik sıvı problemleri nedeniyle yatay boşluğu doldurmayabilir. 3. Bu çalışmadaki biyosensörlerin gözden geçirildiği kadarıyla, immobilizasyon için dielektrik katman duvarları kullanmak yatay aşınma miktarı artsa bile yeri değiştirilmiş hacmi değiştirmez. Diğer taraftan, Şekil 3.11.b) gibi yüzey fonksiyonlandırmalar prosedürünü değiştirerek hassasiyet, yatay aşınma miktarı artırarak geliştirilebilir. İleriki bölümlerde bu konu deneysel sonuçlarla tartışılacaktır. Nano aralık içindeki metal parçaları kaplayacak bir yüzey fonksiyonlandırma prosedürü geliştirmek kolay değildir.



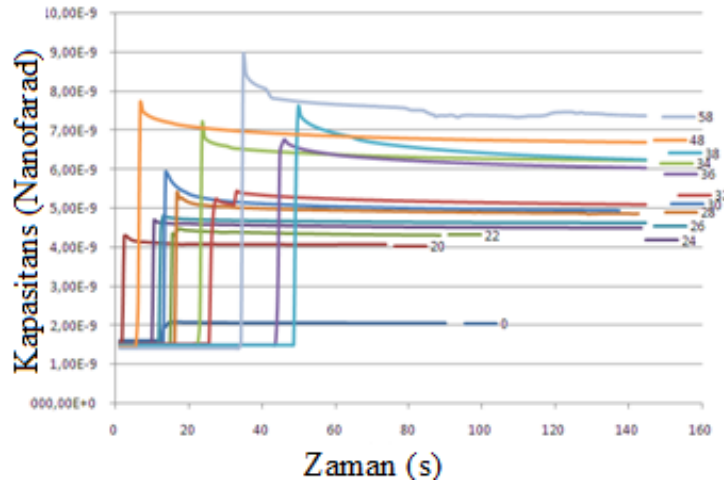
Şekil 3.11. a) Kısa yatay aşınma olması durumunda, b) daha uzun yatay aşınma olması durumunda, yüzey bağlanmalarının gösterimi

Aşındırma işlemlerinden sonra C_p değişimi Şekil 3.12'de gösterilmiştir. 10 kHz frekans değeri kullanılmış olmasına rağmen, 100 kHz gibi yüksek frekans değerlerinin elektriksel çift tabaka etkisini ortadan kaldırmak için kullanılması gerektiği gözükmemektedir.



Şekil 3.12. Islak aşındırma işlemleri sonrasında 10 kHz'de gerçekleştirilen ölçüm grafiği

Hassasiyet, parmak ve elektrotların boyutlarına da bağlıdır. Parmakların alanının artırılması, hassasiyeti arttıracaktır, ancak o zaman da nano aralık duvar yüzeyi artacak ve düşük konsantrasyonlar için hassasiyet performansı düşecektir. Aslında aktif yüzeyi an düşük değerde tutmak, küçük değişikliklerin hassas bir şekilde algılanmasına imkan sunacaktır. Bu şekilde hedef proteinler çok düşük konsantrasyonlarda da algılanabilecektir ki tek bir proteini algılayabilecek bir sensör yapmak, bu konuda araştırma yapanlar için nihayi bir hedef sayılabilir. Şekil 3.13'te Farklı aşındırma sürelerine göre DI su içerisinde alınmış kapasitans değerleri gözükmektedir.



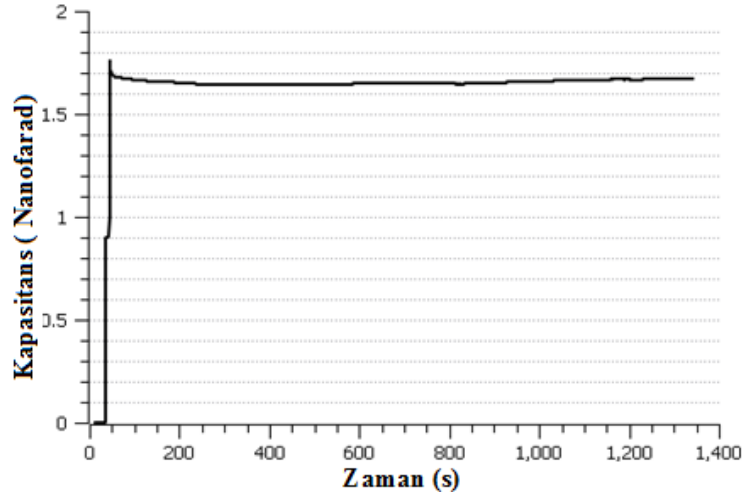
Şekil 3.13. Farklı aşındırma sürelerine göre DI su içerisinde alınmış kapasitans değerleri

3.3. Güvenilirlik testleri

Güvenilirlik testleri, kararlılık ve tekrarlanabilirlik doğrulamalarını içermektedir ki bunlar en azından ticarileştirme amacıyla uygulanan hassasiyet deneyleri kadar önemlidir. Ne yazık ki literatürde güvenilirlik testleri genellikle rapor edilmez [81].

3.3.1. Kararlılık testleri

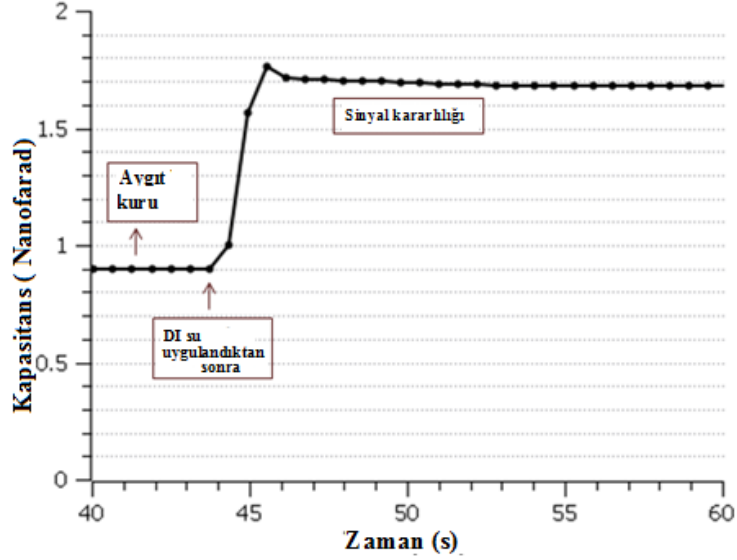
Kararlılık testi, Şekil 2.15’de gösterildiği gibi, sensörlerin biyotinlenmesinden sonar yapılır. Örnek vakum haznesi üzerine monte edildi ve bağlantı alındı. Kapasitans (C_p) – zaman değişimi ölçümlerine başladıktan kısa bir süre sonra, DI su mikropipet vasıtasıyla aygıtın üzerine damlatıldı ve aygıtın her yerini kaplaması sağlandı. Sinyal tepkisi 20 dk. süreyle gözlemlendi ki bu süre, tek empedans ölçümü için istikrar sağlandıktan bir saniye sonra ölçüm alınabilen, yerinde bakım uygulamaları için çok uzun bir süredir. Klinik uygulamaları dikkate alarak uzun süreli kararlılık testleri yapmak anlamlıdır. Bir diyabet hastasının glukoz düzeyi izlenmesi bu tür uygulamaya iyi bir örnektir. Şekil 3.14’ te görüldüğü gibi, DI su uygulamasından sonra, sinyal istikrarı, ± 0.03 nF bir tolerans bandı içerisinde, 1,67 nF civarında sağlanır. Sinyal, 20 dk. lık bir zaman aralığı boyunca, bu tolerans aralığında sürer.



Şekil 3.14. Kararlılık doğrulama için, 50 kHz frekans değerinde 20 dk. boyunca alınan kapasitans (C_p)- zaman değişim grafiği (0-1400 s. aralığı)

Kapasitanstaki küçük değişiklikler, hızla değişen elektrik alanı tarafından oluşturulan, statik olmayan iyonik dağılım nedeniyle olabilir. Tepki süresi, DI su uygulama anında sinyal yanıtındaki değişikliğin analizi ile ölçülebilir. Şekil 3.15’ te 10 saniyeden daha az olduğu gözükmektedir. Bu süre, nano boşluğun sıvı ile dolması

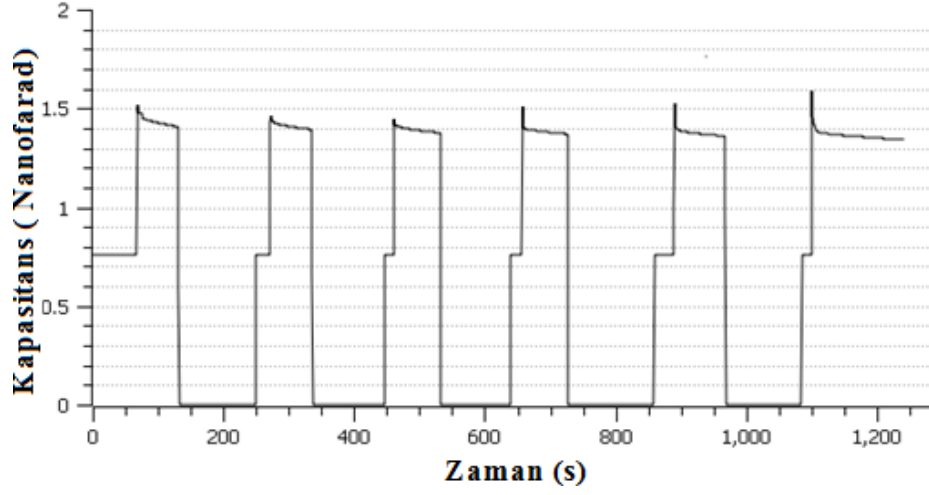
için geçen süredir. Aynı ölçümler ek olarak bir kaç sensörde de test edildi ve doğrulandı. Gözlenen tolerans bantları ve tepki süreleri, yerinde bakım uygulamaları için umut vericidir.



Şekil 3.15. Kararlılık doğrulama için, 50 kHz frekans değerinde 20 dk. boyunca alınan kapasitans (C_p)- zaman değişim grafiği (0-60 s. aralığı büyütülmüş grafik)

3.3.2. Tekrarlanabilirlik testleri

Tekrarlanabilirlik ölçümü, kuru ve DI su içerisindeki ölçümler 6-7 kez üst üste tekrar edilerek yapıldı. Şekil 3.16' da görüldüğü gibi, tekrarlama işlemi yapıldı, ancak her yeni ölçümde kapasitans değerinin 0,01 nF (%1 den daha az) seviyesinde azaldığı görüldü. Kurutma esnasında azot gazı tabancasının basınçla azot gazı püskürtmesi neticesinde sensörlerin fiziksel boyutlarında etkiler meydana gelmiş olabilir. Basınç nano aralık üzerinde asılı duran parmakları biraz büküyor olabilir. Bu azalma değerleri tolerans sınırlarının içerisinde. Benzer testler farklı aygıtlar üzerinde de tekrarlandı ve benzer şekilde kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar gözlemlendi (Şekil 3.16). PECVD tekniği ile üretilen SiO_2 her yerde aynı kalınlıkta olmadığı için, her bir sensör farklı kapasitans değerleri vermektedir, ancak bununla birlikte, her yerde aynı kalınlıkta büyütülen Al_2O_3 ile üretilen sensörler Çizelge 3.5'te gözüktüğü gibi birbirine çok yakın değerler vermektedir.

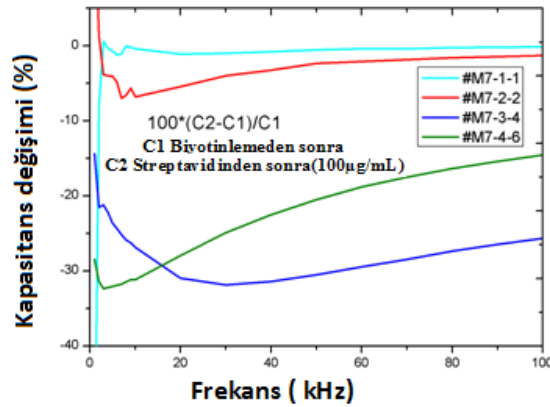


Şekil 3.16. Üst üste altı kez alınan kuru ve DI sudaki kapasitans- zaman değişim grafiği

Nano aralıklı biyosensörler, yerinde bakım uygulamaları için düşük frekansta çip uygulamalarına imkan vermektedir. Duyarlılık testleri, 10 ng/ml ile 100 µg/ml aralığında çeşitli streptavidin konsantrasyonlarının algılanabildiğini göstermiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu tez çalışması, streptavidin algılama amaçlı yapılan ilk nano aralıklı impedimetrik sensor uygulamasıdır. Nano aralıklı yapının dielektrik katsayısı birim değişikliği başına duyarlılığı 132 pF bulunmuştur. Bu kapasitif değişim, AD7147A [82] gibi düşük maliyetli, ticari çip ile birleştirilmesiyle kapasitansları tesbit edilebilir. Güvenilirlik testleri de biyosensor uygulamaları için kararlı ve tekrarlanabilir olduğunu ispat etmiştir.

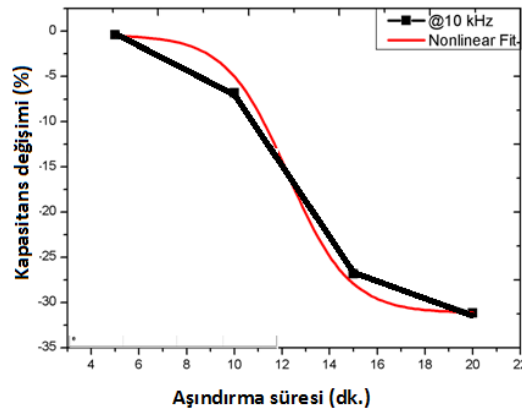
3.4. Aşındırma süresi, Kapasitans değişimi ilişkisi deneyleri

Deney sonuçları incelendiğinde, aşındırma süresinin artmasıyla hassasiyetin arttığı görülmektedir. Şekil 3.17 ve 3.18, Aşındırma süresi ile kapasitans değişimi arasında doğrusal olmayan bir grafik eğrisi oluşmaktadır. Şekil 3.17’de sırasıyla 5, 10, 15 ve 20 dakika ıslak aşındırma işlemine tabi tutulan, aynı geometriye sahip dört ayrı aygıtta 100 µg/ml konsantrasyonunda streptavidin uygulanmış ve streptavidin sonrası kapasitans değişimleri ölçülmüştür.



Şekil 3.17. Farklı aşındırma sürelerinin biyotinyeleme ve streptavidin bağlama sonrası kapasitans değerlerinin karşılaştırılması grafiği

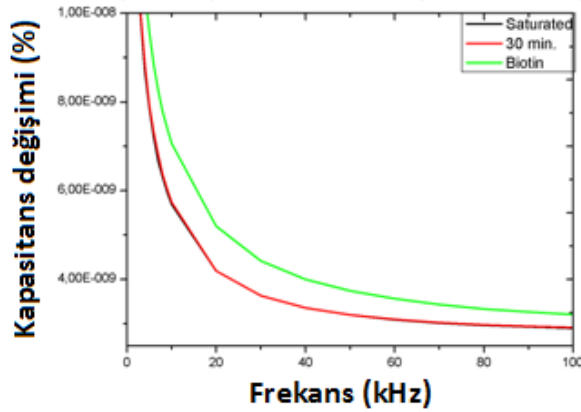
Şekil 3.18’de 5, 10, 15 ve 20 dakika ıslak aşındırma işlemine tabi tutulan dört farklı aygıtın 100 µg/ml konsantrasyonunda streptavidin uygulandıktan sonraki kapasitans değişiminin aşındırma süresine göre değişim grafiği görülmektedir.



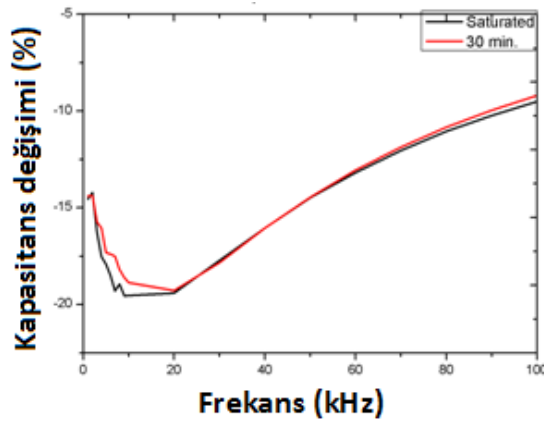
Şekil 3.18. Aşındırma süresi, kapasitans değişim yüzdeleri grafiği

3.5. Streptavidin bağlanma süresi deneyleri

Şekil 3.19 ve 3.20’de gözüktüğü gibi, 30 dakika bekleme yeterli olmaktadır. Yapılardan birine streptavidin damlatılarak 30 dakika beklenmiş ardından kapasitans değişim ölçümleri alınarak, yeni bir damlatma yapılarak 10 saat bekletildi, ardından tekrar kapasitans ölçümü alındı. 30 dk ile 10 saatlik bekleme sonucu alınan ölçüm değerlerinin hemen birbirini yakın olduğu, 100µg/ml konsantrasyonundaki streptavidin bağlanması için +4°C sıcaklıkta 30 dakika bekleme yeterli olduğu gözükmektedir.



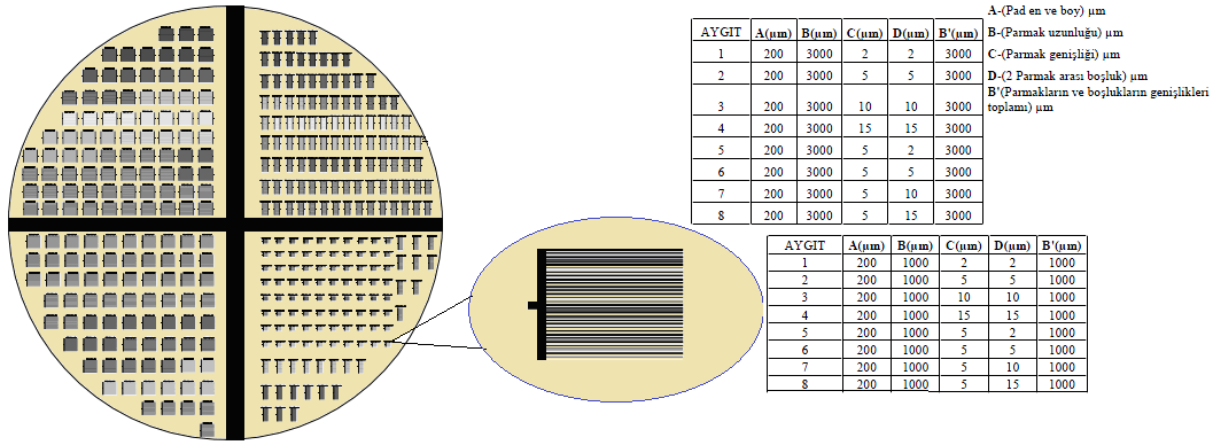
Şekil 3.19. 30 dk ve 600 dk. Streptavidin bekleme sonucu meydana gelen kapasitans değişimi grafikleri



Şekil 3.20. 30 dk. Ve 600 dk. Streptavidin bekletilmesi sonucu meydana gelen kapasitans değişimlerinin karşılaştırılması

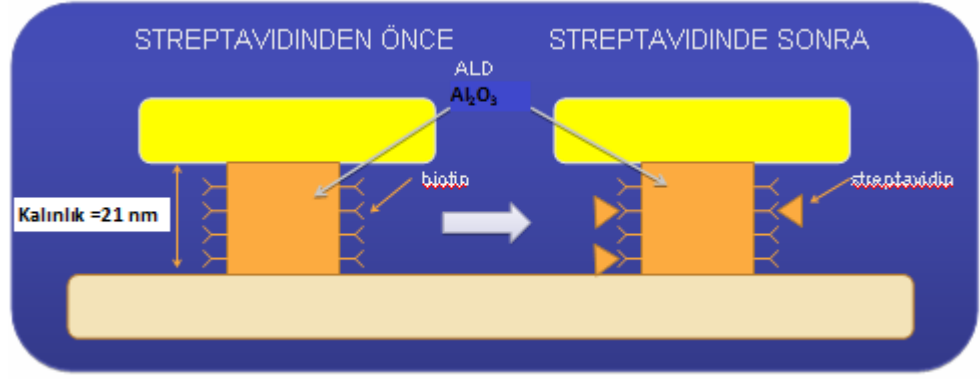
3.6. Farklı geometrilere sahip aygıtların algılama hassasiyetlerinin karşılaştırılması

Tez çalışmamızın bu kısmında, farklı geometriye sahip 16 değişik biyosensör tasarlanarak, yeni maske yazılımı gerçekleştirilmiştir. Bu maske yazılımında, daha önce kaldırma işlemi esnasında yaşanan bükülmelerin önüne geçmek amacıyla negatif kaldırma işlemi yapacak şekilde bir tasarımda bulunuldu (Şekil 3.21). Aynı konsantrasyonda streptavidin farklı geometrilere uygulanarak, hassasiyetlerinin mukayese edilmesini amaçlayan bu araştırma, maske tasarımı ve maskenin yazılmasının ardından sensör fabrikasyonu ile devam etmiştir.



Şekil 3.21. Negatif kaldırma işlemine uygun olarak tasarlanan maske ve biyosensör çeşitlerinin boyutları

Bu fabrikasyonda üretilen sensörlerin öncekilerden bir diğer farkı ise, dielektrik katman olarak yalnızca Al_2O_3 'ün kullanılması ve kalınlığının 21 nm olmasıdır (Şekil 3.22).



Şekil 3.22.Farklı geometrilere sahip biyosensörlerin (21 nm Al₂O₃ dielektrik) şekli

Farklı geometrilere sahip olan dört aygıtta 100µ/ml konsantrasyonunda streptavidin uygulanmıştır. Aygıtların kapasitans (C_p) değerlerinde %10 ile %16 arasında bir değişim görülmektedir. Aynı konsantrasyona sahip streptavidin solüsyonu uygulandığı için, kapasitans değişimleri arasında daha önceki deney bulgularında görüldüğü gibi düşük bir tolerans olması bekleniyordu ancak daha büyük bir fark ortaya çıktı. Bunun sebebi farklı geometrilerin algılama hassasiyetlerinin farklı olmasıdır.

Çizelge 3.6. Farklı geometrilere sahip biyosensörlerin ölçüm sonuçları

Aygıt	Par mak genişliği	Parmaklar arası boşluk	Biyotin sonrası	Streptavidin sonrası	% Değişim
1	10µm	20µm	68.7 nF	58 nF	15.6
2	50µm	50µm	17.8 nF	16.02 nF	10
3	2µm	8µm	81 nF	71.13 nF	12.2
4	5µm	50µm	16.7 nF	15.7 nF	15.8

4. SONUÇ

Biyosensör teknolojisi, değişik uygulama alanlarında disiplinler arası bir çalışma ile, ihtiyaçlar doğrultusunda gelişerek, çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Biyosensörlerin klasik tayin yöntemlerine nazaran çoğu zaman spesifik, güvenilir sonuçlar veren, yerinde erken teşhis amaçlı, hassas sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde seri olarak üretilebilmeleri ve bu türlerin çoğu zaman kullanırken özel deneyim gerektirmemeleri onları gelecek vaat eden biyo algılayıcı sistemler olarak ön planda tutmaktadır. Ancak, bir umut bulmak için yapılan tüm araştırmalara rağmen, kanser günümüz dünyasında hala ciddi bir ölüm sebebidir. Kanserinin insan vücudunda biyolojik algılamasının olduğu bildirilmiştir ve bunların önceden tespit edilmesinin (erken teşhis) başarılı müdahalelere katkısı vardır.

Yerinde bakım biyosensörleri bu amaç için umut vericidir. Yerinde bakım biyosensörleri düşük maliyetli ve basit bir platform ile hassasiyet ve güvenilirlik elde edebilirlerse, henüz net bir belirti vermeden kanserin erken aşamalarında olan insanların büyük bir kitlesine hitap edebilir. İmpedans spektroskopisi sağladığı avantajlarla etkin bir yöntemdir ve yerinde bakım biyosensör uygulamaları için kullanılabilir. Fakat ilgili solüsyon içinde iyonların olması nedeniyle elektriksel çift tabaka oluşmuştur ki bu uygulanan elektrik alanının korumasından dolayıdır. Geleneksel olarak, yüksek frekanslar (> 100 kHz) elektriksel çift tabakayı ortadan kaldırmak için tercih edilir. Bununla birlikte, bu bu frekanslarda parazitik ve indüktif etkilerinin yanı sıra, yüksek frekanslı sistemler, maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmez. Bu tez, düşük frekans ölçümleri için yol açan bir teknik göstermiştir. Bu teknik aynı zamanda ölçüm hacmini minimize etmeye yararlı bir nano aralık tabanlı biyosensör yapısı geliştirmiştir. DI su, iyonlarından arındırılmış olduğu için elektriksel çift katmanlı yapılarda serbest ölçüm almak için kullanılır. DI su, hedef molekül referans ölçüm arasındaki dielektrik sabit arasındaki farkını arttırmada faydalıdır. Ayrıca, bu ölçüm protokolü DI su ile durulama adımı içerir ki bu, ölçüm yapılan ortamda bağlı moleküllerin kaldırılarak seçicilik amacına hizmet eder. Bu tez çalışması, nano aralık tabanlı biyosensör, tasarım, fabrikasyon, yüzey fonksiyonlandırmalar, biyotininizasyon ve karakterizasyon aşamalarını

gerçekleştirerek göstermiştir. Streptavidin proteinlerinin etiketsiz algılama aralığı, 100 µg / ml, 10 µg / ml, 1 µg / ml, 100 ng / ml ve 10 ng / ml streptavidin konsantrasyonları için elde edildi. Böylece, bildiğimiz kadarıyla, ilk kez streptavidin protein tespiti nano aralık tabanlı impedimetrik biyosensör uygulaması bu tez çalışması ile yapılmıştır. Algılama aralığı optik olanlar gibi diğer sensör platformları ile karşılaştırılabilir değerlere sahiptir. Bu tez çalışmasında üretilen sensörler, gelecekte düşük maliyetli, etiketsiz, nano aralık tabanlı impedimetrik biyosensörler ile ticari optik biyosensör platformları değiştirilmesi için umut vericidir. Bu biyosensörler 10 mVrms'te çalışıp, düşük güç platformları sunarlar. Hedef proteinleri algulamada dielektriğe karşı duyarlılık dielektrik katsayısı birim değişikliği başına 132 pF dir. Bu uygulama hassasiyetin artırılması amacıyla tasarım geometrisi açısından farklı boyutlarda uyarlanabilir.

Streptavidin bağlanma deneyi sonuçlarına göre, 100µg/ml konsantrasyonundaki streptavidinin bağlanması için +4°C sıcaklıkta 30 dakika bekletmenin yeterli olduğu gözükmektedir. Bağlanma süresi konsantrasyonla ilişkili olabileceğinden, farklı konsantrasyonlarda streptavidin çözeltisi uygulanırken bu süreyi ayarlamak için konsantrasyon değeri dikkate alınmalıdır. Düşük konsantrasyonlarda bu sürenin artacağı öngörülmektedir. Ayrıca Farklı geometrilere sahip olan dört aygıtta 100µ/ml konsantrasyonunda streptavidin uygulanmıştır. Aygıtların kapasitans (C_p) değerlerinde %10 ile %16 arasında bir değişim görülmektedir. Aynı konsantrasyona sahip streptavidin solüsyonu uygulandığı için, kapasitans değişimleri arasında daha önceki deney bulgularında görüldüğü gibi düşük bir tolerans olması bekleniyordu ancak daha büyük bir fark ortaya çıktı. Bunun sebebi farklı geometrilerin algılama hassasiyetlerinin farklı olmasıdır.

Bu sensör platformunun aynı zamanda kimyasal veya gaz sensörleri olarak uygulanabilirlik adına potansiyel bulabileceğini söyleyebiliriz. Güvenilirlik boyutu kararlılık ve tekrarlanabilirlik ölçümleri ile test edilmiştir ve olumlu sonuçlar gözlenmiştir. Bu sensörler, dielektrik kalınlığı ve yatay aşınma uzunluğu gibi boyutları üzerine değişikliklere gidilerek daha da geliştirilebileceği gibi, farklı dielektrik malzemeler kullanılarak geliştirilebilir. Dielektrik katman yerine, elektrotlar üzerinde tanıma elementi yerleştirmek yerine, elektrotların yüzey fonksiyonlandırması teknikleri test edilebilir. Bu teknik, duyarlılık sonuçlarını artırır

ve daha düşük konsantrasyonları tespit edilebilir. Gelecekte yapılacak çalışmalar için belirli bir biyo işaretleyici olarak yeni bir hedef molekül üzerinde çalışılması yapılabilir. Farklı tanıma elemanına göre, sadece bu çalışmada yüzey fonksiyonlandırmalar prosedürü değiştirilerek, farklı biyosensörler geliştirilebilir. Ayrıca, mevcut platform mikro akışkan sistemi ve düşük maliyetli bir ticari kapasitans çip ile entegre edilebilir. Bu kombinasyon yerinde bakım erken kanser saptama amacıyla yeni ve faydalı sistemleri sunabilir.

Gelecekte erken teşhis yöntemleri bulunduğu zaman kanserin tedavisi mümkün olacaktır. Erken teşhis bu başarının en önemli bileşeni olacaktır. Bu yönüyle, yerinde bakım biyosensörleri erken teşhisin önemli bir parçası olacaktır. Biyosensör teknolojisi sayesinde gelecekte belki de kanseri yenmek öyle kolay olacak ki, şu anda diyabet hastalarının kullandığı, şeker ölçüm cihazları gibi rahat, güvenilir bir uygulama ile yerinde bakım erken teşhisi yapılacak ve bu kişinin hayatını kurtaracaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Ö.Hasançebi, Biyosensör hazırlamada enzim kaynağı olarak değerlendirilmek üzere bazı bitkisel dokuların incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Edirne 2008.
- [2] Daniels J.S., Pourmand N., “Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges,” *Electroanalysis*, vol. 19, no. 12, pp. 1239–1257, 2007.
- [3] Therriault D., “Biosensors: Filling the gap,” *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 7, pp. 393–394, 2007.
- [4] Clark, L.C., Lyons, C., Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 102, 29-45, 1962.
- [5] Updike, S.J., Hicks, G.P., The Enzyme Electrode. *Nature*, vol. 214, pp. 986-988, 1967.
- [6] Bloor, D. , Movaghar, B. , Conducting polymers. *IEEE Proceedings*, vol. 130, pp. 225-232, 1983.
- [7] Mousa S., Biosensors: the new wave in cancer diagnosis, *Nanotechnology, Science and Applications*, pp. 1-10, 2010.
- [8] Turner A.P.F., Biosensors--Sense and Sensitivity, *Science*, vol. 290, no. 5495, pp. 1315–1317, 2000.
- [9] Recently-Approved Devices - GlucoWatch G2 Biographer P990026/S0008. <http://www.fda.gov/medicaldevices/productsandmedicalprocedures/deviceapprovalsandclearances/recentlyapproveddevices/ucm083294.htm>. (Erişim tarihi: 07-06-2012).
- [10] Who Cancer, *WHO*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en> (Erişim tarihi: 07-06-2012).
- [11] Globocan 2008. <http://globocan.iarc.fr/>. (Erişim tarihi: 07-06-2012).
- [12] Leaf C., Why We’re Losing The War On Cancer (And How To Win It), *Fortune*, vol. 149, no. 84, pp. 76–82, 2004.
- [13] Soper S.A., Brown K., Ellington A., Frazier B., Garcia-Manero G., Gau V., Gutman S.I., Hayes D.F., Korte B., Landers J.L., Larson D., Ligler F., Majumdar A., Mascini M., Nolte D., Rosenzweig Z., Wang J., Wilson D. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 10, pp. 1932–1942, 2006.
- [14] Tothill I.E., Biosensors for cancer markers diagnosis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 55–62, 2009.

- [15] Coulet, P.R., What is a Biosensor?, Chapter 1; Biosensor principles and Applications, (Editörler: Blum, L.J., Coulet, P.R.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-6, 1991.
- [16] Anik Kırgöz, U., Timur S., Wang J., Telefoncu A., Xanhine oxidase modified glassy carbon paste electrode, *Electrochemistry Communications*, vol. 6, pp. 913-916, 2004.
- [17] Chambers J.P., Arulanandam B.P., Matta L.L., Weis A., Valdes J.J., Biosensor recognition elements, *Curr. Issues Mol. Biol.*, vol. 10, no. 1–2, pp. 1–12, 2008.
- [18] Lewenstam, A., Maj-Zurawska, M., Hulanicki, A., Application of ion-selective electrodes in clinical analysis, *Electroanalysis*, vol. 3, pp. 727-734, 1991.
- [19] Gooding J.J., Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends, *Analytica Chimica Acta* 559, pp. 137-151, 2006.
- [20] Chambers J., Delivery of therapeutics to the central nervous system , *Current Issues of Molecular Biology*, vol. 10, pp. 1-10, 2009.
- [21] Cooper M.A., Label-free screening of bio-molecular interactions, *Anal Bioanal Chem*, vol. 377, no. 5, pp. 834–842, Nov. 2003.
- [22] Fan X., White I.M., Shopova S.I., Zhu H., Suter J.D., Sun Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Analytica Chimica Acta*, vol. 620, no. 1–2, pp. 8–26, 2008.
- [23] Graham D.L., Ferreira H.A., Freitas P.P., Magnetoresistive-based biosensors and biochips, *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 9, pp. 455–462, 2004.
- [24] Tondra M., Porter M., Lipert R.J., Model for detection of immobilized superparamagnetic nanosphere assay labels using giant magnetoresistive sensors, *Journal of Vacuum Science Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, vol. 18, no. 4, pp. 1125 –1129, 2000.
- [25] Chen S.-H., Wu V.C.H., Chuang Y.C., Lin C.S., Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor, *Journal of Microbiological Methods*, vol. 73, no. 1, pp. 7–17, 2008.
- [26] An T., Kim K.S., Hahn S.K., Lim G., Real-time, step-wise, electrical detection of protein molecules using dielectrophoretically aligned SWNT-film FET aptasensors, *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2052-2056, 2010.
- [27] O. Hanoğlu, Nanogap based label-free impedimetric biosensors for point-of-care and early cancer detection. Yüksek lisans tezi, Bilkent Üniversitesi, Ankara, 2012.

- [28] Rife J.C., Miller M.M., Sheehan P.E., Tamanaha C.R., Tondra M., Whitman L.J., Design and performance of GMR sensors for the detection of magnetic microbeads in biosensors, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 107, no. 3, pp. 209–218, 2003.
- [29] Forrer P., Tamaskovic R., Jaussi R., Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of JNK, ERK, and p38 kinase activities, *Biol. Chem.*, vol. 379, no. 8–9, pp. 1101–1111, 1998.
- [30] Haab B.B., Methods and applications of antibody microarrays in cancer research, *Proteomics*, vol. 3, no. 11, pp. 2116–2122, 2003.
- [31] Thompson I.M., Donna K.P., Phyllis J.G., Catherine M.T., P.H., Lucia M.S., Howard L.P., Lori M.M., Leslie G.F., Scott M.L., Crawford E.D., John J.C., Charles A.C., Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter, *New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 14, pp. 1470–1470, 2004.
- [32] Määttänen L., Auvinen A., Stenman U.H., Tammela T., Rannikko S., Aro J., Juusela H., Hakama M., Three-year results of the finnish prostate cancer screening trial, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, no. 7, pp. 552–553, 2001.
- [33] Erdem, A., Chapter 19 Genosensor technology for electrochemical sensing of nucleic acids by using different transducers, *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 49: pp. 403-411, 2007.
- [34] ÇUBUKCU M., Nanokompozitler ve Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamaları yüksek lisans tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla, 2008
- [35] Cha, G.S., Meyerhoff M.E., Enzyme electrode-based differential potentiometric cell with enhanced substrate sensitivity, *Electroanalysis*, vol. 1, pp. 205-211, 1989.
- [36] A. Taşkiran, Karbon nanotüp (CNT) temelli karbon pasta elektrotların ksantin biyosensöründe transducer olarak kullanımı bitirme tezi, Muğla Üniversitesi, Muğla, 2007.
- [37] Mengi A., Biyokimya. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınevi. İstanbul, 186-204, 1998.
- [38] Fennema O.R., Food Chemistry, 4th edition, Dekker M (inc) New York Basel. Hong Kong, pp. 590-606, 1996.
- [39] Orgata K., Microbial synthesis of dethiobiyotin and biyotin, *Methods enzimol*, vol. 18A; pp. 390-394, 1970.
- [40] Moss J.L., The biyotin dependent enzymes, *Adv. Enzymol*, vol. 46; pp. 321-442, 1977.
- [41] McCormick D.B., Roth J.A., Colorimetrik determination of biyotin and analogs, *Methods Enzymol*, vol. 18; pp. 383-385, 1970.

- [42] Wilchek M., Bayer E.A., in *Avidin-Biotin Technology*, vol. 184, Academic Press, 1990.
- [43] González-García M.B., Fernández-Sánchez C., Costa-García A., Colloidal gold as an electrochemical label of streptavidin-biotin interaction, *Biosens Bioelectron*, vol. 15, no. 5–6, pp. 315–321, 2000.
- [44] Williams R.A., Blanch H.W., Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications, *Biosens. Bioelectron*, vol. 9, no. 2, pp. 159–167, 1994.
- [45] Im H., Huang X.-J., Gu B. , Choi Y.K., A dielectric-modulated field-effect transistor for biosensing, *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 7, pp. 430–434, 2007.
- [46] Weisenhorn A. L., Schmitt F.J., Knoll W. , Hansma P. K., Streptavidin binding observed with an atomic force microscope, *Ultramicroscopy*, vol. 42–44, pp. 1125–1132, 1992.
- [47] Biryol, İ., Analitik Kimya Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, no. 72, 1995.
- [48] Van T., Van N., Anh T., Toan T., Ngoc K., Hong D., Thanh H., Silicon nanowires prepared by thermal evaporation and their photoluminescence properties measured at low temperature. *Adv. Nat. Sci. : Nanosci. Nanotechnol.* Vol. 2, pp. 15-16, 2011.
- [49] Anonim, Thin Film Deposition Processes, Las Positas College, Vacuum Technology 60A & 60B, <http://ipc1.clpccd.cc.ca.us/lpc/tswain/chapt14.pdf> (Erişim tarihi: 21-06-2012), 171-212; 2002.
- [50] Kurt J.L. , E-gun, Thermal Evaporator Instructions, Updated 04-13-2007.
- [51] Şahin B., Ağan S., PECVD Tekniği ile Büyütülmüş İnce Filmlerde Oluşan Ge ve SiGe Nanokristallerin Geçirgen Elektron Mikroskobu (TEM) ,Raman ve Fotoışma Spektroskopisi Teknikleri ile İncelenmesi, *International Journal of Engineering Research and Development*, Vol. 2, No. 2, 2010.
- [52] Scotten W.J. , *Photolithography*. IC Knowledge LLC, 2008.
- [53] Rothschild, W. Horn M., Keast L.C., Kunz R., Liberman V., Palmateer C.S., Doran S.P., Forte A., Goodman R.B., Sedlacek J.H., Uttaro R.S., Corliss D., Grenvill A., Photolithography at 193 nm, *The Lincoln laboratory Journal*, vol. 10 , no. 1, 19-34, 1997.
- [54] Chen X., Guo Z., Yang G.M., Li J., Li M.Q., Liu J.H., Huang X.J., Electrical nanogap devices for biosensing, *Materials Today*, vol. 13, no. 11, pp. 28–41, 2010.
- [55] Nevill J.T., Di Carlo D., Liu P., Jeong K.H., Lee L.P., Detection of protein conformational changes with a nanogap biosensor, in *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 2005. Digest of Technical Papers*.

- TRANSDUCERS '05. The 13th International Conference on*, vol. 2, pp. 1668-1671, 2005.
- [56] Morgan H., Green N.G., *AC Electrokinetic: Colloids and Nanoparticles*, 1st ed. Research Studies Pr, 2002.
- [57] Charge Relaxation in Uniform Conductors,
http://web.mit.edu/6.013_book/www/chapter7/7.7.html. (Erişim tarihi 07-06-2012).
- [58] Liang X.G., Chou S.Y., Nanogap Detector Inside Nanofluidic Channel for Fast Real-Time Label-Free DNA Analysis, *Nano Lett.*, vol. 8, no. 5, pp. 1472–1476, 2008.
- [59] Finot E., Bourillot E., Meunier-Prest R., Lacroute Y., Legay G., Cherkaoui-Malki M., Latruffe N., Siri O., Braunstein P., Dereux A., Performance of interdigitated nanoelectrodes for electrochemical DNA biosensor, *Ultramicroscopy*, vol. 97, no. 1–4, pp. 441–449, 2003.
- [60] Van Gerwen P., Laureys W., Huyberechts G., De Baeck M., Baert K.J., Varlan A., Sansen W., Hermans L., Mertens R., Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors, in *Solid State Sensors and Actuators, 1997. TRANSDUCERS '97 Chicago., 1997 International Conference on*, vol. 2, pp. 907–910, 1997.
- [61] Liu B., Xiang J., Tian J.H., Zhong C., Mao B.W., Yang F.Z., Chen Z.B., Wu S.T., Tian Z.Q., Controllable nanogap fabrication on microchip by chronopotentiometry, *Electrochimica Acta*, vol. 50, no. 15, pp. 3041–3047, May 2005.
- [62] Fan Y., Chen X., Trigg A.D., Tung C., Kong J., Gao Z., Detection of MicroRNAs Using Target-Guided Formation of Conducting Polymer Nanowires in Nanogaps, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 17, pp. 5437–5443, 2007.
- [63] Schlecht U., Malavé A., Gronewold T.M.A., Tewes M., Löhndorf M., Detection of Rev peptides with impedance-sensors — Comparison of device-geometries, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no. 9–10, pp. 2337–2340, 2007.
- [64] Ionescu-Zanetti C., Nevill J.T., Di Carlo D., Jeong K.H., Lee L.P., Nanogap capacitors: Sensitivity to sample permittivity changes, *Journal of applied physics*, vol. 99, no. 2, 24305-24309 2006.
- [65] Spinke J., Liley M., Schmitt F.J., Guder H.J., Angermaier L., Knoll W., Molecular recognition at self-assembled monolayers: Optimization of surface functionalization, *The Journal of Chemical Physics*, vol. 99, no. 9, p. 7012-7019, 1993.
- [66] Shaporenko A., Adlkofer K., Johansson L.S.O., Tanaka M., Zharnikov M., Functionalization of GaAs surfaces with aromatic self-assembled

monolayers: A synchrotron-based spectroscopic study, *Langmuir*, vol. 19, no. 12, pp. 4992–4998, 2003.

- [67] Boozer C., Ladd J., Chen S., Yu Q., Homola J., Jiang S., DNA directed protein immobilization on mixed ssDNA/oligo(ethylene glycol) self-assembled monolayers for sensitive biosensors., *Analytical chemistry*, vol. 76, no. 23, pp. 6967–72, 2004.
- [68] Duschl C., Sévin-Landais A.F., Vogel H., Surface engineering: optimization of antigen presentation in self-assembled monolayers, *Biophysical journal*, vol. 70, no. 4, pp. 1985–95, 1996.
- [69] Zhang F., Srinivasan M.P., Self-assembled molecular films of aminosilanes and their immobilization capacities, *Langmuir*, vol. 20, no. 6, pp. 2309–2314, 2004.
- [70] Ulman A., Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem. Rev.*, vol. 96, no. 4, pp. 1533–1554, 1996.
- [71] Anonim, Dielectric constants of various materials, <http://www.clippercontrols.com/pages/Dielectric-Constant-Values.html>. (Erişim tarihi: 07-06-2012).
- [72] Lee L.P., Nanogap Biomolecular Junction, Agreement Number: F49620-03-1-0367, Department of Bioengineering University of California, Berkeley, 2004.
- [73] Star A., Gabriel J.C.P., Bradley K., Grüner G., Electronic Detection of Specific Protein Binding Using Nanotube FET Devices, *Nano Lett.*, vol. 3, no. 4, pp. 459–463, 2003.
- [74] Bruck R., Melnik E., Muellner P., Hainberger R., Lammerhofer M., Spin coated thin-film polymer waveguide Mach-Zehnder interferometer for label-free streptavidin detection, in *Information Photonics (IP), 2011 ICO International Conference on*, 2011, pp. 1–2.
- [75] Jang D.Y. , Kim Y.P. , Kim H.S., Park S.H.K. , Choi S.Y., Choi Y.K., Sublithographic vertical gold nanogap for label-free electrical detection of protein-ligand binding, *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, vol. 25, no. 2, pp. 443–447, 2007.
- [76] Cheng S.F., Chau L.K., Colloidal gold-modified optical fiber for chemical and biochemical sensing, *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 1, pp. 16–21, 2002.
- [77] Cui Y., Wei Q., Park H., Lieber C. M., Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species, *Science*, vol. 293, no. 5533, pp. 1289–1292, 2001.
- [78] De Simone D., Tenaglia E., Piazza P., Vaccaro A., Bollin M., Capetti G., Piacentini P., Canestrari P., Potential applications of negative tone

development in advanced lithography, *Microelectronic Engineering*, vol. 88, no. 8, pp. 1917–1922, 2011.

- [79] Snow E.S., Perkins F.K., Houser E.J., Badescu S.C., Reinecke T.L., Chemical detection with a single-walled carbon nanotube capacitor, *Science*, vol. 307, no. 5717, pp. 1942–1945, 2005.
- [80] Li J., Lu Y., Ye Q., Cinke M., Han J., Meyyappan M., Carbon nanotube sensors for gas and organic vapor detection, *Nano Lett.*, vol. 3, no. 7, pp. 929–933, 2003.
- [81] Daniels J.S., Pourmand N., Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges, *Electroanalysis*, vol. 19, no. 12, pp. 1239–1257, 2007.
- [82] Capacitance to Digital Converters A/D Converters Analog Devices. <http://www.analog.com/en/analog-to-digital-converters/capacitance-to-digital-converters/products/index.html>. (Erişim tarihi: 07-06-2012).