



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR
UYGULAMALARINA YÖNELİK 3 BOYUTLU
BASKI TEKNİĞİ (3D PRINTING) İLE ELEKTROT
HAZIRLANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Fatma Selen GÜNDEN

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

İzmir

2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR
UYGULAMALARINA YÖNELİK 3 BOYUTLU BASKI
TEKNİĞİ (3D PRINTING) İLE ELEKTROT
HAZIRLANMASI**

Fatma Selen GÜNDEN

Danışman: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyomedikal Teknolojiler Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamalarına Yönelik 3 Boyutlu Baskı Tekniği (3D Printing) ile Elektrot Hazırlanması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26/ 09/2022

Fatma Selen GÜNDEN

ÖZET**ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR UYGULAMALARINA
YÖNELİK 3 BOYUTLU BASKI TEKNİĞİ (3D PRINTING) İLE
ELEKTROT HAZIRLANMASI**

GÜNDEN, Fatma Selen

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

2022, 118 sayfa

Bu çalışmada 3 boyutlu baskı tekniği ile elektrokimyasal biyosensör uygulamalarında kullanılmak üzere üçlü elektrot sisteminin bir parçası olan çalışma elektrotları hazırlanmıştır. Tasarlanan elektrotlar önce 3 boyutlu katı modelleme programı ile çizilip daha sonra 3 boyutlu yazıcı ile karbon siyahı/polilaktik asit (CB/PLA) bazlı filament kullanılarak üretilmiştir. Tasarlanan bu elektrotların (3DcbE) ilk önce elektrokimyasal uygulamaları saptanmasının ardından elektrokimyasal biyosensörlere uygulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında ilk olarak, modellenen elektrotların dilimleyici bir program ile G-koda dönüştürülmesinin ardından kaynaşmış birikim modellemesi (FDM) yöntemi ile çalışan bir 3 boyutlu yazıcı ile üretilmişlerdir. Çalışma elektrodu kapasitelerinin araştırılması amacıyla 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ varlığında döngüsel (CV) ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) teknikler ile elektrokimyasal ölçümler alınmıştır.

Farklı kalınlıklardaki iletkenlik düzeyleri ve 3 boyutlu yazıcı baskı prosedürü sırasındaki üretim kolaylığı dikkate alınarak en uygun elektrot boyutu seçilmiştir. Boyutları belirlenen elektrotların iletkenlik düzeylerini iyileştirmek adına farklı yüzey aktivasyon işlemlerine (mekanik, kimyasal, elektrokimyasal)

tabi tutulmuşlardır. En uygun (kimyasal/elektrokimyasal) yüzey hazırlama tekniği saptanmasının ardından bu elektrotların iletkenlik düzeyinin iyileştirilmesi çalışmalarına devam edilmiş böylece biyosensör uygulamaları için optimizasyon işlemler tamamlanmıştır. Tüm bunların ardından elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde sensör yüzeyi olarak kullanıma başlanmıştır.

Buna yönelik yapılan ilk çalışmalarda balık sperminden elde edilmiş çift sarmal DNA (dsDNA) kullanılmış ve bu molekülün işaretsiz (label- free) olarak biyoelektronik tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi çalışmalarına devam edilmiştir. Bu amaçla, 3DcbE ile dsDNA'nın çözelti içinde, adsorbe yüzeyde ve kovalent bağlı yüzeylerde DPV ile ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda Guanin bazının elektrokimyasal sinyali (1.0V) esas alınmış ve en uygun yüzey bağlama tekniği optimize edilmiştir.

3DcbE yüzeyler ile dsDNA'nın elektrokimyasal olarak görüntülenmesinin ardından sensör yüzeylerinde kısa oligonükleotit dizileri kullanılarak hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve DPV ile görüntülenmiştir.

Hazırlanan çalışma elektrotları kullanılarak alınan ölçümler elektrokimyasal çalışmalarda sıklıkla tercih edilen tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar (PGE) ve Perde Baskılı Elektrotlar (SPE) ile elektrokimyasal yanıt, DNA bağlama kapasitesi, LOD, LOQ, maliyet gibi parametreler esas alınarak karşılaştırmalar yapılmıştır. 3 boyutlu baskı teknolojisinin yenilikçi yönü, farklı boyutlarda hazırlanabilmesi, düşük maliyet gibi özellikleri ile yeni nesil minyatürize edilebilir biyosensörlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Tez kapsamında tasarlanan 3DcbE elektrotlar ile hastalıkların teşhisinde son yıllarda ticari olarak geliştirilebilir, hasta başında analize uyumlu (Point of care – POC) tanı yöntem ve cihazlarının tasarımlarını mümkün kılacaktır.

Anahtar Kelimeler: 3B Baskı Teknolojisi, Elektrokimya, Biyosensör, Voltametri Teknikleri, Karbon Bazlı Filament.

ABSTRACT**PREPARATION OF ELECTRODE WITH 3D PRINTING
TECHNIQUE FOR ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR
APPLICATIONS**

GÜNDEN, Fatma Selen

MSc in Biomedical Technologies

Supervisor: Prof. Dr. Pinar KARA KADAYIFCILAR

2022,118 pages

In this study, working electrodes, which are a part of the triple electrode system, were prepared to be used in electrochemical biosensor applications with 3D printing technique. The designed electrodes were first drawn with a 3D solid modeling program and then produced with a 3D printer using carbon black/polylactic acid (CB/PLA) based filament. After the electrochemical applications of these designed electrodes (3DcbE) were determined first, application studies were carried out on electrochemical biosensors.

Within the scope of the study, firstly, after the modeled electrodes were converted to G-code with a slicer program, they were produced with a 3D printer working with the fused deposition modeling (FDM) method. In order to investigate the working electrode capacities, electrochemical measurements were taken with cyclic (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) techniques in the presence of 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$.

The most suitable electrode size was chosen considering the conductivity levels in different thicknesses and the ease of production during the 3D printer printing procedure. In order to improve the conductivity levels of the electrodes whose sizes were determined, they were subjected to different surface activation processes (mechanical, chemical, electrochemical). After the determination of the most suitable (chemical/electrochemical) surface preparation technique, studies to improve the conductivity level of these electrodes were continued, thus

optimization processes for biosensor applications were completed. After all, it started to be used as a sensor surface in electrochemical DNA biosensors.

In the first studies conducted for this purpose, double-stranded DNA (dsDNA) obtained from fish sperm was used and biosensor development studies for the label-free bioelectronic determination of this molecule were continued. For this purpose, measurements of 3DcbE and dsDNA in solution, on adsorbed surfaces and on covalently bonded surfaces with DPV were carried out. In these studies, the electrochemical signal (1.0V) of the guanine base was based and the most suitable surface bonding technique was optimized.

After electrochemical imaging of dsDNA with 3DcbE surfaces, hybridization was performed using short oligonucleotide sequences on the sensor surfaces and visualized with DPV.

Measurements taken using the prepared working electrodes were compared with disposable graphite pencil electrodes (PGE) and Screen Printed Electrodes (SPE), which are frequently preferred in electrochemical studies, on the basis of parameters such as electrochemical response, DNA binding capacity, LOD, LOQ, cost. The innovative aspect of 3D printing technology allows the development of new generation miniaturizable biosensors with its features such as being prepared in different sizes and low cost.

With the 3DcbE electrodes designed within the scope of the thesis, it will enable the designs of diagnostic methods and devices that can be developed commercially in recent years and are compatible with point of care (POC) analysis in the diagnosis of diseases.

Keywords: 3D Printing Technology, Electrochemistry, Biosensor, Voltammetry Techniques, Carbon Based Filaments

ÖNSÖZ

Çalışma süresince, 3 boyutlu baskı tekniği kullanılarak biyomoleküllerin tayinine yönelik elektrokimyasal biyosensör tasarımı için gerekli alandaki çalışma örnekleri doğrultusunda araştırmalar yaparak bu konu üzerinde çalıştım.

Bu çalışmalar doğrultusunda öğrendiğim biyosensör tasarımı, 3 boyutlu baskı teknolojisi çalışma prensibi, elektrokimyasal ve voltametrik teknikler, çeşitli çalışma elektrotları, yüzey aktivasyonları (mekanik, kimyasal, elektrokimyasal), iletken 3 boyutlu yazıcı filamentleri, çift sarmal DNA'nın biyosensör yüzeyine bağlanma metotları (çözelti içinde, adsorbe yüzeyde ve kovalent bağlı yüzeylerde) gibi bilgilerle çalışmam için gereken deneyleri gerçekleştirdim.

Çalışmamda tasarlanan 3 boyutlu baskı teknolojisi kullanılarak üretilen çalışma elektrodu ile çift sarmal DNA molekülünün tayinine yönelik geliştirilen elektrokimyasal biyosensör, diğer yöntemlere göre daha kolay, hızlı, düşük maliyet içeren bir tasarım olarak nitelendirilebilir. 3 boyutlu baskı tekniği kullanılarak tasarlanan elektrot (3DcbE) ile ilk olarak elektrodun yüzey alanı ve iletkenliği artırılarak sonrasında bir DNA biyosensörü geliştirilmiştir ve DNA hasarı kaynaklı hasta başı teşhis cihazlarının (POC) gelişimine katkıda bulunulmuştur.

Çalışmam süresince çalışmamın bu noktaya gelmesi için katkılarını hiçbir şekilde esirgemeyen saygı değer hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

26 / 09 / 22

Fatma Selen GÜNDEN



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	I
JÜRİ ONAY FORMU	III
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	V
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
ÖNSÖZ	XI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVIII
TABLolar DİZİNİ.....	XXIV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXV
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Elektrokimya.....	3
2.1.1 Elektriksel çift tabaka	3
2.1.2 Elektrokimyasal reaksiyonlarda kütle aktarımı	5
2.1.3 Faradayik akımlar ve Faradayik olmayan akımlar	6

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.1.4 Elektrokimyasal hücrenin bileşenleri	7
2.1.5 Elektrokimyasal yöntemler	11
2.2 Biyosensörler	18
2.2.1 Algılama (Biyo-tanım) bölümüne göre biyosensörler	21
2.2.2 Çevirici (Dönüştürücü) sisteme göre biyosensörler	27
2.2.3 Biyosensörlerin kullanım alanları	34
2.3 3 Boyutlu Baskı (3D Printing) Teknolojisi	35
2.3.1 3 Boyutlu Baskı (3D Printing) yöntemleri	35
2.3.2 3 Boyutlu Baskı (3D Printing) malzemeleri	39
2.3.3 3B baskılı elektrokimyasal biyosensör uygulamaları	45
2.3.4 3B baskılı elektrokimyasal biyosensörlerin performansını iyileştirmeye yönelik çalışmalar	52
2.4 Hasta Başı Teşhis Sistemleri (Point of Care System)	56
2.4.1 Kağıt tabanlı mikroakışkan sistemler	57
2.4.2 3B yazıcı teknolojisinin hasta başı teşhis sistemlerinde kullanımı	58
2.4.3 Hasta başı teşhis sistemlerinin çeşitleri	60
2.4.4 3B baskı teknoloji ile hasta başı teşhis cihazlarında elektrokimyasal metotlar ...	62

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	64
3.1 Kullanılan Gereçler.....	64
3.1.1 Kullanılan cihazlar ve programlar	64
3.1.2 Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	66
3.1.3 Kullanılan DNA dizileri	68
3.2 Kullanılan Yöntemler	69
3.2.1 Elektrotların sanal modellemesi ve 3B yazıcı ile baskı prosedürleri.....	70
3.2.2 Tasarlanan elektrotların elektrokimyasal performans tayini	72
3.3 3DcbE'ların Biyosensöre Uygulanması	76
3.3.1 DNA bağlanması ve tayinine yönelik yapılan çalışmalar.....	77
3.3.2 Hibridizasyon çalışmaları	80
3.3.3 3DcbE'ların stabilite çalışmaları	81
3.3.4 Elektrokimyasal ölçümler.....	81
3.3.5 3DcbE'ların taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelenmesi	82
3.3.6 3DcbE'lar ile EIS tekniği ile ölçüm.....	82
3.3.7 3DcbE'lar ile PGE ve SPE'ların kıyaslanması.....	83

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	84
4.1 Tasarlanan Elektrotların Elektrot Performanslarının Değerlendirilmesi	84
4.1.1 Mekanik aktivasyon prosedürünün elektrot performansı üzerindeki etkisine ait sonuçlar	85
4.1.2 Farklı kimyasal/elektrokimyasal aktivasyon prosedürlerinin elektrot performansı üzerindeki etkilerine ait sonuçlar	86
4.1.3 Uygun aktivasyon yöntemlerinin seçilmesi ve seçilen aktivasyon yöntemlerine ait elektrot performanslarının sonuçları	96
4.2 Tasarlanan Elektrotların DNA Biyosensörlerine Uygulanması	100
4.2.1 DNA bağlanması ve tespitine ait sonuçlar	100
4.2.2 Hibridizasyon çalışmalarına ait sonuçlar	108
4.2.3 3DcbE'lerin stabilite çalışmalarına ait sonuçlar	110
4.2.4 3DcbE'lerin taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelenmesi	111
4.2.5 3DcbE'ler EIS tekniği ile ölçüm sonucunda elde edilen bulguların incelenmesi	113
4.3 3DcbE'ler ile PGE ve SPE'lerin Kıyaslanmasına Ait Sonuçlar	114
5.GENEL SONUÇLAR	117

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ.....	119
TEŞEKKÜR	132
ÖZGEÇMİŞ	133



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Elektriksel çift tabakanın genel gösterimi	4
2.2 Elektriksel çift tabaka ve elektrot yüzeyinden uzaklığa göre potansiyel değişimi	4
2.3 Kütle aktarımı şematik gösterimi.....	6
2.4 Üçlü elektrot sistemi şematik gösterimi.....	8
2.5 Referans elektrotlar; (a) kalomel elektrot, (b) Ag/AgCl elektrot.....	10
2.6 Döngüsel voltametriye uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi.....	12
2.7 Dönüşümlü voltamogram	13
2.8 DPV uyarma sinyalleri; (a) zamana bağlı uygulanan pulslar, (b) elde edilen voltamogram.....	14
2.9 İmpedansın $V(t)$ ve $I(t)$ büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi ...	16
2.10 (a) Randles eşdeğer devresi, (b) Randles devresinden kaynaklanan Nyquist grafiği	17
2.11 Biyosensörün genel yapısı	19
2.12 Nükleotid yapısı ve nükleotidlerin bileşenleri	25
2.13 DNA antisarmal yapının yakınlaştırılmış görünümü	25
2.14 DNA denatürasyonu ve renatürasyonu	26
2.15 DNA ve RNA zincirleri	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.16 3 Boyutlu yazıcı	36
2.17 3B baskı için hammadde olarak kullanılan polimerlerin kimyasal yapıları	40
2.18 ABS'nin monomer birimleri.....	41
2.19 Fazlar	41
2.20 Polilaktik Asit.....	42
2.21 Polilaktik Asit sentezi.....	43
2.22 Point of Care test üretim aşaması	56
2.23 Yanal akış testi genel görünümü	58
2.24 Yanal akış testinin iç yapısı.....	58
3.1 Üçlü elektrot sistemi	65
3.2 Hazırlanan çalışma elektrodu ile üçlü elektrot sistemi.....	70
3.3 3B baskılı elektrot şekli ve boyutları	71
3.4 3DcbE'lerin baskı önizlemesi.....	72
3.5 Karbodimid kimyası ile karboksil gruplarına amino gruplarının kovalent bağlanması	79
4.1 Farklı konsantrasyon değerlerindeki NaOH çözeltilerinde aktivasyon uygulanan elektrotların CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin karşılaştırılmasına ait (a) histogram grafiği ve (b) voltamogram grafiği	86

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.2 1 M NaOH çözeltisinde 30 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği	87
4.3 DMF çözeltisinde 10 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği	88
4.4 HNO_3 çözeltisinde 60 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.....	89
4.5 H_2SO_4 çözeltisinde 60 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği	90
4.6 Sonikatörde aseton ile muamele edilen elektrotlar	90
4.7 Asetonda 10 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.....	91
4.8 0,1 M NaBH_4 çözeltisinde 30 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği	92
4.9 CV ile aktivasyonu yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.....	93
4.10 Pulsed ile aktivasyonu yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.11 ACB tamponunda aktivasyon yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği 95
- 4.12 Over Oxidation prosedürüyle aktivasyon yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği 96
- 4.13 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde, seçilen aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafiği 97
- 4.14 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde, seçilen aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin karşılaştırmalı döngüsel voltamogram grafiği 97
- 4.15 Artan konsantrasyon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltilerinde, (a) Over oxidation ile, (b) Puls ile, (c) 1 M NaOH ile aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafikleri ve R^2 değerleri 98
- 4.16 Artan konsantrasyon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltilerinde, (a) Over oxidation ile, (b) Pulsed ile, (c) 1 M NaOH ile aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin döngüsel voltamogram grafikleri.....99
- 4.17 3 farklı aktivasyon yöntemiyle aktive edilen elektrotların 50 ppm derişim değeriindeki dsDNA çözeltisi içerisinde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyaline ait akım değerlerinin histogram grafiği 101
- 4.18 Farklı elektrot serilerine ait 50 ppm derişimdeki dsDNA çözeltisinde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait (a) histogram grafiği ve (b) voltamogram grafiği 102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.19 Farklı elektrot serilerine ait 50 ppm derişimdeki dsDNA'nın adsorbe yüzeyde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait (a) histogram grafiğı, (b) voltamogram grafiğı 103

4.20 Farklı elektrot serilerine ait 50 ppm derişimdeki dsDNA elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanmasıyla elde edilen Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait (a) histogram grafiğı, (b) voltamogram grafiğı 104

4.21 Artan derişimlerdeki dsDNA çözeltilerinde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun (0 ppm) sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait (a) histogram grafiğı ve (b) voltamogram grafiğı 105

4.22 Artan derişimlerdeki dsDNA elektrot yüzeyine adsorbe edilerek Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun (0 ppm) sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait (a) histogram grafiğı ve (b) voltamogram grafiğı 106

4.23 Artan derişimlerdeki dsDNA elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanıp, Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun (0 ppm) sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait (a) histogram grafiğı ve (b) voltamogram grafiğı 107

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.24 Elektrot yüzeyinin prob dizi ile bağlanması (hibridizasyondan önce) ve prob ile sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyonundan DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin (a) histogram grafiği, (b) voltamogram grafiği 109
- 4.25 Elektrotların basıldıkları tarihten itibaren farklı zamanlarda 50 ppm dsDNA tayinine ait DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafiği 110
- 4.26 3DcbE yüzeylerinin SEM görüntüleri; (a) CB/PLA filament, (b) aktivasyonsuz, (c) NaBH₄ ile aktivasyonlu, (d) 1 M NaOH ile aktivasyonlu, (e) over oxidation ile aktivasyonlu, (f) pulsed ile aktivasyonlu, (g) DMF ile aktivasyonlu 112
- 4.27 EIS tekniği ile 3DcbE'ların aktivasyonlu ve aktivasyonsuz Nyquist diyagramları ve yapılan 50 ppm dsDNA tayininin incelenmesi; (a) pulsed aktivasyonlu yalın elektrot (3dCBe), (b) elektrot yüzeyine 50 ppm dsDNA adsorbe edilerek, (c) elektrot yüzeyine karbodimid kimyasıyla 50 ppm dsDNA kovalent olarak bağlanarak ve (d) aktivasyonsuz elektrot 113
- 4.28 EIS tekniği ile yapılan 50 ppm dsDNA tayininden elde edilen R_{ct} değerlerinin histogram grafikleri 114

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Algılayıcı ve dönüştürücü sistemlere göre biyosensörler	21
2.2 3B yazıcıda iletken filamentler kullanılarak FDM tekniği ile üretilen elektrokimyada kullanılan örnekler	48
3.1 Deneylerde kullanılan çözeltiler ve içerikleri	66
3.2 Deney aşamasında kullanılan dizilerin baz dizilimleri	68
4.1 Elektrotların kalınlık-iletkenlik performanslarının karşılaştırılması.....	84
4.2 Mekanik aktivasyon prosedürünün elektrot iletkenliği üzerindeki etkisi	85
4.3 3 farklı dsDNA tespit metoduyla gerçekleştirilen deney sonuçlarına ait validasyon parametrelerine ait değerler	108
4.4 Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçlarının karşılaştırılması.....	110
4.5 3DcbE'lar ile PGE ve SPE'ların validasyon parametrelerinin kıyaslanması	115
4.6 Elektrotlar ve maliyetleri	115

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
<i>3dCBe</i>	Tez kapsamında tasarlanan elektrotun kısa adı
<i>I</i>	Akım
\$	Dolar
€	Euro

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
3dCBe	Tez kapsamında tasarlanan elektrotun kısa adı
3D	3 boyutlu
ACB	Asetat tampon çözeltisi
ABS	Akrilonitril bütadien stiren
CV	Döngüsel voltametri
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMF	N,N-Dimetilformamid
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
dsDNA	Çift iplikli DNA
EDC	1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)karbodimid hidroklorid
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FDM	Full deposition modeling (kaynaşmış birikim modellemesi)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FDM	Full deposition modeling (kaynaşmış birikim modellemesi)
G	Guanin
G-kod	Gometrik kod
LOC	Çip üstü laboratuvar
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin sınırı
NHS	N-hidroksi süksinimit
PLA	Polilaktik asit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE	Tek kullanımlık grafit elektrot
POC	Hasta başı teşhis sistemi
POCT	Hasta başı teşhis testleri
Rct	Yük transfer direnci
RNA	Ribonükleik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

1. GİRİŞ

Biyosensörler uyarıları algılamayı sağlayan uyarıcı sistemler ile analiz sistemlerinin bir araya gelmesiyle oluşan ve biyo-tanırma sisteminin seçiciliği ile fiziksel sistemin tayin duyarlılığının birleştiği oldukça geniş bir spektruma sahip uygulamadır. Biyosensörlerde biyokomponent olarak çoğunlukla enzimler, doku kùltürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikorlar ve nükleik asitler kullanılırken ölçüm tekniği ise amperometrik, potensiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik veya optik olarak değişebilir.

Elektrokimyasal biyosensörler ise 1962 yılında Clark ve arkadaşları tarafından üretilen glikoz oksidaz sensörü ile ilk olarak tanımlanan, günümüzde bu alanda adından sıkça söz ettiren bir biyosensör çeşididir (Clark & Lyons, 1962). Kullanımın giderek yaygınlaşmasının sebepleri arasında maliyetsel uygunluk, daha basit üretim, kullanım kolaylığı, taşınabilirlik gibi nedenler yer almaktadır. Bunun yanı sıra biyomoleküllerin ölçümü, hastalık teşhisi başta olmak üzere birçok konuda büyük önem arz etmektedir. Biyomolekül seviyelerinde meydana gelen farklılıklar hastalığın ilk evrelerinde meydana geldiği için tespitleri erken tanıda göz ardı edilemez bir öneme sahip olup biyomoleküllerin ölçümü çok kolay değildir. Bu moleküllerin bulundukları karmaşık ortama göre düşük kalan konsantrasyonlarının algılanmasının başarılabilmesi hastalık teşhisi teknolojisinde önemli bir yere sahiptir. Elektrokimyasal teknikler bu konuda başarısıyla bilinmektedir ve farklı biyomoleküllerin algılanmasına yönelik farklı çeşitlerde elektrokimyasal biyosensörler bulunmaktadır (Abdalla & Patel, 2020).

Elektrokimyasal biyosensörlerin temelinde iletkenlik olup bu iletkenliği sağlamak üzere farklı alternatifler denenmektedir. Bu konuda devreye giren ve bir diğer sürekli gelişmekte olan teknoloji ise 3 boyutlu baskı teknolojisidir. Dijital ortamda hazırlanan tasarım planının farklı baskı malzemeleri kullanılarak fiziksel bir hale getirildiği teknoloji 3 Boyutlu baskı olarak adlandırılmaktadır.

3 Boyutlu Baskı teknolojisi de tıpkı elektrokimyasal biyosensörler gibi ekipman boyutu, malzeme maliyeti, tasarımda çeşitlilik, prototip oluşturma ve üretim hızı açısından diğer üretim yaklaşımlarına göre önemli avantajlara sahip

bir teknolojidir. Bu özellikleri ile karmaşık laboratuvar cihazlarına ihtiyaç duymadan istenilen tasarımlarda, boyutlarda uygun fiyatlı bir bütçe ile elektrokimyasal biyosensörler elde etmek için yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Katseli et al., 2019).

Günümüzde çip üstü laboratuvar (LOC) cihazlarının üzerine de tıbbi tanı testleri entegre edilip, taşınabilir özellikli el cihazlarının üretimi mümkündür. Bu alanda tasarımsal çeşitliliği, taşınabilir nitelikte üretime imkan vermesi, üretim hızı gibi önemli avantajlara sahip olan 3 boyutlu baskı teknolojisi öne çıkmaktadır. Entegre cihazlardan elde edilen verilerin işlenmesi ve kaydedilmesi için de fiziksel ölçüm yapan sistemler tıbbi cihazlara entegre edilmelidir. Klinik tanı testlerinde elektrokimyasal biyosensörler üretimlerindeki geniş imkanlar sayesinde hasta başı teşhis sistemlerine (POC) uyarlanabilmektedirler. Kısacası günümüzde yeni nesil cihaz ve biyoçiplerin geliştirilmesi için birbirinden farklı birçok alan bir araya gelerek, her geçen gün artan çalışmalara imza atmaktadırlar.

Tez çalışma kapsamında elektrokimyasal sistemlerde kullanılmak üzere üçlü elektrot sisteminin bir parçası olan çalışma elektrotu 3 boyutlu baskı tekniği kullanılarak üretilmiştir. Bu elektrotun elektrot vazifesi gördüğüne dair yapılan çalışmalar optimize edildikten sonra DNA algılamaya yönelik elektrokimyasal bir biyosensör geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen biyosensör ile DNA hasarının algılanmasına yönelik klinik tanıda kullanılmak üzere hasta başı teşhis cihazı (POC) üretimi amaçlanmaktadır.

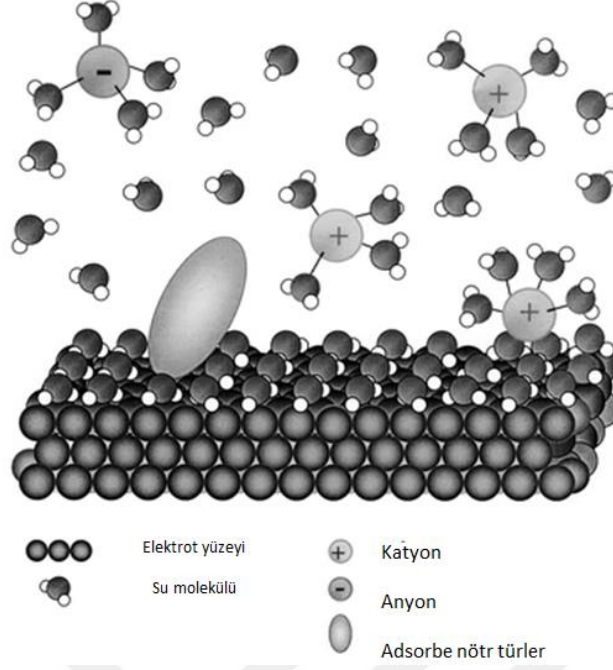
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Elektrokimya

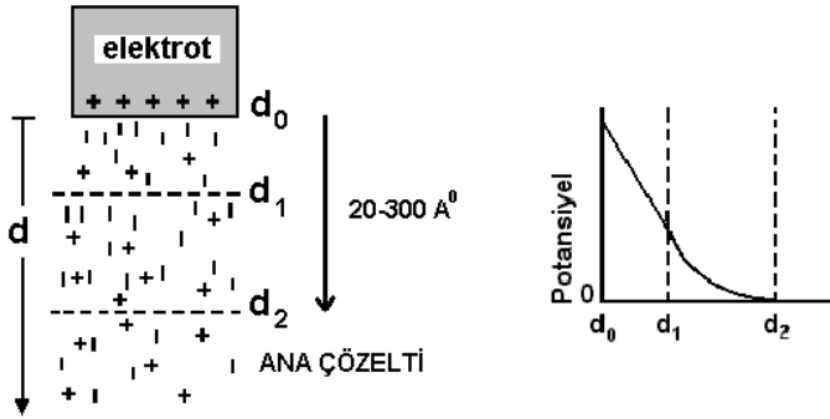
Bir maddede meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişikliğin kaynağı o maddenin elektrik enerjisi ile etkileşime girmesi ise bu değişiklikleri elektrokimya incelemektedir. Madde ve elektrik enerjisi arasında gerçekleşen tepkimeler elektrokimyasal tepkimeler olup, indirgenme ve yükseltgenme tepkimeleri (redoks tepkimeleri) olarak da bahsedilebilir. Yük ayrımı ve kimyasal olayları kapsayan bu alan da elektrot yüzeylerindeki heterojen veya çözelti içindeki homojen yük transferleri yük ayrımından kaynaklanmaktadır. Tepkimeler genellikle elektrokimyasal hücre adı verilen düzenek içerisindeki tampon çözeltide gerçekleşmektedir. Dışarıdan üçlü elektrot sistemine bağlı olan dönüştürücü de kimyasal dönüşümü gerçekleştirmektedir (Brett et al., 1993; Doğan Topal, 2011).

2.1.1 Elektriksel çift tabaka

Elektrolit çözeltisine daldırılan elektrot yüzeyi ile bu çözelti arasında arayüz bölgesi oluşmaktadır. Oluşan bu arayüz bölgesinin adı çift tabaka olarak geçer. Burada gerçekleşen reaksiyonlar ile bir potansiyel fark meydana gelmektedir. Reaksiyonların durumu ve elektrottaki potansiyel değişimi, arayüz bölgesindeki parçacıkların ve yüklerin dağılımına bağlı olup elektrokimya için oldukça önemlidir. Meydana gelen potansiyel fark nedeniyle elektrokimyasal tepkimeler, elektrokimyasal tepkimeler nedeniyle de elektrotların çözeltide daha çok iyon adsorbe etmesi gerçekleşir. Elektrot yüzeylerinde elektron daha çok olduğu için elektrot eğer sulu bir çözeltiye daldırılırsa buradaki polar su molekülleri elektrot yüzeyine tutunur. Sonuç olarak da zıt yüklerin dizildiği iki ince tabaka meydana gelir. Bu elektriksel çift tabaka adını alır. İç tabakada elektrot yüzeyine bağlanan iyonlar ve su molekülleri yer alırken, dış tabakada ise difüzyon ile yük denksizliklerinin giderilmesi sağlanır. Bu tabakaya ait ilk model 1879 senesinde Helmholtz'un geliştirdiği modeldir. Bu modeli matematiksel olarak da açıklayarak bir kondansatöre benzetmiştir (Kivrak, 2019; Schmickler, 1996).



Şekil 2.1. Elektriksel çift tabakanın genel gösterimi (Scholz, 2009).



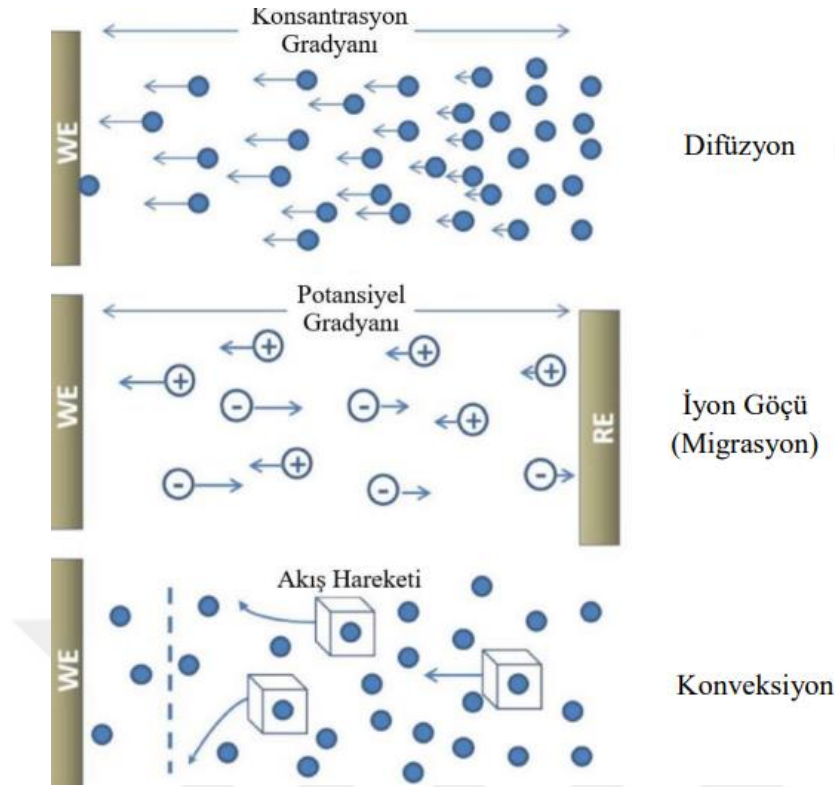
Şekil 2.2. Elektriksel çift tabaka ve elektrot yüzeyinden uzaklığa göre potansiyel değişimi (Doğan Topal, 2011).

Bahsedilen **iç tabaka**, iç Helmholtz düzlemi (IHP) adını alır ve Şekil 2.2’de gösterildiği üzere d_0 ’dan d_1 ’e gidildikçe elektrot yüzeyinden uzaklaşmaktadır. Bu yön boyunca ilerledikçe potansiyel doğru orantılı bir azalış gösterirken, d_1 - d_2 arası **difüze tabaka** yani **dış tabaka** adını alır. Bu yöndeki ilerleme sonucu potansiyel üstel azalış gösterir (Ekşi, 2011).

2.1.2 Elektrokimyasal reaksiyonlarda kütle aktarımı

Elektrolit çözeltilerindeki iyonlar hareket halindedir. Elektrolit sistemleri elektrolit olmayan sistemlerden ayırt etmemizi sağlar. Çözelti içerisindeki iyonların boyutlarına ve hızlarına bağlı olarak elektrot yüzeyine hareket ederler. Bu hareket üç çeşit yolla sağlanmaktadır (Brett et al., 1993; Rasouli et al., 2015).

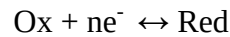
- **Elektriksel Göç (Migrasyon):** Elektrolitik göç adını da almaktadır ve elektrot kaynaklı elektrostatik alanın çekme/itme etkisi ile çözeltideki iyonlar hareket eder. Bu elektriksel alandaki iyonların yüküne ve büyüklüğüne bağlı olarak hızları değişiklik gösterir. Elektriksel göçten sadece yüklü türler etkilenir, bir elektrik alan etkisi gözlenir. Kütle aktarımında migrasyon oldukça etkindir (Kivrak, 2019; Schmickler, 1996).
- **Difüzyon:** Maddeler konsantrasyonu fazla olan ortamdan konsantrasyonu seyreltik ortama geçerse buna difüzyon denilir. Burada difüzyon, çözeltideki iyonların elektrot yüzeyine derişim farkı deneniyle ilerlemesi sonucu meydana gelen kütle aktarım çeşididir. Difüzyon tüm türler için gerçekleşir.
- **Karıştırma:** Kütle aktarımının mekanik karıştırma, akışkan akımında türbülans, titreşim gibi fiziksel faktörler ile gerçekleştirilmesidir. Konveksiyon adını da alır.



Şekil 2.3. Kütle aktarımı şematik gösterimi (Altay, 2020).

2.1.3 Faradayik akımlar ve Faradayik olmayan akımlar

Çözelti ile elektrot arasındaki yüzeyde akım iletimi olduğunda bir tür oksidasyona diğer tür ise indirgemeye uğrar. Bu duruma **redoks** adı verilir.



Bahsedilen denklemde O ve R türleri çözünürdürler. Oksidan ve Redükta olarak adlandırılan bu türler redoks çiftinin sırasıyla yükseltgenmiş ve indirgenmiş hallerini temsil ederler.

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_0}{C_R}$$

Yukarıda gösterilen Nernst Denkleminde göre elektrot potansiyeli, elektro aktif bir türün elektro aktif yüzeydeki derişimi tespit edilebilir olmakla beraber bu termodinamik yasalarla kontrol edilen sistemlerde geçerlidir. $E^0 = \text{Redoks}$

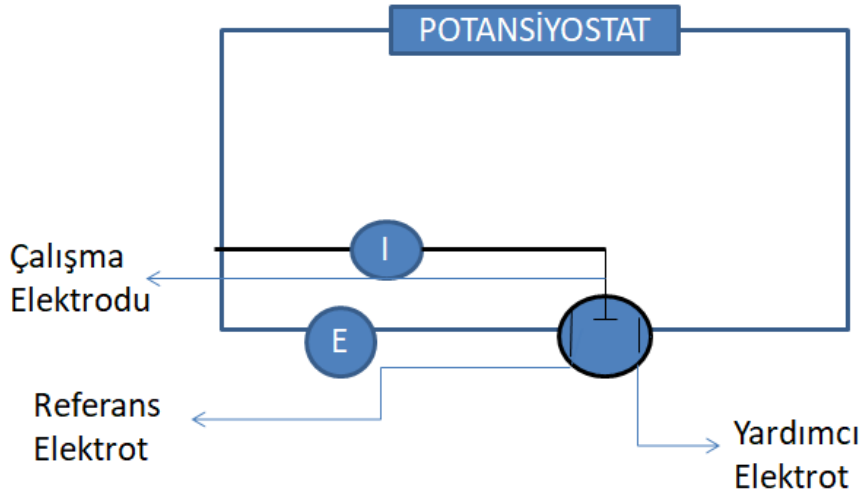
tepkimesi için standart potansiyeli, R =Gaz sabiti ($8.314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T = Sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$), n = Reaksiyondaki transfer edilen elektrot sayısı, F =Faraday sabiti ($96,487 \text{ coulombs mol}^{-1}$), C_0 ve C_R ise elektrot yüzeyindeki derişim ile ilgilidir.

Elektrot/çözelti ara yüzeyindeki **faradaik akım** (i_f), uygulanan potansiyelin yükseltgenme/indirgenme işlemiyle ortaya çıkan akım iletimidir.

Faradaik olmayan akım ise kapasitif akım (i_c) ismini de almaktadır. Elektrot/çözelti ara yüzeyindeki çift tabakanın yüklenmesiyle oluşan yükleme akımıdır. Yüklenme, elektrotun çözelti içine daldırılmasıyla yüzeyindeki kuvvetler nedeniyle çözelti iyonlarını ve moleküllerini çekmesidir. Yüklenme sonrasında bunların zıt iyonları da karşıya dizilir, başka bir tabaka meydana getirirler. Arayüzeyde bir gerilim farkı oluşması ve zıt yüklerin bu yüzeyin iki tarafında birikmesi sonucu elektriksel çift tabaka meydana gelir. Kapasitör gibi davranan bu tabaka sürekli bir akım oluşturur. Bu akımın oluşumu ortamdaki yükseltgenecek veya indirgenecek maddelerin varlığından bağımsızdır. Sistem kaynaklı bu akım kapasitif akım adını alır (Doğan Topal, 2011; Durusöz, 2019; Ekşi, 2011; Erdem et al., 2010).

2.1.4 Elektrokimyasal hücrenin bileşenleri

Elektrokimyasal reaksiyonlar, elektrokimyasal hücre içindeki bileşiklerin yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinden oluşan homojen olmayan kimyasal işlemlerin tümüdür. Bu işlemler laboratuvar elektrokimyasal hücrelerinde gerçekleşmekte olup elektrokimyasal hücre, bir dönüştürücü ile birlikte akım oluşturmak amacıyla elektron aktarımını gerçekleştirecek çözelti ve dış bağlantı için farklı çeşitlerdeki elektrotları içeren bir sistemdir. Kısacası elektrik akımı üretebilen sistemlerdir (Altay, 2020; Kıvrak, 2019).



Şekil 2.4. Üçlü elektrot sistemi şematik gösterimi.

Şekil 2.4’de gösterilen üçlü elektrot sistemi çeşitli elektrotlardan oluşmaktadır. Çalışma elektrotu, yardımcı elektrot ve referans elektrot olmak üzere 3 elektrot çeşidinden meydana geldiği için üçlü elektrot sistemi adını alan bu sistemin çalışma prensibi çalışma elektrotu ile referans elektrotu arasında potansiyel uygulanıp, çalışma elektrotu ile yardımcı (karşıt) elektrot arasında meydana gelen akımın ölçülmesi şeklindedir. Potansiyeli doğru bir şekilde kontrol edebilmek için çalışma ve referans elektrotları arasındaki direncin mümkün olduğunca küçük olması gerekir ve bunu genelde mümkün olmayan yakın konumlandırma sağlar. Bu durumlarda, içine referans elektrotun yerleştirildiği ve ince çekme noktası çalışma elektrotuna yakın yerleştirilmiş bir cam parçası olan bir Luggin kapiler kullanılır, yine de optimum konum kullanılan elektrokimyasal tekniğe bağlıdır (Brett et al., 1993). Elektrotların fonksiyonel gruplandırması şu şekildedir;

2.1.4.1 Çalışma (İndükatör) elektrotu (WE):

Çalışma elektrotları normalde katı bir forma sahip olup cıva elektrotu, oda sıcaklığındaki sıvı olan tek elektrottur (nadir istisnalar vardır). Voltametrik incelenen elektrottur. Elektrokimyasal reaksiyon yani indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları bu elektrotta gerçekleşir, potansiyeli analitin

konsantrasyon değişimi ile doğru orantılı değişir ve uygulanan dış potansiyelden de etkilenir.

Bu elektrot tipinin oldukça fazla çeşidi bulunmaktadır. Cıva, metal (inert) olarak altın veya platin, karbon bazlı olarak karbon pasta, camsı karbon, grafit, yarı iletkenler çalışma elektrotu üretiminde malzeme olarak kullanılabilirler. Elektrot geometrisi disk, küre, silindir, levha gibi farklı formlara da sahip olabilir. Üretiminde kullanılmak üzere malzeme çeşitliliği hala arttırılabilir bir alandır ve tasarımında da çeşitliliğe gidilebileceği için bu konuda araştırmalar devam etmektedir. Tasarımdaki çeşitlilikler ile bir biyosensör üretimi için en uygun hale getirilebilir. İdeal bir çalışma elektrotu tekrarlanabilir sonuç vermeli, yüksek sinyal/gürültü oranına sahip olmalı, maliyet, toksisite, elde edilebilirlik açısından da makul olmalıdır (Kara Kadayıfcılar, 2007).

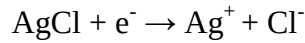
Karbon bazlı çalışma elektrotları; Perde Baskılı Karbon (Grafıt) Elektrotlar (SCPE), Camsı Karbon Elektrot (GCE), Karbon Pastası Elektrodu (CPE), Kalem ucu elektrodu (PGE) ve bu çalışma kapsamında kullanılan Bölüm 2.3.3’de bahsedilen Karbon siyahı bazlı 3B yazıcı filamenti kullanılarak üretilen çalışma elektrotları mevcuttur. Karbonun yüzey aktivitesi yüksektir, yüzeydeki farklı fonksiyonel gruplar nedeniyle birçok farklı madde karbon bazlı elektrotların yüzeyine tutunabilir. Maliyetsel uygunlukları ve geniş aralıklı potansiyel çalışma alanı sunmasından dolayı elektrokimyasal ölçümlerde karbon elektrotlar sıklıkla tercih edilmektedir (Kara Kadayıfcılar, 2007; Kerman et al., 2004).

Çalışma kapsamında kullanılan 3 boyutlu yazıcı baskılı karbon siyahı elektrotların tasarım olanaklarının geniş olması, yüzey özelliklerinin geliştirilebilirliği, maliyet olarak uygunluğu nedeniyle ve 3 boyutlu baskı teknolojisinin bu alanda yeni sayılabilecek bir konumda olması nedeniyle umut vadeden bir çalışma elektrotu seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır.

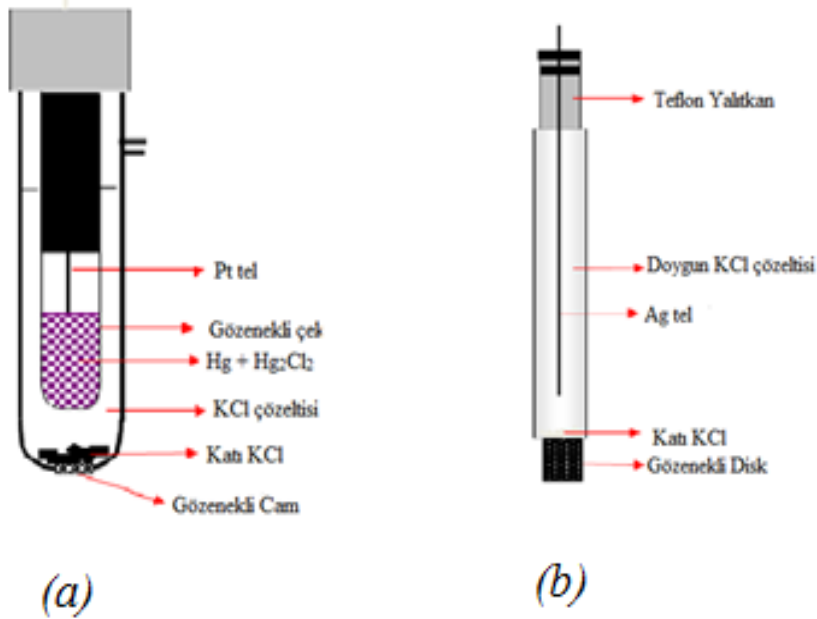
2.1.4.2 Referans elektrot (karşılaştırma elektrodu) (RE):

Sabit bir potansiyele sahip olan ve elektrot potansiyellerinin kıyaslanmasında bir standart sağlayan elektrot çeşididir. Referans elektrotun sabit

kalması önemlidir bu yüzden iyi bir referans elektrot zamanla ve sıcaklıkla, sistemdeki küçük farklılıklarla, yani küçük bir akımın geçişiyle değişmeyen bir potansiyele sahip olmak yani akıma maruz kaldıktan sonra orijinal potansiyeline dönmek zorundadır. Kalomel ($\text{Hg}/\text{Hg}_2/\text{Cl}_2$) ve Ag/AgCl (gümüş/gümüş klorür) referans elektrotlar mevcuttur. Elektrokimya alanındaki çalışmalarda en sık kullanılan Ag/AgCl referans elektrodu, gümüş telin elektrolitik yol ile AgCl (gümüş klorür) kaplanması sonrasında klorür iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilmektedir. Tepkimesi şu şekildedir;



Doygun KCl çözeltisi +0,22 V potansiyele (standart hidrojen elektroduna göre) sahiptir (Brett et al., 1993; Ekşi, 2011).



Şekil 2.5. Referans elektrotlar; (a) Kalomel Elektrot (b) Ag/AgCl Elektrot.

2.1.4.3 Yardımcı (Karşıt) elektrot:

Voltametrik deneylerde devrede oluşan akımı korumaya yarayan, inert malzemeden yapılan (platin tel), oluşan akımın çözeltiden çalışma elektroduna geçişini sağlayan elektrot çeşididir. Çalışma mekanizması elektrot yüzeyine

elektrolit üzerinden elektron aktarımını gerçekleştirmektedir. Elektrokimyasal reaksiyona katılmamaktadır (Durusöz, 2019; Henze and Thomas, 2001)

2.1.5 Elektrokimyasal yöntemler

Elektrokimya çeşitli elektroanalitik teknikler sunar. Bir elektrokimya çalışmasında iletken bir çalışma elektrotu, referans elektrot ve yardımcı elektrot yer alır. Elektrotlar destekleyici elektrot içeren çözeltiye daldırılır. Bir elektrokimyasal reaksiyon kullanılan elektrokimyasal yöntemle ilgili olarak ölçülebilir farklı veriler elde etmemizi sağlar. Ölçülebilir bir akım elde ettiysek kullanılan elektrokimyasal teknik amperometridir. Ölçülebilir ve/veya kontrol edilebilir bir potansiyel elde ettiysek bu durumda kullanılan elektrokimyasal teknikler potansiyometrik tekniklerdir. Son olarak, elektrot/çözelti arayüzündeki empedans ölçümlerini içeren elektrokimyasal teknikler, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemine dahildir (Suni, 2008).

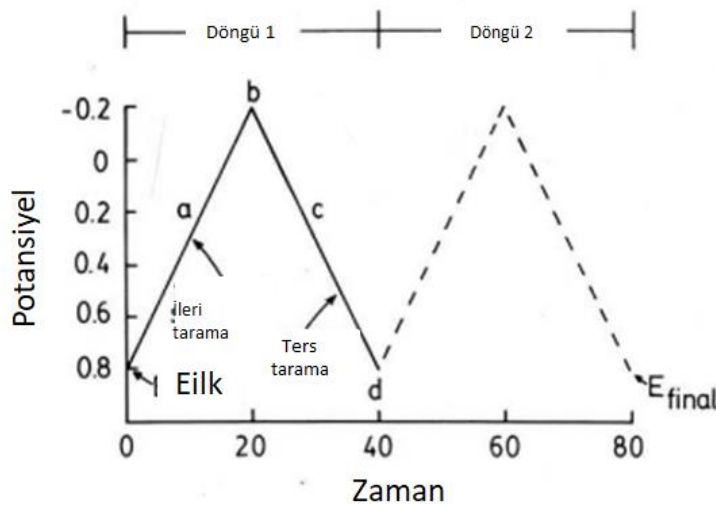
2.1.5.1 Voltametrik yöntemler

Bir maddenin elektrokimyasal davranışını izlemek üzere kullanılan çok yönlü bir tekniktir. Analit hakkında bilgi, çalışma elektroduna uygulanan belirli bir potansiyelin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesiyle elde edilir. Voltametri, amperometrik teknikler sınıfına girebilir çünkü elektrokimyasal reaksiyon sonucu üretilen akım potansiyel aralık değiştirilirken ölçülür. Uygulanan potansiyelin karşılığında çizilen akım grafiğine **voltamogram grafiği** denilir. Bu grafiğin yorumlanması ile hücrede gerçekleşen elektrokimyasal olaylar hakkında bilgi edinilir.

Voltametrik teknik kullanılırken değiştirilebilir potansiyellerde sinyaller elektrokimyasal hücreye uygulanır. Sinyaller sonucunda akım pikleri meydana gelir. Uygulanan potansiyeli değiştirmenin çok yolu olduğu için birçok voltametrik teknik vardır. Başlıca voltametrik teknikler; dönüşümlü (döngüsel) voltametri (CV), diferansiyel puls (darbe) voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (SWV) ve (LSV) lineer süpürme voltametrileridir. Bunların içinde CV ve LSV elektroaktif bir molekülün elektrokimyasal davranışını incelemek

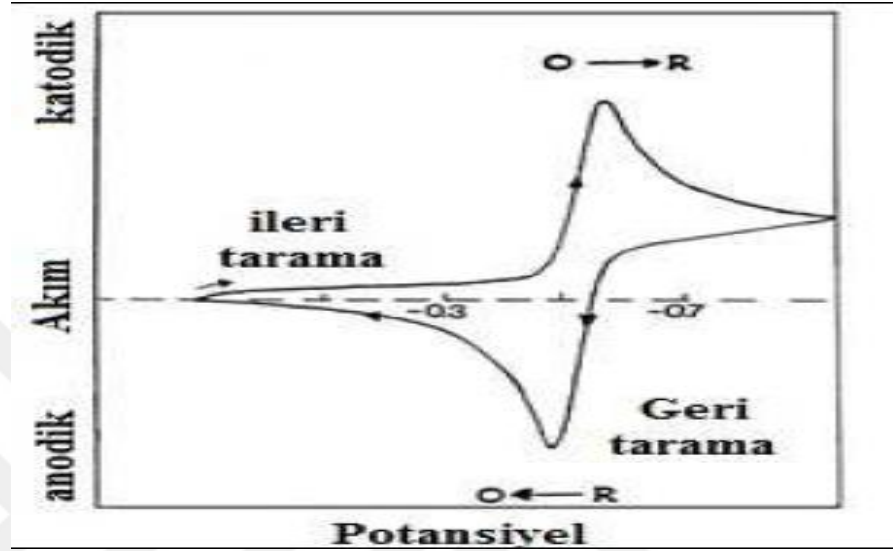
üzere yaygın olarak kullanılır. DPV ve SWV, darbeli voltametrik teknikler olarak sınıflandırılabilir. Elektrokimyasal davranışı incelerken elektroda uygulanan potansiyel aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektroduna, kullanılan çözeltiye ve elektrolitin türüne bağlı olarak değişir. Bahsedilen teknikler elektrokimyasal sensörlerin farklı uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Curulli, 2020; Kara Kadayıfçılar, 2007).

- **Döngüsel (Dönüşümlü) Voltametri (CV):** Elektroaktif türlerin incelemesinde çok yönlü elektroanalitik tekniktir ve elektrokimyasal çalışmalarda gerçekleştirilen ilk deneydir. Bunun nedeni elektrokimyasal tepkimelerin özelliği hakkında hızlı bilgi vermesidir. Çözeltiye daldırılan çalışma elektrotunun potansiyelini döngüye sokar ve çıkan akımı ölçer. Çalışma elektrotunun potansiyelini bir referans elektrot (Ag/AgCl veya kalomel elektrot gibi) ile kontrol eder. CV’de uyarma sinyali üçgen dalga formuna sahip doğrusal potansiyel taramasıdır. İleri yöndeki ilk potansiyel tarama belli bir potansiyelde sonlandırılarak, geri yönde tarama yapılması esasına dayanır. İkinci döngü kesik çizgilerle gösterilir. Başlangıç potansiyeli olarak indirgenme/yükseltgenme tepkimesinin başlamadığı bir potansiyel değer seçilmelidir. Sonrasında tarama redoks tepkimesinin gerçekleşme yönüne göre belirlenen bir hızda taranır (Kissinger and Heineman, 1963).



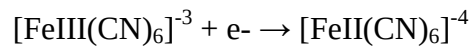
Şekil 2.6. Döngüsel voltametriye uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi (Kissinger and Heineman, 1963).

Potansiyel tarama sırasında çalışma elektrotundaki akımın ölçülmesiyle döngüsel voltamogram elde edilir. Akım, potansiyel uyarma sinyaline yanıt sinyalidir. Voltamogram, akımın (dikey eksen) potansiyele (yatay eksen) karşı bir gösterimidir. Voltamogram örneği Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



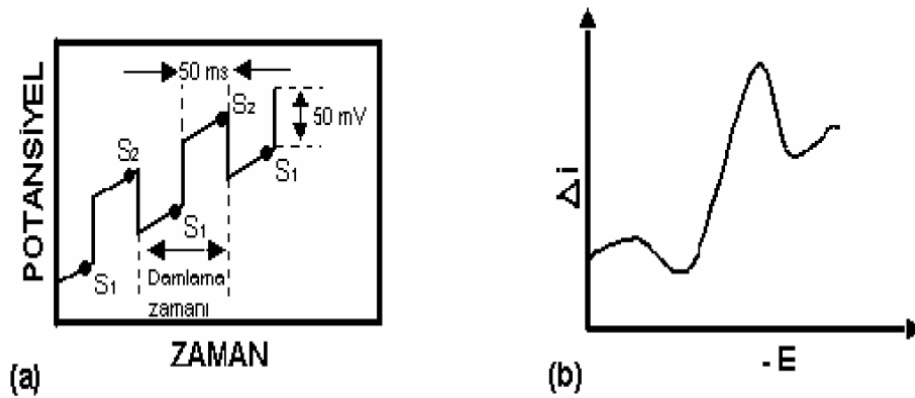
Şekil 2.7 Dönüşümlü voltamogram (Ekşi, 2011).

Tersinir bir redoks tepkimesinde ($Ox + ne^- \leftrightarrow Red$) ilk başta sadece O'ın yükseltgenmiş hali vardır. Uygulanan ilk potansiyel negatif değere geldiğinde katodik akım pik oluşuncaya kadar artar ve elektrota yakın olan Ox indirgenmeye başlar. İndirgenmenin gerçekleştiği potansiyel aralıktan sonra ise tarama yönü terse döner ve bu sefer geri tarama başlar. Ters taramada R molekülleri tekrar O moleküllerine yükseltgenir ve anodik akım meydana gelir (Ekşi, 2011; Kivrak, 2019). Bu voltamogramda ikinci pik olarak karşımıza çıkar. Elektrokimyasal tepkimelerde sıklıkla kullanılan $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (ferri / ferrosiyanit) çözeltisinin redoks tepkimesi ise şu şekildedir;



- **Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV; Differential Pulse Voltammetry):** Barker ve Jenkin tarafından 1952 yılında önerilen voltametrik bir yöntemdir. Tayin sınırının 10^{-7} - 10^{-8} M'a kadar

düşürüldüğü bu yöntem oldukça duyarlıdır. Organik/Anorganik madde tespiti başta olmak üzere birçok farklı elektroaktif türün tespitinde yer alır. Çalışma mekanizması çalışma elektroduna doğrusal potansiyel artışı gösteren sabit genliğe sahip pulslar uygulanması sonucunda ve uygulanmadan önce akımın ölçülmesi şeklindedir. Akım iki kez ölçülmüş olur ve bu akımın ölçümü pulsun bitmesine yakın bir bölgede olmalıdır. ΔI_{puls} bu iki akım arasındaki farkı temsil etmekte olup diferansiyel puls voltamogram grafiğı uygulanan potansiyele karşı oluşan akım farkı ile elde edilir. Elde edilen eğri pik şeklindedir ve pik yüksekliğı konsantrasyon ile doğru orantılıdır. Şekil 2.8'de diferansiyel puls voltametrisi uyarma sinyali ile voltamogramı gösterilmiştir (Eroglu, 2019).



Şekil 2.8. DPV uyarma sinyalleri; (a) zamana bağı uygulanan pulslar, (b) elde edilen voltamogram.

Duyarlılığı yüksek bir teknik olmasının nedeni faradayik akımın yüksek, faradayik olmayan yükleme akımının ise düşük değerde olması ve sinyal/gürültü oranının büyük olmasından kaynaklıdır. Düşük bir potansiyel farkta bile yükseltgenen/indirgenen maddelerin pikleri ayırt edilebilirdir (Kara Kadayıfçılar, 2007).

- **Kare Dalga Voltametrisi (SWV; Square Wave Voltammetry):** Oldukça hızlı ve duyarlı bir yöntem olan kare dalga voltametrisi ölçümleri ortalama 10 m/s'de gerçekleştirmekte olup tayin sınırı da 10^{-7} -

10^{-8} M aralığındadır. İleri tarama sırasında ileri puls katodik akım (i_1), geri tarama sırasında da geri puls anodik akım (i_2) oluşur. Bu iki nokta arasındaki fark alınarak akım bulunur ($i=i_2-i_1$). Aslında indirgenme ve yükseltgenmeye ait akım farkları alınarak akım saptanmış olur (Kara Kadayıfcılar, 2007; Osteryoung, 1993).

2.1.5.2 İmpedimetrik yöntemler

İmpedimetrik yöntemler; elektrokimyasal sistemlerde elektrolit ile elektrot arasındaki ara yüzeylerde meydana gelen değişiklikleri ve çalışma elektrodunun biyolojik bir elemanla kaplanması ile hedef moleküllerle etkileşim olduğu durumda kapasitansı yani ara yüzeylerdeki belirli bir potansiyel altında taşıyabileceği maksimum yük miktarını belirlemekte yardımcı olur. Bu değişimler Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi yöntemi ile incelenir.

- **Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS):** Elektrokimyasal empedans spektroskopisi elektrokimyasal sistemlerin incelenmesinde uzun zamandır kullanılmakta olup devredeki toplam direnç empedans adını alır. Empedans, bir devreye alternatif akım potansiyeli uygulanması sonucunda devrenin bu akıma gösterdiği direncin değeridir. Elektrokimyasal empedans ölçümü için sinüzoidal alternatif akım (AC) voltaj probu uygulanıp akım yanıtı belirlenir. Sistemin doğrusal bir yanıt vermesi ve basit eşdeğer bir devre analizi sağlaması için AC prob voltajı küçük olmalıdır. Elektrot ile elektrolit arasında meydana gelen ara yüzdeki kimyasal tepkimelerin elektriksel direnç değişimlerini inceleyen bu yöntem de hücrede, elektrot yüzeyindeki elektrot kinetiği, redoks reaksiyonları, difüzyon olayları ve moleküler etkileşimler, bir AC devresindeki elektronların akışını engelleyen bileşenlerdir.

Diğer elektrokimyasal tekniklerden farklı olarak EIS ara yüzey analizlerinde kullanılır ve bunun nedeni dakikadan daha az sürelerle (minimum saniyelere) ulaşan zaman sabitleriyle bağlantılı olarak analizleri yapabilen bir metot olmasıdır. Aynı zamanda çok farklı zaman sabitlerine sahip fizikokimyasal süreçleri, yüksek frekansta örnekleme

elektron transferini ve düşük frekansta kütle transferini karakterize edebilmeleri bakımından oldukça güçlü bir yöntemdir.

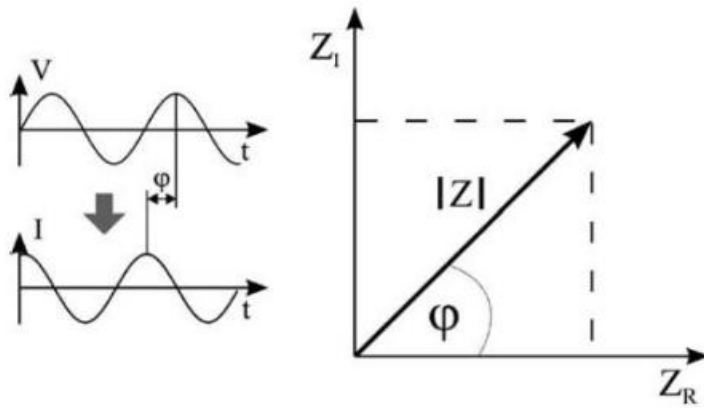
Empedans genellikle biri reel diğeri sanal iki kısımdan oluşan karmaşık bir sayı olarak ifade edilir; burada faz içi akım yanıtının belirlediği ohmik direnç gerçek, bileşen ve faz dışı akım yanıtının belirlediği kapasitif reaktans ise hayali bileşendir. Elektrokimyasal empedans verileri Nyquist ve Bode grafikleri ile değerlendirilir (Prodromidis, 2010; Suni, 2008).

$$Z = R + jX$$

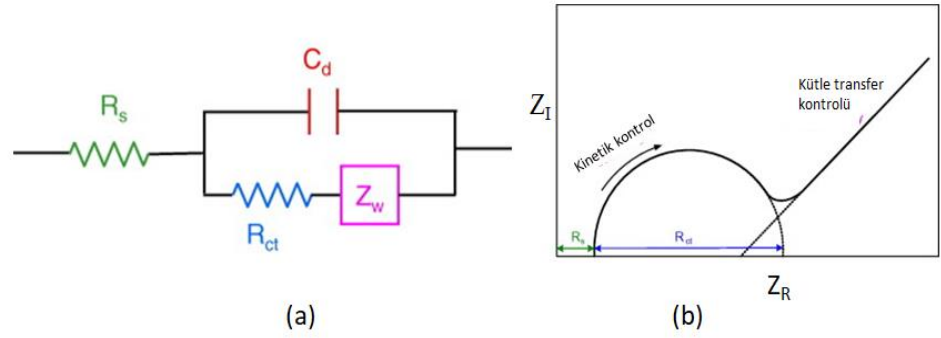
İmpedans, yukarıdaki denklem ile ifade edilmektedir. R; reel kısımdır, ohmik direnç değeridir. X; eşdeğeri sanal kısma yazılır ve gerçek zamanla değişen kondansatör ve endüktansların eşdeğeridir (Durusöz, 2019).

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi ft)}{I_0 \sin(2\pi ft) + \theta}$$

İmpedans yukarıdaki denklemde de gösterildiği gibi potansiyel-zaman fonksiyonunun (V_t), akım- zaman fonksiyonuna (I_t) bölünmesiyle elde edilir. V_0 ve I_0 maksimum değerde iken f ; frekans, t ; zaman, θ ise faz kaymasını gösterir (Kivrak, 2019).



Şekil 2.9. İmpedansın $V(t)$ ve $I(t)$ büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi (Kivrak, 2019).



Şekil 2.10. (a) Randles eşdeğer devresi, (b) Randles devresinden kaynaklanan Nyquist grafiği (Suni, 2008).

Basit elektrokimyasal sistemlerin empedans sonuçları yorumlanırken Randles devresinden yararlanılır. Şekil 2.10 (a) kısmından gösterilen Randles devresinde R_s , elektrotlar arasındaki çözelti fazı direncidir genellikle diğer bileşenlerden daha küçüktür. Esas olarak elektrolit direncinden kaynaklanır. R_{ct} , redoks bileşiğinin elektron transferi yoluyla elektrot yüzeyiyle etkileşime girme yeteneğini açıklayan yük transfer direncidir. C_d , elektrot ve çözelti içindeki yüklü iyonlar arasında oluşan çift katmanlı kapasitandır. Z_w , Warburg impedansı, kütle transfer sınırlamalarından kaynaklanır. Warburg impedansının hem gerçek hem de hayali bir bileşene sahiptir ve frekansa bağımlıdır (Muñoz et al., 2017).

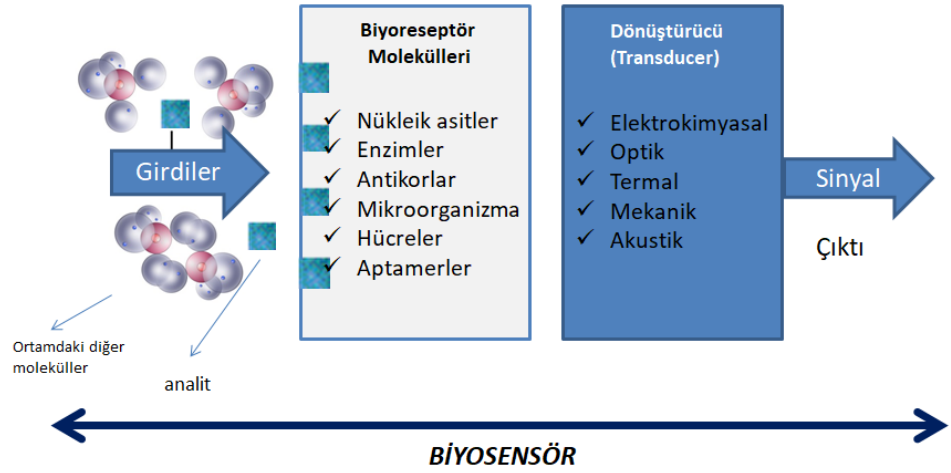
Randles eşdeğer devresinin görsel bilgi sağlayan grafiği Nyquist grafiği adını alır. Şekil 2.10 (b)'de gösterilen Nyquist eğrisi belirli bir frekans aralığındaki Z_R ve Z_I arasındaki ilişkiyi gösterir. Bir tam daire veya daha fazla yarım dairelerden ve hayali empedans eksenine paralel düz bir çizgiden oluşmaktadır. Çizginin kesişimi, çözüm direncinin bir tahminini verirken, kapasitans denklem ile hesaplanabilir. Bir Nyquist eğrisinde her yarım dairenin çapının vektörü impedans olarak ele alınır ve yarım dairenin sonundaki bahsedilen çizgi 45°'lik açı ile oluşur. Oluşan bu çizgi Warburg impedansını temsil eder (Prodromidis, 2010).

Özetle, elektrokimyasal empedans spektroskopisi, elektrokimyasal sistemlerin incelenmesinde özellikle de elektrot ile elektrolit ara yüzeylerde oluşan kimyasal tepkimelerin direnç değişimlerini ve elektrolit çözeltisindeki arayüz değişimlerinin karakterizasyon özelliklerinin incelenmesinde etkili bir yöntemdir. Elektrot yüzeyine bağlanan molekülün zarara uğramadan karakterizasyonunu sağlar (Cantopcu, 2014).

2.2 Biyosensörler

Biyosensör terimi 1977 senesinde Cammann tarafından bulunup, IUPAC tarafından tanıtılan, tarımdan gıdaya, elektronikten mekaniğe, klinik teşhisten kirleticilerin biyo-izlenmesine kadar analiz gerektiren birçok alanda adından sıkça söz ettiren, bir biyo-tanım elemanı ile dönüştürücüden (transdüser) oluşan ve etken maddelerin tespitinde kullanılan, nicel/yarı nicel analitik bilgi sağlayan cihazlardır (Li Yanbin, 2006). 1950’li yıllarda da ise ilk gerçek biyosensör Leland C. Clark tarafından icat edilmiştir. Bu ilk biyosensör oksijen konsantrasyonunu tespit etmeyi sağlamaktaydı (Thakur and Ragavan, 2013). Biyosensörlerin çalışma mekanizması; analiz edilmek istenen maddenin biyosensörün yapısındaki biyo-tanım elemanı ile etkileşime girmesi sonucu oluşan biyokimyasal yanıtın yine biyosensörün yapısında bulunan dönüştürücü tarafından bir sayısal değer haline getirilmesi ve bu değer okunması şeklindedir (Singh et al., 2020; Vigneshvar et al., 2016).

Bazı biyosensörlerde etiketleme molekülleri de kullanılır. Etiketleme molekülleri ile biyolojik sinyallerin güçlendirilmesi sağlanır. Etiketleme moleküllerine örnek olarak enzimler, metal partiküller, nanopartiküller verilebilir (Li Yanbin, 2006). Biyosensörün yapısı Şekil 2.11’de gösterilmektedir.



Şekil 2.11. Biyosensörün genel yapısı.

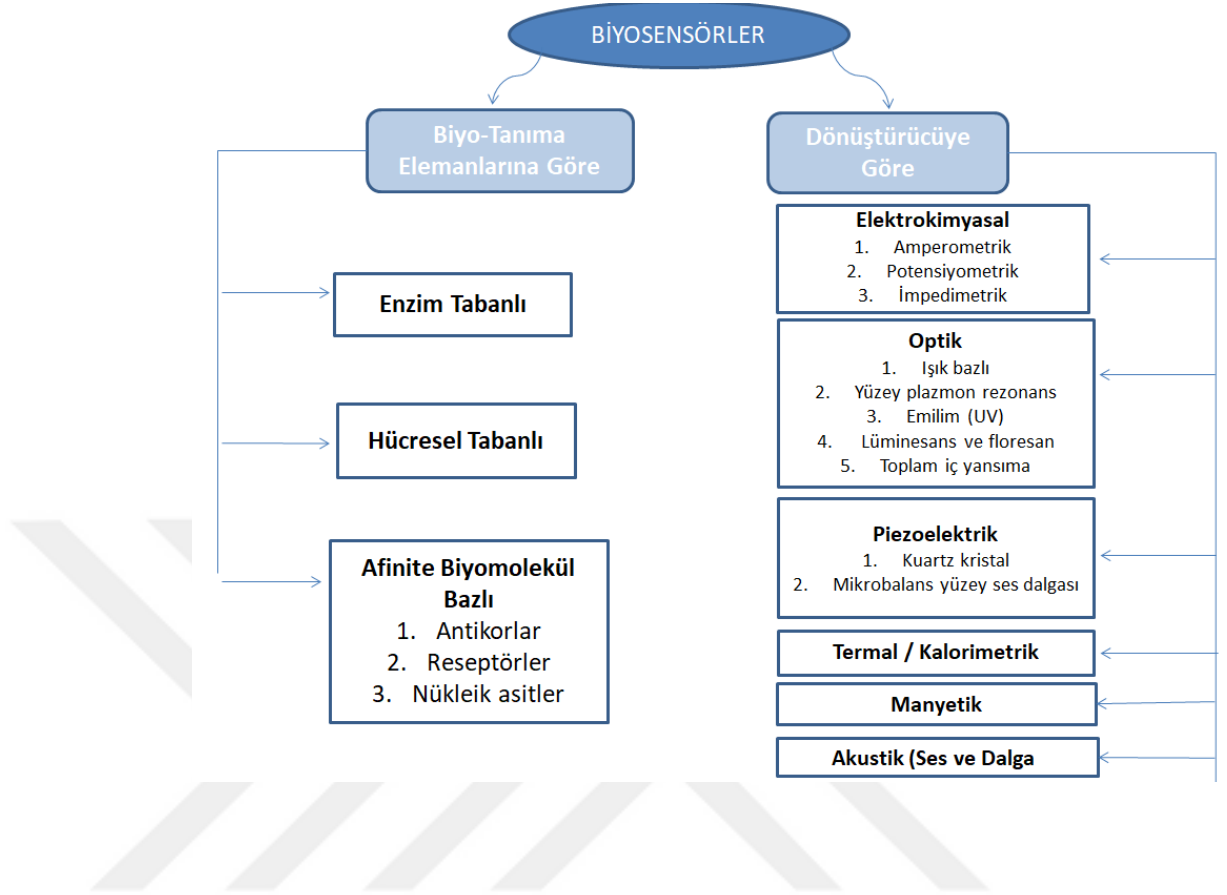
İdeal bir biyosensörde aranan önemli kriterler ise şu şekildedir (Bhalla et al., 2016; Thakur and Ragavan, 2013);

- **Seçicilik:** Bir biyotanıma elemanının birden fazla sayıda ve çeşitte maddenin bulunduğu ortamda hedef analiti tespit edebilme yeteneğine denilmektedir. Biyotanıma elemanı sadece analite özgünlük gösterir, diğer reaktiflerle etkileşime girmez. Biyosensörün en temel çalışma prensibi buna dayandığı için oldukça önemli bir kriter olup en üst düzeyde olmalıdır.
- **Duyarlılık:** Biyosensörün tespit edebileceği en düşük analit miktarı yani biyosensörün hassasiyetidir. Biyosensörler oldukça düşük konsantrasyonlarda çalışabilecek cihazlar oldukları için tespit limitlerinin (LOD) tanımlanması önemlidir.
- **Ölçüm Aralığı:** Geniş bir ölçüm aralığına sahip olması biyosensör için bir avantajdır. Ölçülen analitin konsantrasyon aralığı olarak tanımlanabilir.
- **Ölçüm Süresi/Cevap Zamanı:** Analitin gerçek zamanlı olarak izlenmesi, biyosensörün yanıt süresinin hızlı olmasına bağlı olduğu için ölçüm süresi önemli bir parametredir.
- **Tekrarlanabilirlik:** Aynı örnek analit ile çalışıldığında elde edilen yanıtın benzerlik oranının yüksek olması şeklinde tanımlanabilir.

- **Doğrusallık:** Biyosensörler geniş bir çalışma aralığında analit tespiti gerçekleştirdiği için çözünürlükleri de önemli olup biyosensörün doğrusallığı çözünürlük ve analitin konsantrasyon aralığı ile ilişkilidir. Biyosensör yanıtının konsantrasyonla doğrusal olarak değiştiği analit konsantrasyonlarının aralığı bize doğrusal aralığı vermektedir. Yani biyosensörün yanıt aralığı analitin konsantrasyon aralığını da içinde bulundurmalıdır.
- **Kullanım Ömrü:** Biyosensörün çalışma performansında bozulma meydana gelene kadar kullanılabilirliğinin süresidir. Uzun ömürlü biyosensörlerin üretimi bir avantaj olacaktır.
- **Kararlılık:** Bir biyosensör içinde bulunduğu ortamdaki bozulmalardan etkilenebilir bu da beraberinde hatayı getirir. Hatalar biyosensörün kesinliğini ve doğruluğunu etkilemektedir. Biyosensörün bu bozulmalara karşı gösterdiği duyarlılık derecesi tutarlılık olarak adlandırılır. Sürekli takip edilmesi gereken uygulamalarda ve inkübasyon adımları çok olan uygulamalar için daha da önemli bir hal alan kriterdir.

Bunların yanı sıra biyosensörün kolay ve az maliyetle üretilebilirliği, kullanımının basit oluşu, küçültülüp taşınabilir hale getirilebilirliği ideal biyosensörün diğer özellikleri arasında yer almaktadır.

Biyosensörler temelde Bölüm 2.2.1’de ve 2.2.2’de detaylı bahsedilecek olan algılama bölümüne (biyo-tanıma) göre ve çevirici sisteme göre olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadırlar.

Tablo 2.1. Algılayıcı ve Dönüştürücü sistemlere göre biyosensörler

2.2.1 Algılama (Biyo-Tanıma) bölümüne göre biyosensörler

Tanıma elemanları; nükleik asitler, canlı hücreler, antikorlar, enzimler mikroorganizmalar ve reseptörler olarak karşımıza çıkmaktadır ve bunlar farklı maddeler içinden kendisine afinitesi olan hedef analiti veya analitleri tanıyıp etkileşime girerek özel yanıt vermektedirler (Singh et al., 2020).

2.2.1.1 İmmünosensörler (Antikor-Antijen temelli):

Antikorlar; iki adet antijen tanıma bölgesi olan, kandaki proteinin %20'sini oluşturan glikoproteinlerdir. Antijen ise vücuda girdiğinde vücut bağışıklık sisteminin antikor oluşturmaya neden olan yabancı bir moleküldür. Bu ilişkiyi temel alarak da immünobiyosensörler oluşturulmuştur. İmmünobiyosensörler bu kompleksi oluşturmak için biyoreseptör olarak antikorları kullanarak antijenlerin

ya da antikora karşı yüksek seçicilik ve özgüllük gösteren bileşiğin spesifik tespitini sağlamaktadırlar (Luppa et al., 2001). Elektrokimyasal, optik, piezoelektrik dönüştürücüler yardımıyla literatürde patojenik mikroorganizmalardaki küçük organik moleküllerin tayini ve ELISA testleri gibi klinik analiz çalışmalarına ek olarak çevre, gıda ve su gibi alanlarda kalite kontrol ve eser miktar madde tayinlerinde de tercih edilen bir biyosensör tipidir (Moina and Ybarr, 2012).

2.2.1.2 Enzim temelli biyosensörler:

Enzimler, protein yapısına sahiplerdir ve kimyasal reaksiyonları özgüllük ve hızlarını arttırıcı özellikleriyle katalize ederler. Canlı metabolizmasında bu reaksiyonlar temeldir (Beilen and Li, 2002). Algılayıcı olarak enzimlerin kullanıldığı, ilaç endüstrisi, tarım, gıda sektörü ve tıpta kullanılan, kalitatif veya kantitatif analizler için uygun bir biyosensör çeşidi ise enzim temelli biyosensörlerdir.

Klinik alanda özellikle hastalıkların eş zamanlı tespiti ve izlenmesinde, özgüllük ve hassasiyetlerinin iyi olması, numune hazırlama süresinin kısa olması nedenlerinden dolayı tercih edilmektedir. Taşınabilirliği laboratuvar dışında analiz için önemli bir avantajdır. İlk biyosensör çalışması olan glukoz oksidaz elektrotları, glukoz oksidaz enzimini biyoreseptör olarak kullanmış olup enzimatik bir biyosensördür (Ispas et al., 2012).

2.2.1.3 Mikroorganizma temelli biyosensörler:

Hareketsiz hale getirilen canlı ya da cansız mikrobiyal hücrelerin algılama elemanı olarak kullanıldığı biyosensör çeşididir. Amperometrik, potansiyometrik, floresan gibi dönüştürücüler tercih edilmektedir. Mikroorganizmalar, tespit yeteneğinde büyük bir skalaya sahiptir ayrıca geniş pH ve sıcaklık aralıklarında çalışabilirler, olumsuz koşullara uyum sağlama yetenekleri vardır. Kullanılan mikroorganizmalar daha çok funguslar ve bakteriler olmakla birlikte mikroorganizmaların yüzeye immobilizasyonu stabilite ve daha uzun süreli kullanım için önemlidir. Immobilizasyon teknikleri kimyasal ve fiziksel olabilir.

Kimyasal yöntemler kovalent ya da çapraz bağlama yöntemleridir. Fiziksel immobilizasyon yöntemleri ise adsorbsiyon ve tuzak yöntemleridir.

Mikrobiyal biyosensörler çevresel analizde ve gıda, klinik izlemede kullanım alanına sahiptirler (D'Souza, 2001; Lei et al., 2006).

2.2.1.4 Doku/Organel temelli biyosensörler:

Hayvan dokusundan elde edilen ilk biyoseçici membran elektrodu 1978 senesinde bildirilmiş olup, bitki ve hayvan kaynaklı doku materyallerinin sensör yüzeyinde biyotanıma elemanı olarak kullanıldığı biyosensör doku temelli biyosensör adını alır. Bahsedilen ilk doku temelli sensör arginin tespitinde rol oynamıştır ayrıca bu biyosensör çeşidi ilaç, hormon, zararlı maddeler gibi önemli analitlerin tespiti için elektrokimyasal dönüştürücülerle birlikte kullanılmışlardır. Bu biyosensör çeşidinin karalılığı yüksek olmasına rağmen tespit süreleri uzundur. Enzim inhibitörleri yardımıyla biyosensörün seçiciliği ve kullanım ömrü geliştirilebilir (Li, 2006; Wijesuriya and Rechnitz, 1993).

2.2.1.5 Genosensörler (Nükleik Asit prob sensörleri):

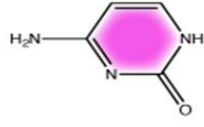
Nükleik asitler Deoksiribonükleik asit (DNA) ve Ribonükleik asit (RNA) olmak üzere ikiye ayrılır. Genetik materyal bu yapılar sayesinde gelecek nesillere aktarılır.

Deoksiribonükleik asit (DNA), Ribonükleik asit (RNA) aracılığıyla proteinlerin tümünün üretiminden sorumlu genetik materyaldir. Tüm yaşam formlarının biyolojik aktivitelerini belirleyen genetik bilgileri taşır. DNA üremede iletilir ve bir DNA dizisi bize aslında çok şey anlatmaktadır. Fiziksel özellikler, genetik yatkınlıklar bunlardan bazılarıdır. DNA aynı zamanda RNA sentezinden de sorumlu olup DNA'daki RNA sentezleyen parçalar **gen** adını alırken bütün genler **genom** adını almaktadır.

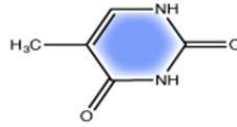
DNA'nın yapısı üç boyutlu, bir eksen etrafında birbirine bağlı bir çift sarmal oluşturan iki uzun diziden oluşmaktadır. Bu zincirleri nükleotid isimli

monomerler meydana getirmektedir, bu monomerler ise bazlar olarak adlandırılır. Çift iplikli DNA (dsDNA) tamamlayıcı baz çiftleri; Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Stidin/Sitozin (C) arasında oluşur, C ve G, A ve T arasındaki bu etkileşimler sonucu anti sarmal yapı meydana gelir. RNA'nın yapısı ise tek nükleotit zincirinden oluşur ve G, C, A bazları dışında bir de Urasil (U) bazı vardır. Bu baz sadece RNA'da bulunmaktadır. Urasil RNA'ya özgü bir baz iken Timin ise DNA'ya özgü bir bazdır. Diğerleri iki nükleik asitte de bulunmaktadır. Adenin ve Guanin çift halkalı **pürin** bazları iken Sitozin, Timin ve Urasil tek halkalı **pirimidin** bazlarıdır. DNA'da bazlar arası tamamlayıcı etkileşim oldukça güçlüdür. Yüksek sıcaklıkta veya kimyasal yöntemlerle DNA'nın iplikleri arasındaki hidrojen bağları kırılır, iplikler birbirinden ayrılır. Bu duruma **denatürasyon** adı verilir. Bu tamamlayıcı ipliklerin ayrılması durumunda doğru koşullar sağlandığında örneğin yavaşça soğutulma gerçekleştirildiğinde iplikler tekrar bir araya gelir, hidrojen bağları kurulur. Bu olaya da **renatürasyon** denilmektedir. Adenin ile Timin arasında ikili hidrojen bağı oluşurken, Guanin ve Sitozin arasında ise üçlü hidrojen bağı oluşmaktadır. DNA'nın üç boyutlu yapısının ikili sarmal şeklinde olduğu ilk kez 1953 yılında Watson ve Crick tarafından öne sürmüştür. Bu iki zincirin 5' karbon ucundan 3' karbon ucuna doğru olan yönleri birbirine zıttır.

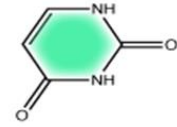
Bir nükleotidde **azotlu organik baz** moleküllerine ek olarak **beş karbonlu bir şeker (pentoz)** ve **fosfat grubu** bulunmaktadır. Eğer pentoz şekeri 2' pozisyonunda hidroksil (OH⁻) grubu bulunduruyorsa bu riboz olarak adlandırılır. Riboz şekerinin bulunduğu nükleik asit Ribonükleik asit (RNA) adını almıştır. Hidroksil grubunun eksikliğinde ise 2'pozisyonunda H (hidrojen) yer alır ve bu şekere deoksiriboz şekeri denilmektedir. Deoksiriboz şekerinin bulunduğu nükleik asit ise Deoksiribonükleik asit (DNA) adını almıştır. Fosforik asitten oluşan fosfat grupları ise nükleik asitlerin tümünde vardır. DNA yapısında şekerin 5'karbon grubuna fosfodiester bağıyla fosfat grubu bağlanır. Fosfodiester bağları güçlü bağlardır ve (5')'den (3') yönüne doğru bağlanır. Bazlardaki azot grupları ise deoksiriboz şekerine ait karbon atomuyla glikozidik bağ yapmaktadır (H et al., 2000; Neto and Lapis, 2009).

Pirimidinler

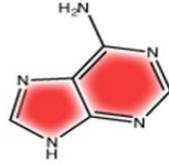
Sitozin



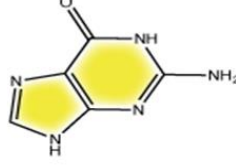
Timin



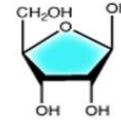
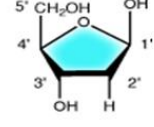
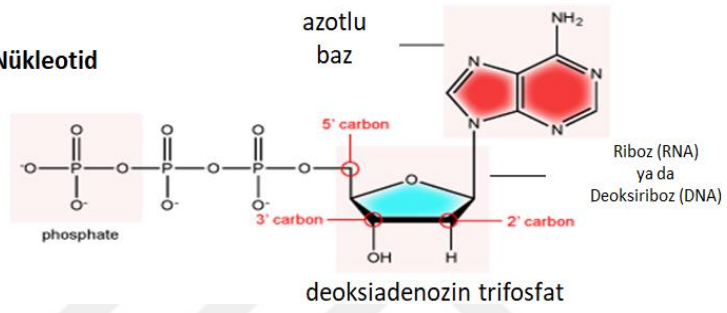
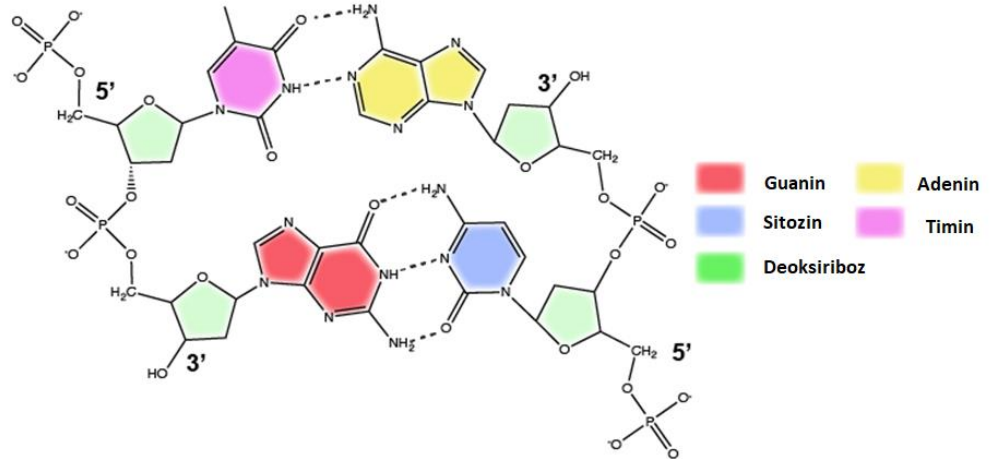
Urasil

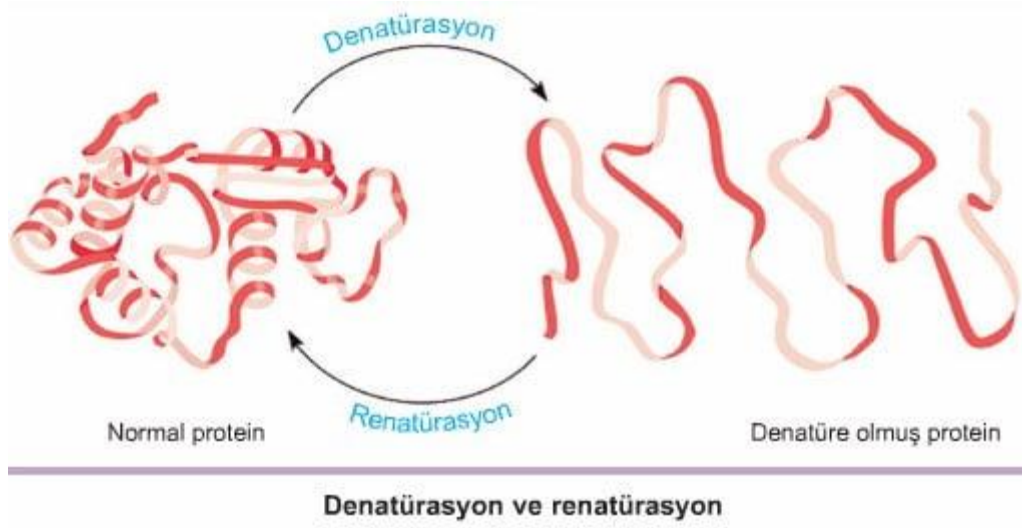
Pürinler

Adenin

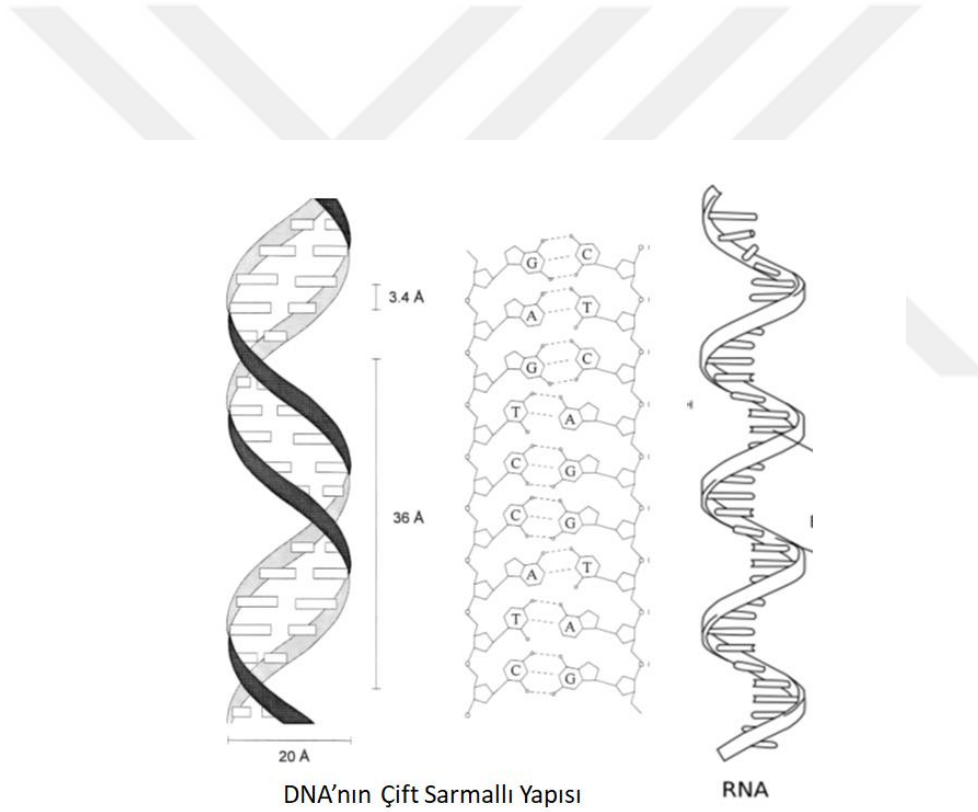


Guanin

ŞekerlerRiboz
(RNA'da)Deoksiriboz
(DNA'da)**Nükleotid****Şekil 2.12.** Nükleotid yapısı ve nükleotidlerin bileşenleri (bio.libretexts.org).**Şekil 2.13.** DNA antisarmal yapının yakınlştırılmış görünümü (bio.libretexts.org).



Şekil 2.14. DNA Denatürasyonu ve Renatürasyonu (eokultv.com)



Şekil 2.15. DNA ve RNA zincirleri (Vo-Dinh and Cullum, 2000); turkcewiki.org)

DNA replikasyonu yarı korunumlu (semikonservatif) bir süreç olup DNA'nın bir bölgesinde başlayarak çift sarmal yapısı boyunca ilerleyen, sonucunda DNA'nın kendisini eşlemesinin gerçekleştiği olaydır. DNA'da replikasyonun ilerleme yönü 5' uçtan 3' ucuna doğru tek yönlü olarak devam eder yani bir sarmalın sentezi kesintisiz ilerlerken diğer sarmal kesikli olarak

ilerlemektedir. DNA replikasyonu insan genomuna dair büyük bir öneme sahiptir. Replikasyon DNA polimeraz enzimi ile başlamaktadır (Bebenek and Kunkel, 2000; Masai and Foiani, 2017).

Genosensörler, biyolojik tanıma için deoksiribonükleik asit (DNA)'i ve ribonükleik asit (RNA)'i kullanırlar. Azotlu bazlar (Adenin ve Timin /Guanin ve Sitozin) arasındaki tamamlayıcılık özelliğinin seçiciliği bu alanda özgünlük oluşturur. Genosensörler hedeflenen bir DNA dizisini tanımlamak için hibridizasyon adı verilen bir olaydan faydalanırlar (Bonanni et al., 2006).

Hibridizasyon; iki adet tek sarmallı DNA (ssDNA)'nın tamamlayıcı sarmallar olmaları durumunda birbirlerine spesifik olarak bağlanıp, çift sarmal DNA (dsDNA) oluşturmaları olayıdır. Genosensörlerde DNA molekülüne ait belirli bir azotlu baz bölümünün bilinmesi durumunda, **prob** adlı tamamlayıcı dizi (ssDNA şeklinde) sentezlenebilmektedir. Sensör yüzeyinde bilinen DNA dizisi yani hibridizasyonun oluşacağı DNA dizisi ise hedef dizi adını alır. Genosensörler, canlılardaki nükleik asit dizilerinin belirlenmesinde, mikroorganizma kaynaklı kontaminasyonlarının araştırılmasında, genetik problemlerin tespitinde, hibridizasyonun seçiciliğinin yüksek olmasından faydalanan biyosensörlerdir. Dönüştürücü olarak elektrokimyasal dönüştürücülerin kullanılması durumunda kalıtsal veya bakteri ve virüs kaynaklı hastalıkların teşhisinde kullanılmak üzere tercih edilebilecek hızlı, daha az maliyetli ve kolay bir yöntem seçilmiş olur (Kara Kadayırcılar, 2007; Vo-Dinh and Cullum, 2000).

2.2.2 Çevirici (Dönüştürücü-Transdüser) sisteme göre biyosensörler

Analit ile tanıma elemanlarının arasında meydana gelen reaksiyondan sonra oluşan biyokimyasal yanıtın fiziksel bir sinyale dönüştürüldüğü kısımdır. Dönüştürücü sisteme göre biyosensörler; optik, piezoelektrik, kalorimetrik ve elektrokimyasal olarak sınıflandırılabilirler.

2.2.2.1 Optik biyosensörler:

Sensör yüzeyinde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonla, ultraviyole (UV), görünür veya kızılötesinde (IR) oluşan ışığın floresan emisyonu, absorbans, kemilüminesans, yansıma, ışık saçılımı ve kırılma indisi ölçümüne dayalı sıklıkla kullanılan sensörlerdir. Fiber optik alanındaki hızlı gelişimde bu alandaki çalışmalar için önemli bir yere gelmiştir. Katalitik ve afinite reaksiyonların ölçümünde de kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, biyotanıma elemanının sensör yüzeyinde immobilize haldeki biyomolekül ile ortam arasındaki yoğunluk farkına neden olmasından kaynaklanan ışık yansıması, ışık saçılımı ya da ışığın açısında meydana gelen değişimin ölçümüne dayanır. (Borisov and Wolfbeis, 2008; Dennison and Turner, 1995; Singh et al., 2020).

En çok kullanılan optik biyosensörler arasında Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR), Floresan Tabanlı Algılama sensörleri, Emilim ve Yansıma biyosensörleri vardır.

2.2.2.2 Emilim ve yansıma biyosensörleri:

Lambert Beer kanununa göre düzenlenen, her kimyasal türe göre değişen dalga boylarındaki ışık spektrumunun emilimine ya da yansımasına göre çalışan bir biyosensör çeşididir. Belirli kimyasal türlerin ışık yoğunluğu sinyali yüzeydeki referans sinyalle karşılaştırılır. Emilim/yansıma dönüştürücüleri, biyosensörlerde enzimler, antikorlar ve DNA/RNA propları ile kullanılmakla birlikte günümüzde bu sensörler bakteri, penisilin ve belirli iyonların tespitinde kullanılmaktadırlar (Li, 2006).

Yüzey plazmon rezonansı (SPR); Plazmon kelime anlamı olarak iletken malzemedeki serbest yükün toplu salınımı anlamına gelmekte olup yüzey plazmonları malzemenin yüzeyiyle sınırlanan salınımlardır. Yüzey plazmon rezonans sensörleri ise sensör yüzeyindeki tanıma elemanı ile biyomoleküller etkileşime girip yüzeye bağlanmaları ile yüzeye yakın olan ortamın kırılma indisi değişmektedir. SPR açısı da buna bağlı olarak değişir. Gelen ışığın açısı, yüzey plazmon plaritonlarının yayılma hızı ile kaybolan dalga yayılma hızını eşleştirmek

üzere değiştirilir. Sensörün çalışma prensibi de bu değişimi ölçmeye dayanır. İlk olarak 1983’de kullanılan SPR biyosensörlerinin avantajları; gerçek zamanlı ve yüksek hassasiyete sahip ölçümler sağlaması ve etiketleme gerektirmemesidir ama yüzey emilimine dayandığı için boyutsal olarak aynı olan emilen diğer moleküllerin özellikleri nedeniyle mi yoksa başka bir sebeple mi emildiğini ayırt edebilen bir yöntem değildir. Bakteri tespitinde, DNA, protein, virüs etkileşimlerinin saptanmasında kullanılmaktadır (Homola, 2003; Li, 2006).

Floresan tabanlı optik biyosensörler; sensör yüzeyine floresan sinyaller üretmek üzere enzimatik, kimyasal ya da genetik olarak floresan problemler tutturulmasıyla oluşturulan, hedef analitin saptanmasıyla da floresan sinyal üretilen biyosensör çeşididir. Bu biyosensörler iyon, protein, metabolit tespitinde, kanser ve ilaç keşfinde, moleküler ve klinik teşhiste yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Seçicilikleri ve duyarlılıkları oldukça yüksektir (Mehrotra, 2016).

Piezoelektrik biyosensörler; Kuvars Kristal Mikrobals (QCM; Quartz Crystal Microbalance) ve Yüzey Akustik Dalga Cihazı (SAW) olmak üzere iki tiptir. Kristal yapısındaki kütle değişimleri bir piezoelektrik kristalin rezonans frekansında değişikliklere neden olur, bu biyosensörler kütledeki bu değişikliğin ölçülmesine göre çalışmaktadırlar. Kütle ve akustik değişim temelli oldukları için bazen **akustik (titreşim) biyosensörler** ismini almaktadırlar.

QCM; piezoelektrik kristalin antikor, enzim gibi biyolojik malzemeler (hedef molekül için yüksek seçicilik göstermeli) kullanılarak kaplamanın sonucunda kaplanmış kristal (doğal-sentetik quartz kristali) hedef moleküle maruz kaldığında, adsorpsiyon oluşur ve absorbe edilen malzeme miktarını belirlemek için oluşan frekans değişikliği kullanılır. Etkileşim oluştuğunda kristalin yükü artar ve osilasyon frekansı azalır (Babacan et al., 2000; Mehrotra, 2016).

15 MHz altındaki frekanslarda çalışan QCM’de; Sauerbrey denklemi ile sensör üzerinde biriken kütle ve frekans arasındaki ilişki ifade edilmektedir;

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m$$

Denklemden f^0 = temel rezonans frekansı, Δf = frekans değişimi, Δm = sensör yüzeyindeki kütle değişimi, A = kristal yüzeyinin alanı, ρ_q = quartz yoğunluğu, μ_q = kesme katsayısıdır. Sensör kütle değişimi ve rezonans frekansı arasındaki ilişki lineerdir (Sadık et al., 2016).

SAW ise 100 MHz üzerindeki frekanslarda çalışmakta olup denklemi daha karışıktır. Kütle hassasiyeti çalışma frekansı ile doğrudan bağlantılı olması nedeniyle QCM'e göre yüksek hassasiyettedir. Peptit tespiti, gıda patojenlerinin tespiti ve DNA sıralamasında kullanılmaktadır.

Piezoelektrik biyosensörler genel olarak etiketsiz olarak tasarlanabilme, çok amaçlı kullanım gibi avantajlar nedeniyle immunosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Genosensör olarak kullanımında ise, tek dizilişli bir DNA/ RNA probunun PQC yüzeyinde sabitlenmesiyle üretilirler (Li, 2006).

2.2.2.3 Termal/Kalorimetrik biyosensörler:

Kalorimetrik ölçümler tek başlarına bir reaksiyona özgü değildirler bu yüzden çok çeşitli malzemelerle kullanılabilmektedirler. Spesifikliği sağlamak amacıyla kalorimetre enzimler veya antikorlar ile kaplanabilir. Analit, sensör yüzeyinde enzim veya antikorlarla biyokimyasal reaksiyona girer ve bunun sonucunda da ortaya ısı çıkar. Enzim katalizli reaksiyonların çoğu ekzotermiktir yani bu sensörler ısı-enzim reaksiyonu ile oluşan analiti içeren solüsyonun sıcaklığındaki değişimi ölçerek çalışır. Üretilen ısı miktarı, reaktan konsantrasyonu ve reaksiyonun hız sabitleri ile doğru orantılıdır. Kısacası bu biyosensörler entalpi değişimine göre çalışmaktadır.

Termal biyosensörler, basit inorganik iyonlar, pestisitler, karbon monoksit gibi moleküller ve DNA zincirleri gibi daha karmaşık biyomoleküllerin tespitinde kullanılabılır ve sürekli izleme, kararlılık, minyatürleştirilebilirlik, düşük

maliyet gibi avantajlara sahiptirler (Thakur and Ragavan, 2013; Zhang and Tadigadapa, 2004).

2.2.2.4 Manyetik biyosensörler:

Son senelerde popülerleşen bu yöntemler, bir manyetik alan sensörüne bağlı tamamlayıcı bir molekül ile etkileşime giren manyetik olarak etiketlenmiş bir molekülün manyetik alanının açığa çıkarılmasına dayanmaktadır. Manyetik mikro ve nano partiküllerin mikroakışkan kanallar içindeki magnetodirenç etkisi kullanılarak hassas şekilde tespit edilmesi için boyutları küçültülmüş biyosensörler, hassasiyet ve boyut anlamında ümit verici bir çalışma alanıdır. Bazı açılardan floresan biyosensörlere göre daha avantajlıdır. Örneğin floresan etiketler zamanla bütünlüğünü yitiren kimyasal bileşiklerdir; manyetik nano etiketlerde böyle bir durum yoktur. Doku ve organ üretiminde uzun dönem etiketleme deneylerinde bu durum avantajlı olabilir. Manyetik malzemeler, arka plan gürültüsüne sebep olmazlar ayrıca manyetik tahlillerin duyarlılığının, floresan tahlillerinden daha büyük olduğu gösterilmiştir. Ancak benzetim çalışmaları bu alanda şu an için bir zorluktur (Li Yanbin, 2006; Nabaei et al., 2018).

2.2.2.5 Kondüktometrik biyosensörler:

Temeli iletkenlik ölçümüne dayanan, biyokimyasal reaksiyon sonucunda ortaya çıkan iletkenlik değişiminin ölçüldüğü biyosensör çeşididir. Kondüktometrik biyosensörler, referans elektrot olmadan da ince film standart teknolojisi ile üretilebilirler, bu maliyet uygunluğu sağlar ve diğer dönüştürücülere göre bir avantajdır (Jaffrezic-Renault & Dzyadevych, 2008). Analitlerin hızlı ve kolay tespitini sağlar ancak seçici bir yöntem değildir. Seçiciliği yüzey modifikasyonlarıyla sağlanabilir (Stradiotto et al., 2003). Algılama elemanı olarak genellikle üreaz gibi enzimler kullanılır. Mikrobiyosensörler için umut vaat eden, üre, yüklü moleküller ve oligonükleotitler gibi analitlerin tespitinde tercih edilmektedirler (Thakur and Ragavan, 2013).

2.2.2.6 Elektrokimyasal biyosensörler:

Leland C. Clark'ın tanıttığı ilk biyosensör bir elektrokimyasal biyosensör olup elektrokimyasal biyosensörlerde moleküllerin reaktanlarla etkileşime girmesi sonucu analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak üretilen elektrik sinyalinin iletilmesiyle çalışır. Üretilen elektrokimyasal sinyal potansiyometrik, amperometrik, impedimetrik veya kondüktometrik analiz sistemleri kullanılarak algılanabilir bir sinyale dönüştürülürler. Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarındaki üretilen akımı ölçer. (Singh et al., 2020; Thakur and Ragavan, 2013). Elektrokimyasal biyosensörler bakım noktası testleri (POC)'nde küçük platformlar sunabilmeleri nedeniyle ve hassasiyet, seçicilik, hızlı yanıt verme gibi özelliklerinin avantajları sayesinde tercih edilmektedir. Özellikle amperometrik, impedimetrik ve voltametrik teknikler kullanılarak otoimmün hastalıkların tespitinde kullanılabilmektedirler (Ghorbani et al., 2019).

• **Voltametrik/Amperometrik biyosensörler;** voltametri akımın, voltajın yani elektrot potansiyelinin bir fonksiyonu olarak ölçüldüğünü belirtmektedir. Döngüsel voltametri (CV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV), doğrusal süpürme voltametrisi (LSV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) gibi farklı yöntemleri bulunmaktadır. Voltametrik biyosensörler; elektro-aktif reaktantın ya da ürünün indirgenmesi veya yükseltgenmesi sırasında üretilen akımı ölçerek çalışmaktadır.

Amperometrik biyosensörler; voltametrik biyosensörlerin bir alt grubu olup sabit potansiyele sahip bir analitin miktarını belirlemek için üretilen akımı (indirgeme veya oksidasyon reaksiyonuna bağlı olarak) ölçerler. Voltametrik biyosensörlerde ise yukarıda belirtildiği gibi farklı yöntemler vardır ve her yöntemle göre akım ve gerilim değişir. Bunlarda üçlü elektrot sistemi kullanılır ve çalışma elektrotunda elektrokimyasal oksidasyona veya indirgenmeye maruz kalan tür tespit edilmiş olur (Dennison and Turner, 1995; Ghorbani et al., 2019).

Amperometrik biyosensörler; nanobiyosensör tasarımı, immünbiyosensör tasarımı, dsDNA tespiti, şeker, alkol, O₂ vb. moleküllerin

tespiti ve gerek ticari gerek araştırma alanlarında uygulama basitlikleri ve esneklikleri sebebiyle tercih edilmektedirler (Dennison and Turner, 1995; Thakur and Ragavan, 2013). Voltametrik biyosensörler özellikle otoimmün hastalıklarda spesifik biyobelirteçlerin hassas tespitinde önemli bir yer edinmiş olup yüksek hassasiyetleri, seçicilikleri ve eşzamanlılık gibi özellikleri nedeniyle bu alanda öne çıkmaktadırlar (Ghorbani et al., 2019).

• **Potansiyometrik biyosensörler;** ölçümü biyosensörün elektrotu ile referans elektrot arasındaki potansiyel farka dayanarak (sıfıra yakın akım akışında) gerçekleştirilir (Dennison and Turner, 1995). Genellikle iyon seçici elektrot (ISE) bu biyosensörlerde dönüştürücü olarak tercih edilmekle birlikte dönüştürücüye bağlı biyolojik algılama elemanı içeren cihazlara potansiyometrik biyosensör denmektedir. Potansiyometrik ölçümün ilkeleri, referans ve gösterge elektrotları arasındaki potansiyel fark Nernst-Donnan denkleminde bulunmaktadır. $E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{oks}}{a_{red}} \right)$ denkleminde E_0 = sensör elektrodunun standart potansiyeli, R=evrensel gaz sabiti, T=mutlak sıcaklık (Kelvin), F=faraday sabiti, n=Elektrot yarı-reaksiyonunda yer alan elektron sayısı ve aoks/ared ise yükseltgenmiş ve indirgenmiş türün aktiviteleridir (Yunus et al., 2013).

En çok karşımıza çıkan potansiyometrik cihazlar pH elektrotlarıyken genel olarak yaygın olan potansiyometrik sensörler membran temel tabanlı İyon Seçici Elektrotlar (ISE), Ekran Baskılı Elektrotlar (SPE), İyon Seçici Alan Etkili Transistörler (ISFET), Katı Hal Cihazları ve kimyasal olarak değiştirilmiş elektrotlardır. Bu sensörlerden enzimatik, mikrobiyal, immunosensörler gibi biyosensörlerin gelişiminde yararlanılmıştır. Halk sağlığında ve endüstriyel süreçlerde, iyon ve gaz seçici süreçlerde bu biyosensörlerin kullanım alanı bulunmaktadır (Singh et al., 2020; Thakur and Ragavan, 2013).

• **İmpedimetrik biyosensörler;** elektrokimyasal empedans spektroskopisine hem kapasitif hem direnç özelliklerinin analizine dayanmaktadır. İmpedimetrik biyosensörlerde iletken ve yarı iletken yüzeylerdeki biyomoleküler etkileşimlerin net yüküne göre protein, peptit

gibi moleküllerin tespiti sağlanır ve giderek kullanımı artan tahribatsız bir tekniktir. İmpedimetrik biyosensörler, temelde belirli bir biyolojik sistemin elektrik empedansını ölçer. Daha verimli ve biyouyumlu hale getirilmesi için nanokompozitler kullanılabilirler. Nükleik asit bazlı, bağışıklığa dayalı, hücre/mikroorganizma bazlı, enzim tabanlı sensörler geliştirilirken kullanılabilir. Multipl skleroz (MS) hastalarında otoantikor tanınmasında ve Çölyak hastalarında antikor belirlenmesinde kullanılmıştır. (Ghorbani et al., 2019; Guan et al., 2004). Basit ve taşınabilir sensörler geliştirmek için oldukça önemli potansiyele sahiplerdir (Razavi and Janfaza, 2015).

2.2.3 Biyosensörlerin kullanım alanları

Biyosensörler tarım, gıda, sağlık, endüstri uygulamaları başta olmak üzere canlı olan her yerde uygulama alanına sahiptir. Temel hedef yaşam kalitesini yükseltmektir.

- ✓ İlaç İzleme/İlaç Üretimi
- ✓ Hastalık Tespiti
- ✓ Çevresel İzleme
- ✓ Toprak Kalitesi İzleme
- ✓ Gıda Kalitesi İzleme
- ✓ Su Kalitesi İzleme
- ✓ Biyolojik Savunma (bir dizi kimyasal ve biyolojik ajanın tespiti için)
- ✓ Prostetik Cihazlar (kalp pili gibi) (Bhalla et al., 2016).

Gıda alanın kimyasal deneyler ve spektroskopi gerçekleştirilen tekniklerde zaman ve maliyet açısından zorluklar olmakla birlikte gıda ürünleri insan sağlığı açısından tehlike arz edebilirler bu da büyük sorunlar yaşanmasına yol açacağı için gıda kalitesi ve güvenliği oldukça önemlidir. Gıda ürünlerinin tutarlı, gerçek zamanlı, seçici, daha uygun maliyetlerle ölçülmesi biyosensörler sayesinde mümkün kılınmıştır. Biyosensörler gıdadaki sadece zararlı etkenleri (toksin,

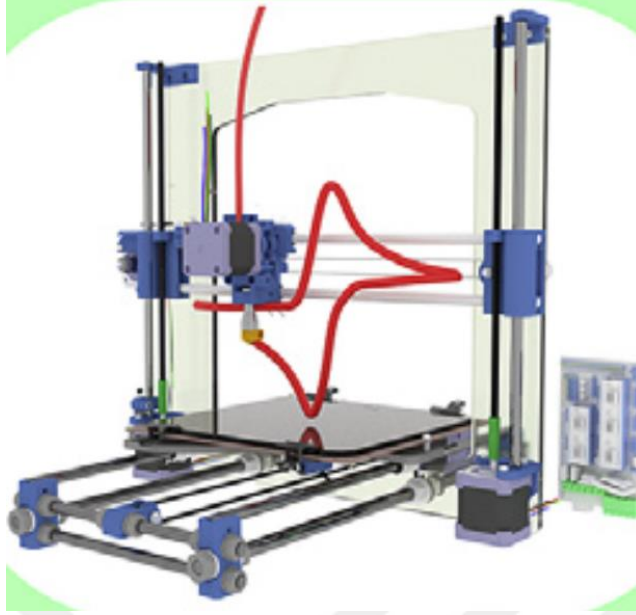
alerjen vb.) değil şeker, alkol, aminoasit gibi analitleri ve miktarlarını da tespit etmekte kullanılırlar (Aykut ve Temiz, 2006; Mehrotra, 2016).

Biyosenörlerin sağlık alanındaki temel uygulamaları bir hastalığın göstergesi ya da bir ilacın hedefi olan molekülün tespitiyken örneğin glikoz biyosensörleri dünya pazarının %85'ini oluşturmaktadır. Klinik alanda analizde önemli olan güvenilirlik, hız, hedef analite özgü olmak, basit kullanım, taşınabilirlik ve uygun maliyettir. Sağlık alanında elektrokimyasal biyolojılama teknikleri, protein kanseri biyobelirteçlerini saptamak için bir klinik araç olarak kullanılabilir. Buna ek olarak sağlıkta biyosensörlerin hamilelik testleri, E.coli, İnfluenza A ve B virüsleri gibi hastalık yapan patojen mikroorganizma tespiti, nükleik asit teşhisi (babalık testleri, genetik araştırmalar, cinsiyet ya da soy tespiti, hastalık teşhisi vb.) gibi çeşitli uygulamaları bulunmaktadır (Monoşik et al., 2012).

2.3 3 Boyutlu Baskı (3D Printing) Teknolojisi

2.3.1 3 Boyutlu Baskı (3D Printing) yöntemleri

3 Boyutlu baskı (3D printing) 1980 yılında Charles Hull tarafından geliştirilen ve o zamandan bu yana tıp, biyoloji, kimya ve başta inşaat, endüstri ve makine mühendisliği olmak üzere birçok mühendislik alanlarının yanı sıra araştırma laboratuvarlarında da giderek artan bir ilgi gören teknolojidir (João et al., 2020). Günümüzde 3 Boyutlu baskı tarım, sağlık, otomotiv ve havacılık endüstrilerinde giderek daha fazla kullanılmıştır. Sürekli gelişerek, daha kullanışlı ve daha uygun fiyatlı bir hale gelmiştir (Gokhare Vinod G. et al., 2017).



Şekil 2.16. 3 boyutlu yazıcı (Cardoso, Kalinke, et al., 2020)

3 boyutlu baskı; bir şeklin sanal ortamda tasarlanıp belirli aşamalarla ve belirli malzemeler kullanılarak katı modelinin oluşturulması işlemidir. Modelleme (tasarım), dilimleme ve baskı sürecinden oluşmaktadır. 3 boyutlu baskıda modelleme, hazırlanmak istenen nesnenin şeklini veri toplayarak analiz etme sürecidir. Bu modeller CAD tasarım yazılımları ya da 3 boyutlu tarayıcılar aracılığıyla oluşturulabilmektedir (Gokhare Vinod G. et al., 2017). Bu kısımda kullanılan CAD yazılım programlarına örnek olarak SolidWorks, AutoCAD, FreeCad, Fusion 360 ve Tinkercad verilebilir.

Modellemesi tamamlanan bir 3 boyutlu tasarım baskı kısmına geçilmeden önce dilimleyici adı verilen bir yazılım tarafından işlenmektedir. Modelleme kısmından sonra oluşan dosya programı .STL olarak geçmektedir. 3 boyutlu model yazdırılmadan önce .STL dosyası bu dilimleyici program ile G-koda (geometrik kod) dönüştürülmektedir. Slic3r, KISSlicer, Cura ve RepRap Host Software gibi birçok açık kaynak dilimleme programı vardır. Bu işlem 3B baskı sırasında ekstrüderin izleyeceği yolu belirleyen 2B katmana dönüştürür yani 3 boyutlu yazıcı, modeli oluşturmak için G-kod satırlarını okuyarak gerekli talimatları uygular. Buradan itibaren 3B yazıcı 3B nesneyi katman katman malzeme biriktirme yoluyla oluşturur ve son işlem olan baskı kısmına geçilmiş

olur. Baskı işleminin süresi, hazırlanan modelin tasarımına, sayısına, boyutuna gibi kısıtlara bağlı olarak değişmektedir (Gokhare Vinod G. et al., 2017).

Yaygın olarak kullanılan dört farklı 3 boyutlu baskı yöntemi bulunmaktadır:

1. Fotopolimerizasyon; sıklıkla kullanılır ve nesne lazer ışını veya ultraviyole (UV) ile foto-reaktif polimerler katman katman seçici olarak sertleştirilerek oluşturulur. Stereolitografi (SLA) ve dijital ışık işleme (DLP) bu kategoriye örnek verilebilir. Stereolitografide ışık sayesinde molekül zincirleri birbirine bağlanır ve polimer oluşmasına neden olur (Gokhare Vinod G. et al., 2017). Dijital ışık işleme (DLP)'de buna benzerdir. Temel fark ışık kaynağıdır. Daha geleneksel bir ışık kaynağı kullanır. Tek geçişte uygulanabilir, bu sayede hızlı bir hal alır. İlk başta kullanılan malzemeler sıvıdır. Sıvı ultraviyole ışık ile sertleşir. Fotopolimerizasyon, daha detaylı ve kalitesi yüksek bir yüzeye sahip ürünler yapmak için kullanışlıdır (Shahrubudin et al., 2019).
2. Ekstrüzyon; Temelinde FDM yani kaynaşmış (erimiş) birikim modellemesi yer almaktadır. Bu yöntem polimerik bir malzemenin eritilerek, ısıtılmış bir başlıkla kolayca katılaştığı bir baskı tablası üzerinde birikerek katmanlar oluşturduğu ve istenen nesnenin oluşturulmasına kadar diğer katmanların ilk katman üzerine eklenmesine dayanan filament bazlı 3B baskı teknolojisidir. Kısacası yarı erimiş termoplastik bir filamanın ekstrüzyonuna dayanır (Vaněčková et al., 2020). Ekstrüzyona dayanan 3B baskı tekniği ile çok malzemeli, renkli çeşitli baskılar yapılabilmektedir. Düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı nedeniyle sıklıkla tercih edilir (Shahrubudin et al., 2019).
3. Toz bazlı; Mürekkep püskürtmeli 3 boyutlu baskı, Seçici Lazer Ergitme (SLM), Seçici Isı Sinterleme (SHS) baskı yöntemlerini içermektedir. Yüksek güç yoğunluklu bir lazer veya elektron ışını kullanılarak malzeme tozu eritilir. Genellikle metaller, seramikler, polimerler veya kompozitler kullanılan 3B baskı veya ek üretim tekniğidir. Metal, plastik, seramik nesneler elde etmek üzere SLM tekniği sıklıkla kullanılmaktadır

(Cardoso, Kalinke, et al., 2020) (Shahrubudin et al., 2019). Teknik olarak hareket ettirilen lazer ışınıyla bölgesel olarak eriyen ince metal parçaların kaynaştırılmasıdır. Elektrokimyada, süper kapasitörler için Ti elektrotların üretimi SLM tabanlı 3B baskının ilk bildirilen uygulamasıdır (Vaněčková et al., 2020).

4. Laminasyon; oluşturulmak istenen nesnenin herhangi bir parçasını üretmek üzere yüzey kaplama işlemi olarak tanımlanır. Tabaka laminasyonu tabakaların birbirine yapıştırılmasına dayanan 3 boyutlu baskı işlemidir ve kağıt, plastik veya metal laminant katmanlar sırayla birleştirildikten sonra lazer kesici ile uygun olarak kesilir (Gokhare Vinod G. et al., 2017). Lamine nesne üretimi (LOM) ve ultrason katkılı üretim bu tekniği kullanmaktadır (Shahrubudin et al., 2019).

Bahsedilen baskı yöntemleri içinden SLM tekniği kullanılarak metal elektrotlar 3 boyutlu olarak basılabilmektedir ve iletkenliğin yüksekliği bakımından oldukça avantajlı olmasına rağmen kullanılan yazıcıların yüksek maliyetli oluşu ve hazırlanan metal elektrotların, pratik uygulamalarda aktif katalizörler olarak rol alması için fazla modifikasyona ihtiyaç vardır (Browne et al., 2018).

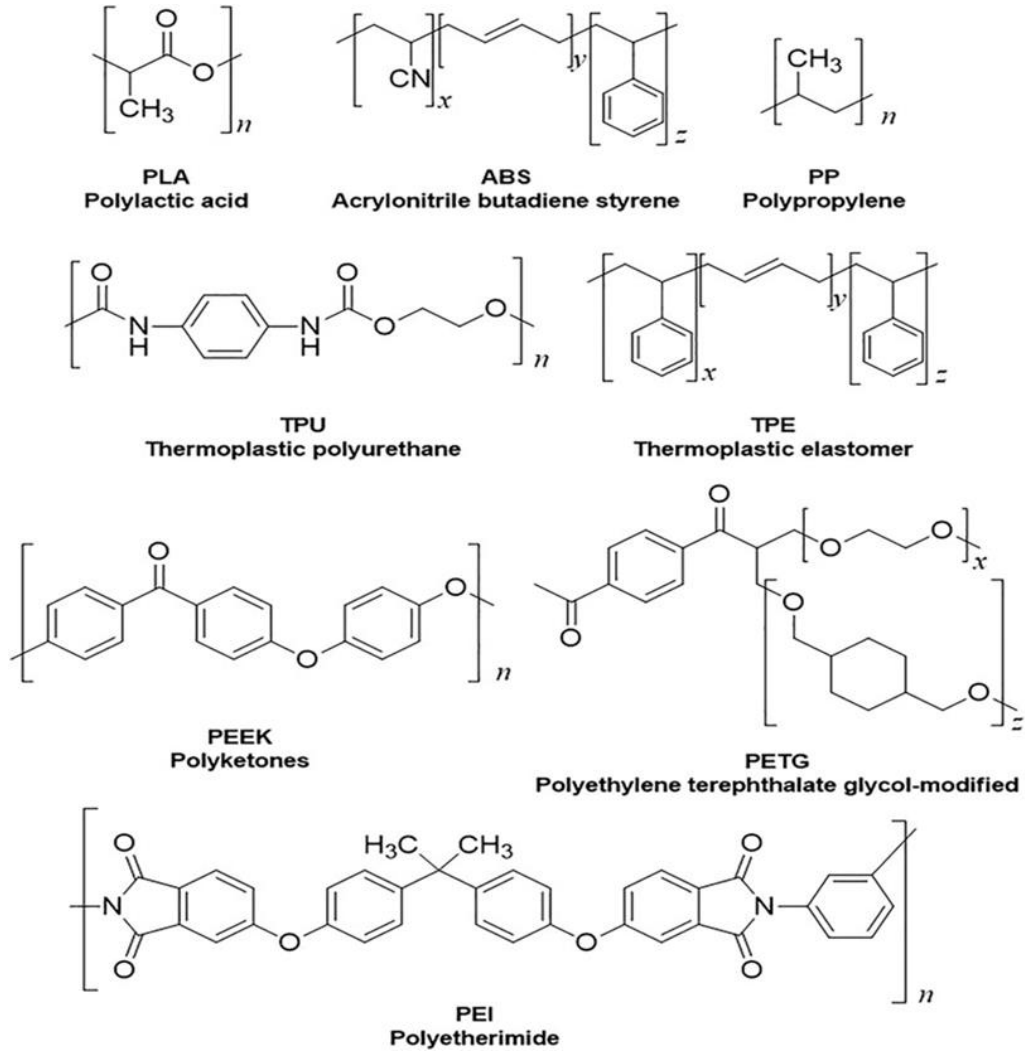
Tez kapsamında kaynaşmış (erimiş) birikim modellemesi (FDM) yöntemi ile çalışan bir üç boyutlu yazıcı tercih edilmiştir. FDM 3B baskısı, metal 3B baskıdan önemli oranda daha az maliyetlidir. FDM; ekstrüzyon işlemine dayanan, en popüler 3B baskı tekniğidir. Isıtılan bir nozül (meme) ucundan kısmen eritilen filamentin çıkışıyla katman katman birikerek bir nesne oluşturması işlemidir (Martins et al., 2021). Hızlı prototipleme, özelleştirilmiş tasarım, daha düşük maliyet, seri üretime izin verirken aynı zamanda imalatın tek adımda yapılabilmesi, çok malzemeli 3 boyutlu baskılarda da kullanılabilmesi, diğer 3 boyutlu yazıcılarla uyumluluğa sahip olması ve 3B baskılı çoklu bileşenlerin entegrasyonu gibi özellikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Entegrasyon, bakım noktası (POC) uygulamalarında kullanılmak üzere uygun minyatür sistemlerin üretimesine de izin vereceği için önemli bir detaydır. Tüm bu özellikleri ile FDM son yıllarda giderek artan bir ilgi görmektedir (Contreras-

Naranjo et al., 2021). Elektrokimyasal araştırmalarda da hücre tasarımları, elektroanalitik algılama için özelleşmiş hücreler ve mikroakışkan elektrokimyasal sensörler, organik elektrosentez hücreleri gibi FDM tabanlı 3B baskının ilk uygulamaları bulunmaktadır (Vaněčková et al., 2020). Ancak FDM tekniği yalnızca düşük erime noktasına sahip malzemeleri işlemekte yeterlidir bu sebeple metallerin ve alaşımların büyük bir kısmı ile uyumlu değildir.

2.3.2 3 Boyutlu Baskı (3D Printing) malzemeleri

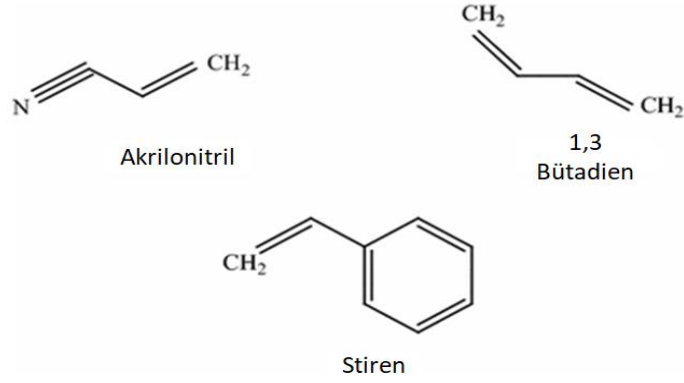
3B baskıda kullanılacak teknolojinin seçilmesi aşamasından sonra dikkat edilmesi gereken diğer aşama kullanılacak olan hammaddenin seğilmesidir. Kullanılabilecek filament çeşitliliği oldukęa fazladır. Bunların başlıca gelenleri şunlardır; Polilaktik Asit (PLA), Akrilonitril Bütadien Stiren (ABS), Polietilen Tereftalat Glikol modifiyeli (PETG), Termoplastik Poliüretan/Termoplastik Elastomer (TPU/TPE), Polipropilen (PP), Taulman Tritan Yüksek Gerilimli Polyester (Tritan), Poliketonlar (PEEK), Polieter Keton Keton (PEKK) ve Polieter İmid (PEI) (Silva et al., 2021).

FDM 3B baskı tekniğinde 3 boyutlu cisimler oluşturmak üzere en çok kullanılan termoplastik malzemeler ABS, PLA ve poliamid (PA)'dır. Bunlar doğal iletken değillerdir ancak elektrokimyasal uygulamalarda ve iletkenlik gerektiren 3B tasarımlarda grafen, karbon siyahı, karbon nanofiber (CNF), karbon nanotüp (CNT) gibi karbon nanoyapılarla karıştırılarak hazırlanan filamentler tercih edilmektedir (Carvalho et al., 2021).

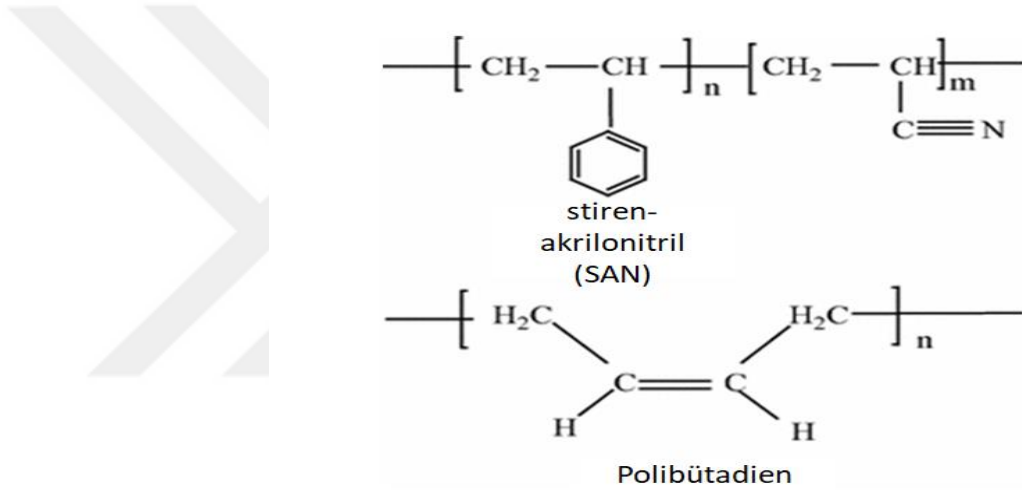


Şekil 2.17. 3B baskı için hammadde olarak kullanılan polimerlerin kimyasal yapıları (Silva et al., 2021).

Akrilonitril Bütadien Stiren (ABS): Farklı oranlarda akrilonitril, bütadien ve stirenin bir araya gelerek oluşturduğu Akrilonitril-1,3-Bütadien-Stiren (ABS) adını alan termoplastik bir polimerdir (de Oliveira et al., 2018). Kimyasal formülü $(C_8 H_8 \cdot C_4 H_6 \cdot C_3 H_3 N)$ 'dir. Şekil 2.19'da gösterildiği gibi bir stiren-akrilonitril fazı (SAN) ve bir polibütadien dağınık fazı olmak üzere iki fazı bulunmaktadır. SAN fazı ketonlarda, esterlerde, aromatiklerde çözünebilir ve oksitleyici maddeler de polimerin zincirlerini kırarak bozulmasına sebebiyet verir. 280°C'nin üzerindeki çalışma sıcaklıklarında ise kauçuk fazı tokluk özelliğini yitirir ve ayrışır. Polimer zinciriyse 300°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kırılır. ABS hidrofobik bir polimerdir.



Şekil 2.18. ABS'nin monomer birimleri.

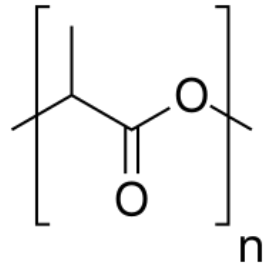


Şekil 2.19. Fazlar.

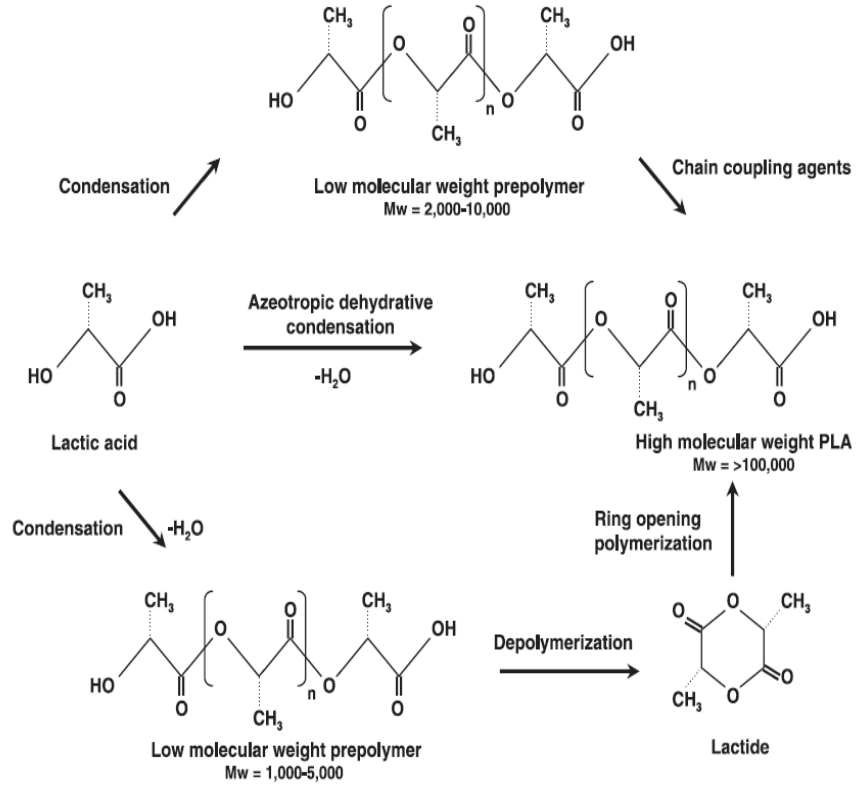
İyi tokluğa, kolay işlenebilirliğe ve fiyatsal uygunluğa sahip bir malzemedir. Çevresel faktörlere direncinin düşük olması, doğal bir iletken olmaması ve kolay aşınması eksik yönleridir. Bu özelliklerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle kimyasal ön işlem uygulanarak üzerine metal kaplanabilmesi sebebiyle kaplama için tercih edilmektedir. Kaplama uygulanabilir olması sebebiyle de modern eklemeli imalat (AM) süreçlerinde yani Seçici Lazer Ergitme (SLM), Kaynaşmış Birikim Modelleme (FDM) ve Laminasyon gibi süreçlerde önemli bir yer kazanmıştır (Olivera et al., 2016). 3B yazıcılarda düşük sıcaklıklarda dahi güçlü ve dayanıklı olan yapısı sayesinde ısı ve kimyasallara karşı iyi direnç göstermesi ve kolay işlenmesi gibi sebeplerle filament olarak yaygın bir kullanım alanı vardır. ABS esas olarak endüstriyel alanda kullanılır ve

iyi mekanik özellikler, işleme kolaylığı, yeniden kullanım olanağı sunar ve dünya çapında üretilir. ABS ekstrüzyon sıcaklığı aralığı bileşime bağlı olarak 200 ° C ile 300 ° C arasındadır. Bu sıcaklıklara 3B yazıcının ulaşması daha uzun sürdüğü için buna bağlı olarak baskı süresi de uzamaktadır. Yaklaşık 400 °C gibi yüksek sıcaklıklarda baskı alındığında ise solunulması önerilmemektedir. Toksik kimyasallar içeren bir filament olmamasına rağmen yüksek sıcaklıkta eritme işlemi esnasında ortaya çıkan duman göz, cilt, solunum yolunda tahriş gibi etkilere neden olabilir. Bu sebeple havalandırma borusu ya da kapalı sistem 3D yazıcılar ile kullanılması önerilir (boyutkat.com).

Polilaktik Asit (PLA) : "Biyolojik olarak parçalanabilir plastikler" adı verilen bir polyester ailesine aittir (Manzanares-palenzuela & Hermanova, 2019). Laktik asit veya laktik monomerleri yapı taşıdır. Bunlar PLA'ya polimerize olur. 2 farklı yol ile bu gerçekleşebilir. İlki yüksek vakum altında yoğuşma, ikincisi ise çözücü içermeyen ara madde (laktit) oluşumudur. Yoğuşma ile elde edilen polimer düşük ya da orta moleküler ağırlıklıdır. Kimyasal formülü $(C_3H_4O_2)_n$ ya da $[-C(CH_3)HC(=O)O-]_n$ olan PLA, su uzaklaştırılarak laktik asit $(C(CH_3)(OH)HCOOH)$ yoğunlaştırılmasıyla elde edilmiştir. Diğer yolda ise çözücü içermeyen ve genellikle laktit $([-C(CH_3)HC(=O)O-]_2)$ olarak isimlendirilen bir siklik ara dimer üretilir. Damıtma yöntemi ile saf hale getirilir (Gupta and Revagade, 2007). Bu halka açma polimerizasyonu ile da moleküler ağırlığı kontrollü bir PLA elde edilmiş olur. Temelde PLA yenilenebilir kaynaklardan (mısır, pancar, manyok, şeker kamışı vb...) elde edilebilen, biyolojik olarak parçalanabilir, biyomedikal uygulamalarda kullanılan ve bu alan için geliştirilmeye açık biyopolimerlerden biridir. Çeşitli organik çözücülerde çözünebilmektedir. Hidrofobiktir (Driussi et al., 2019).



Şekil 2.20. Polilaktik Asit



Şekil 2.21. Polilaktik Asit Sentezi.

PLA; tıbbi implantlarda yani vidalar, plakalar, pimler gibi malzemelerde, doku mühendisliğinde iskelelerde, ilaç ve ilaç salım sistemlerinde tercih edilmektedir. Bunun nedeni 6 ay ile 2 yıl arasında kademeli bozulma göstermesidir, mukavemet özellikleri iyidir. Bu özellik destek yapısı için tercih edilmektedir çünkü kullanıldığı kısım iyileştikçe yükü vücuda (örneğin kemiğe) kademeli olarak aktarır. Tıbbi uygulamalarının yanı sıra giyim, mobilya sektörü, tarım gibi alanlarda da kullanımı oldukça yaygındır (Stringfixer.com). 3B baskıda PLA filamenti, FDM tekniği ile malzeme üretmek için en yaygın kullanılan plastik filamenttir. Filamentin çapı, biçimi ve sürekliliği mukavemet ve dayanıklılığı etkileyen özelliklerdir. Düşük ısı ve mekanik dirence sahip olması, nem çekiciliğinin de yüksek olması PLA'yı kırılğanlaştırır. Bu sebeple 3B yazıcılarda dikkatli kullanılmalıdır, aksi takdirde nozzle tıkanması gibi sorunlara sebebiyet verebilir. PLA filamenti yaklaşık 180°-230°C'lik bir erime sıcaklığına sahiptir. Baskı hızı da diğer filamentlere oranla daha hızlıdır. İstenilen davranışı kazandırmak için polimerik olan veya olmayan bileşenler ile karıştırılarak

kullanıma da uygundur (Cardoso, Kalinke, et al., 2020). Ayrıca PLA materyali (alifatik polyester) alkali içinde sabunlaşmaya karşı hassasiyet gösterir.

Elektrokimyasal uygulamalarda çok sık olmasa da kullanılan diğer filament hammaddeleri ise aşağıda bahsedildiği şekildedir:

Polietilen Tereftalat Glikol (PETG); Esnek ve kolay şekillenebilir bir malzemedir. Diğer avantajlarına UV dayanıklılığı, hidrofobikliği, biyouyumlu oluşu, hafif ve geri dönüştürülür oluşu örnek verilebilir. Gıda sektöründe güvenli kabul edilen, FDA onaylı bir malzemedir bu sebeple temel kullanım alanı gıda malzemelerinin saklanması için kullanılan kaplardır. 3B baskı için 210°C ile 230°C aralığında baskı önerilmektedir (Silva et al., 2021; Srinivasan et al., 2020)

Polipropilen (PP); saf PP 3B baskı teknikleri ile işlenmesi daha zor olan bir hammaddedir çünkü yüksek kristallik derecesine ve hacimsel büzülme özelliğine sahiptir. Bunu azaltmak için diğer polimerler ile modifiye edilerek kullanımı daha başarılı olur. Ek olarak iyi esneklik ve yüksek kimyasal dirence sahip bir hammaddedir. İdeal 3B baskı sıcaklığı 215°C ve 230°C arasında değişmektedir (Bertolino et al., 2021; Silva et al., 2021).

Termoplastik Poliüretan (TPU); higroskopik yani nem tutucu bir polimerdir. Polipropilen ile kıyaslandığında yüksek çekme dayanımı, kimyasallara karşı daha yüksek aşınma direnci ve daha güçlü darbe dayanımı göstermektedir. İşlenme kolaylığı ise Polietilen Tereftalat Glikol (PETG) filamenti kadar basit değildir. TPU filamenti ile 3B baskıda ekstrüzyon sıcaklığı ortalama 225°C ile 235°C aralığındadır. Ayrıca TPU yüksek viskozite göstermektedir. Baskı sırasında bu özelliği de biraz zorluk oluşturmaktadır (Silva et al., 2021; Xiao and Gao, 2017).

Poliamid (PA); monomerlerin amit bağları ile bağlanarak oluşturduğu bir çeşit polimerdir. Bu hammadde 3B yazıcılarda PLA ve ABS'ye göre daha yeni bir seçenektir. Biyouyumluluk, iyi mekanik özellikler göstermesi ve kimyasal kararlılığı biyomedikal uygulamalarda özellikle de yapı iskeleleri, implantlar ve ortopedik uygulamalar için PA'nın kullanım alanının artırılmasını içeren

alışmalar giderek artmaktadır. 3B baskı sırasında nozül sıcaklığı ortalama 230°C olarak belirlenmiştir (Rahim et al., 2015).

Elektrokimyasal cihazlar için 3B baskı uygulamalarında en çok kullanılan filamentler iletken formdaki PLA ve ABS'dir. Her iki malzemenin genel özelliklerini değerlendirmek için, Rodríguez-Panes ve arkadaşları (2018) FDM tekniği ile üretilen ABS ve PLA parçaları arasında karşılaştırmalı bir analiz bildirdi. Bu analize göre PLA biyolojik parçalanabilirliği nedeniyle evre dostu olan, laktik asit tabanlı polimer bir malzemedir. Uygun bir fiyat aralığında temin edilebilir olması önemli bir avantajıdır. ABS dış etkenlere (darbe, aşınma ve kimyasallar) karşı oldukça dayanıklıdır. Bu zellikleri endüstri alanında popülerliğini arttırmıştır. ABS 200°C ile 300°C arasında ekstrüzyon sıcaklığına sahiptir. PLA da ise bu sıcaklık 180° ile 230°C aralığındadır. PLA baskı sırasında ABS'nin aksine riskli sayılabilecek bir buhar yaymaz. Ancak çok yüksek sıcaklıklar gerektiren parçalar için kullanılmamalıdır. ABS, sıcaklık değişikliklerine daha dayanıklıdır. Kısacası, PLA daha rijittir ve daha büyük bir çekme mukavemetine sahiptir. ABS daha sünektir ve darbe dayanımı çok daha yüksektir, bu özelliği diğer plastiklerden temel farklarından biridir. Görüldüğü üzere iki malzeme de avantajlara sahiptir. İkisinden biri seçilirken istenen özellikler göz önüne alınarak seçim yapılmalıdır (Cardoso, Kalinke, et al., 2020; Rodríguez-Panes et al., 2018).

2.3.3 3B baskılı elektrokimyasal biyosensör uygulamaları

Elektrokimyasal uygulamaların temelinde iletkenlik vardır. Kompozitler 3B baskılı cihazlarda elektriksel özellikleri iyileştirerek bu iletkenliği sağlamak için gereklidirler. Bu nedenle PLA ve ABS'den iletken filamentler elde etmek için karbon siyahı (CB), karbon nanofiber (CNF), karbon nanotüp (CNT) ve grafen gibi karbon nanobazlı iletken malzemeler polimer matrikse eklenmektedir. Bunların ABS ve PLA'ya oranla yüzdesi yeterli iletkenlik ve başarılı 3B yazdırılabilirlik için en uygun hale getirilecek şekilde ayarlanmalıdır. Bu sayede daha basit, hızlı ve daha düşük maliyetle çok yönlülüğe sahip iletken tasarımlar yapılabilir. Bahsedilen karbon temelli malzemelerin yüksek iletkenlikleri dışındaki sıklıkla tercih edilmelerinin nedenleri ısı ve mekanik dirençlerinin

yüksek oluşu, kimyasal eylemsizlik ve yüksek yüzey alanıdır (Cardoso, Kalinke, et al., 2020; Pal et al., 2021).

Son zamanlardaki çalışmalarda grafen/PLA, CB/PLA, karbon nanofiberler ve grafit/polistiren karışımlarından elde edilen iletken filamentler araştırılmaktadır. Özellikle karbon temelli malzemeler daha yaygın ve çok yönlü iletken yüzeylerdir. Elektrotların, çiplerin, akış hücrelerinin, mili/mikro akışkan platformların üretiminde giderek kullanımları artmaktadır. Bunun yanı sıra karbon bazlı PLA filamentleri çevreci bir seçenek olarak da karşımıza çıkmaktadır (Contreras-Naranjo et al., 2021; Richter et al., 2019).

Karbon siyahı (CB) ; kömür katranı gibi petrol ürünlerinin eksik yanmasıyla meydana gelen parakristal karbon şeklidir. Aktif karbona kıyasla daha düşük yüzey alanı/hacim oranına sahip olsa da yine de yüksek bir yüzey alanı/hacim oranı vardır. Siyah katı bir dış görünüme sahiptir. Karbon siyahı bulunduran ticari filamentler vardır. Elektriksel iletkenlikleri yüksektir, uygun maliyetleri, biyoyoumlu oluşları nedeniyle elektrokimyasal uygulamalarda tercih edilirler.

Örneğin karbon siyahı/PLA iletken filament kullanılarak hazırlanan elektrotlar ile Rocha ve arkadaşları (2020) biyolojik sıvılarda Cd^{+2} ve Pb^{+2} moleküllerinin aynı zamanda tespitini gerçekleştirmişlerdir (Rocha et al., 2020). Bir başka çalışma da göstermiştir ki CB/PLA immüno-algılamada kullanılmak üzere doğal karboksilik gruplar sağlayarak kovalent biyomolekülleri tutturup, basit ve kullanışlı bir platform sağlar (Cardoso, Kalinke, et al., 2020; Martins et al., 2021).

Grafen; sp^2 karbon kristalli, iki boyutlu petek yapısına sahip karbon nanobazlı bir malzemedir. Yüksek yüzey alanı, mekanik mukavemet, elektriksel ve termal açıdan iyi iletkenlik grafenin tercih edilirliliğini arttıran özellikleridir. Elektrokimyasal tespitte sıklıkla kullanılır. Grafen eklenmiş filamentler, FDM tekniği ile elektrot yapımında en çok tercih edilen ve ticari olarak bulunan malzemelerdir. Grafen/PLA filamentleri esnek devre üretiminde, Foster ve arkadaşları (2017) kapasitörler, lityum iyon piller ve su bölme işlemleri dahil olmak üzere birçok uygulama için 3B baskılı elektrotların geliştirilmesinde

kullanıldı (Cardoso, Kalinke, et al., 2020; Foster et al., 2017; H. Kim and Lee, 2020).

Karbon Nanotüp (CNT); 1991 senesinde ilk olarak Iijima tarafından keşfedilen, karbon elementinin allotropudur. Uzunluk/çap oranı genel malzemelere oranla daha büyüktür. Nanotüpler, nano boyutta olmaları, yüksek elektriksel iletkenlik ve termal iletkenlik göstermeleri, esneklikleri ve mekanik özelliklerinin gelişmişliği sebebiyle dokunmatik ekranlarda, enerji depolama sistemlerinde, transistörlerde ve daha birçok sistemde kullanılmaktadırlar. 3B yazıcılarda kullanılmak üzere iletken filamentler oluşturmak içinde mantıklı bir seçenektir ancak henüz CNT kullanılan ticari bir filament bulunmamaktadır (Cardoso, Kalinke, et al., 2020; Popov, 2004).

Bahsedilen karbon bazlı iletken malzemelere ek olarak grafit, karbon nanolifler, nanografitler vb. eklenebilir. Bilinen ve en yaygın ticari filamentler ise Black Magic markasına ait grafen/PLA ve ProtoPasta firmasına ait CB/PLA olup pek çok araştırma grubu, elektrokimyasal uygulamalarda kullanılmak üzere erimiş biriktirme modellemesinde (FDM) 3B yazıcıda parçalar üretmek için bu filamentlere dayalı elektrotlar ve cihazlar kullanır (Gusmão et al., 2019).

İletken hale getirilen filamentler ile FDM tekniğiyle 3B baskı kullanılarak elde edilen ürünler elektrokimyada bambaşka örneklerle karşımıza çıkmaktadır. Bunlar Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. 3B yazıcıda iletken filamentler kullanılarak FDM tekniği ile üretilen elektrokimya kullanılan örnekler

Elektrokimyasal Uygulaması	Kullanılan Filament Çeşidi	Açıklama Hedef	Referans
Biyoetanolda Bakır Tayini	CB/PLA	Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi (SWASV) kullanılarak 3B baskılı elektrot üzerinde bakır tayini gerçekleştirilmiştir.	(João et al., 2020)
Biyolojik Numunelerde Metallerin Elektrokimyasal Tespiti	CB/PLA	Kare dalga anodik sıyırma voltametrisiyle idrar ve tükürük örneklerinde kadmiyum ve kurşun tayini için düşük maliyetli ve hassas bir yöntem	(Rocha et al., 2020)
Elektroanalitik uygulamalar için 3B baskılı hibrit karbon bazlı elektrotların imalatı	Karbon nanotüp/Karbon siyahı/polilaktik asit (CNT/CB/PLA) filament	1,45 μ M algılama sınırıyla dopamini saptamak için 3B baskılı elektrotlar kullanıldı	(Contreras-Naranjo et al., 2021)
Gömülü elektrokimyasal dedektör içeren 3B baskılı mikroakışkan cihaz üretimi	Ana platform: akrilonitril bütadien stiren (ABS) filamenti elektrokimyasal dedektör: CB/PLA filament	Bu sistem doğal sularda nitritin amperometrik olarak algılanması için kullanıldı. Bu türü belirlemek için, hem mTED'lerin hem de 3B baskılı CB/PLA elektrotların kullanımına ilişkin ilk rapordur.	(Carvalho et al., 2021)
Virüs Tespitinde Elektrokimyasal İmmünoşensörlerde 3B	CB/PLA	Hantavirüsü Aurocaria Nükleoprotein (Np) tespitinin ticari iletken	(Martins et al., 2021)

elektrot kullanılması		CB/PLA filamenti kullanarak bir immünosensör yapımı ile gerçekleştirilmesi	
Nitritin elektrokimyasal tespiti için 3B basılmış Minyatürleştirilmiş Cihaz	CB/PLA İletken olmayan PLA	Bu çalışmada, döngüsel voltametri (CV) ve kare dalga voltametri (SWV) nitriti tespit etmek üzere 3 elektrotlu 3B baskılı minyatürleştirilmiş cihaz kullanılmış olup bu cihaz, ticari olarak temin edilebilen filamentlerle FDM 3B yazıcı kullanılarak üretildi. Hücre kısmı iletken olmayan PLA'dan, üçlü elektrotlar ise CB/PLA PLA filamenti kullanılarak basıldı.	(Pal et al., 2021).
Voltametrik ilaç taramasında kullanılmak üzere çoklu sensör uyumlu 3B baskılı elektrokimyasal hücre üretimi	ABS CB/PLA	Çoklu sensör uyumlu 3D baskılı elektrokimyasal hücre üretilip bununla parasetamolün voltametrik tespiti gerçekleştirilip diğer elektrot sistemleriyle kıyaslanmıştır. Doğum kontrol hapında 17a etinilestradiolün belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.	(Ferreira et al., 2021).
Elektrokimyasal algılama sisteminde kullanılmak üzere hibrit	Karbon nanotüp/karbon siyahı/polilaktik	Hibrit bir CNT/CB/PLA filamenti kullanılarak üretilen minyatür tam	(Contreras-Naranjo et al., 2021)

bir filament malzemesi imalatı	asit (CNT/CB/PLA) filament ABS	entegre elektrotların çok yönlülüğünü ve faydasını göstermiş olup iyi bir LOD ile dopamin algılaması gerçekleştirilmiştir.	
Hidrojen peroksit (H_2O_2) tespiti için enzim bazlı bir biyosensör	Grafen/PLA	3B baskılı grafen/PLA elektrodun kullanımıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) tespitinde peroksidaz enzimi kullanılarak doğrudan elektron transferi enzimi tabanlı biyosensör geliştirilmesi	(Mayorga-martinez et al., 2020)
Grafen tabanlı enerji depolama cihazları	Grafen/PLA	Hidrojen evrim reaksiyonu için enerji depolama cihazı ve elektrokatalizör olarak 3B baskı elektrot üretimi	(Foster et al., 2017).
Halka ve disk şeklinde 3B Baskılı elektrot üretimi	Grafen/PLA	Pikrik asit ve Askorbik asidin elektrokimyasal tespiti	(Manzanares Palenzuela et al., 2018).
Biyolojik sıvıların analizinde kullanmak için 3B baskılı grafen-PLA platform hazırlanması	Grafen/PLA	Grafen-PLA yüzeyinde enzimatik glikoz biyosensörü geliştirilip kronoamperometriyle kan plazmasında glikoz algılamasında kullanılması	(Cardoso, Silva, et al., 2020).
Farklı aktivasyon işlemleri ile 3B Grafen/PLA elektrotlarının dopamin tayini	Grafen/PLA	3B PLA-grafen elektrotlarının elektrokimyasal özelliklerinin farklı aktivasyon koşulları altında ve farklı süreçlerle karşılaştırılması ardından	(Kalinke et al., 2020)

		dopaminin algılanması	
CB/PLA kullanılarak 3B baskı ile üç elektrot ve iletken olmayan elektrot tutucudan oluşan elektrokimyasal algılama platformu	CB/PLA iletken olmayan PLA	İşlevsel ve tam entegre bir elektrokimyasal cihazın çift ekstrüzyon kullanılarak üretimi ve kafein, Hg^{+2} ve glikozun elektrokimyasal algılanmasına uygulanabilirliği	(Katseli et al., 2019).
Patlayıcıların örneklenmesi ve tespiti için entegre bir cihaz	Grafen/PLA	2,4,6-Trinitrotoluen (TNT) 3B yazıcı kullanılarak örneklendi ve bir elektrokimyasal hücrede hızlı kare dalga voltametri taramaları yapmak üzere birleştirildi	(Cardoso et al., 2019).

Şu ana kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde 3B baskıda grafen ve karbon siyahı içeren ticari iletken filamentlerin elektrokimya alanında giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı olduğunu görmekteyiz. Elektroanalizde, FDM temelli 3B baskı en çok elektrokimyasal hücrelerin, sensörlerin, elektrotların, akış hücrelerinin, elektrokimyasal akışkan platformların üretimi için kullanılmaktadır. Çoğu çalışma grafen bazlı olsa da CB/PLA giderek yaygınlaşmaktadır çünkü CB/PLA'nın iletkenliği ve elektroanalitik özellikleri bu alan için oldukça geliştirilmeye açıktır. Ticari filamentler içinden Black Magic daha iyi elektrokimyasal performansı sunduğu için daha sık tercih edilmektedir ancak çok daha pahalıdır. Bu yüzden hem iletkenliği, elektroanalitik özellikleri hem de uygun fiyatlı olması nedeniyle karbon/PLA malzemelerinin geliştirilmesi tercih edilmektedir. (Contreras-Naranjo et al., 2021; Ferreira et al., 2021; Martins et al., 2021).

2.3.4 3B baskılı elektrokimyasal biyosensörlerin performansını iyileştirmeye yönelik çalışmalar

FDM 3B baskılı elektrokimyasal sensörlerin kullanıldığı çoğu araştırmada en büyük dezavantaj elektrokimyada aranan temel özellik iletkenlik olmasına rağmen 3B yazıcılarda basılabilirlik için gereken polimer matrislerin bu iletkenliğe erişilebilirliği düşürmesidir. Bu durumu daha azaltmak yani iletkenliği dolayısıyla elektrokimyasal performansı arttırmak için literatürde birbirinden farklı protokoller bulunmaktadır (Rocha et al., 2020). Temel olarak aktivasyon prosedürlerinde kullanılan strateji, iletken olmayan malzemenin elektrot yüzeyinden kısmen çıkarılmasıdır. Mekanik parlatma, farklı çözücüler kullanılarak kimyasal aktivasyon, elektrokimyasal aktivasyon ve bunların sıralı veya eş zamanlı uygulamaları elektrokimyasal performansı geliştirmeye yönelik farklı tekniklerdendir (Cardoso, Kalinke, et al., 2020).

Mekanik parlatma (Mekanik ön işlem) prosedürü için bir öneride 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) tespitinde kullanmak üzere tasarlanan elektrokimyasal platformda kullanılan grafen/PLA filament ile 3B basılmış dikdörtgen parçaları, 1200 kum aşındırıcı kağıtları deiyonize su ile ıslattıktan sonra 30 saniye boyunca yüzeyi parlatmak için kullandılar. Parlatma sonrası yüzeyin PLA matrisindeki grafen nanoşeritlerin açığa çıkması nedeniyle voltametrik yanıtta iyileşme gözlediklerini bildirdiler (Cardoso et al., 2019). Aynı aktivasyon şeklinin yine Cardoso ve arkadaşlarının (2020) idrar ve tükürük örneklerinde diferansiyel puls voltametri ve çoklu puls amperometri teknikleri kullanılarak nitrit ve ürik asit belirlemesi için kullanılan elektrotlara uygulanmasıyla da akım artışı gözlemlendi bildirildi (Cardoso, Silva, et al., 2020). CB/PLA filamentini kullanılarak nitritin algılanması üzerine yapılan başka bir çalışmada ise üretilen elektrotlar saf su varlığında 500 ve 1500 kum zımpara kağıdı ile daha homojen bir yüzey için birer dakika parlatmadan oluşan bir aktivasyon prosedürü denenmiştir. Mekanik parlatma aktivasyon işlemi ardından genellikle kimyasal veya elektrokimyasal aktivasyon işlemi de gelmekte ve bunlar bir bütün olarak değerlendirilmektedir (Carvalho et al., 2021).

Literatürde kimyasal aktivasyon için kullanılmak üzere farklı kimyasallar değerlendirilmiştir. Palenzuela ve arkadaşları (2018), halka ve disk şeklindeki elektrotları grafen/PLA filamentini kullanarak 3B bastıktan sonra aktivasyon için DMF çözeltisini kullanmışlardır. DMF kullanılarak aktivasyonu gerçekleştiren elektrotların elektroaktifliğinde artış olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda DMF içinde farklı bekletme sürelerini denemişlerdir ve 10 dakikalık sürenin ideal olduğunu göstermişlerdir (Manzanares Palenzuela et al., 2018).

Kalinke ve arkadaşları (2020), 3B baskılı grafen/PLA elektrotlar kullanarak yaptıkları çalışmada ise birden fazla aktivasyon yöntemi kıyaslanmıştır. İlk olarak 0.30 μm 'lik alümina süspansiyonuyla 1, 3, 5 ve 10 dakikalık cilalama süreleri değerlendirilmiştir. Kimyasal aktivasyon kısmında ise elektrotlar bazik ve asidik çözücüler içinde farklı daldırma sürelerinde bekletilmiştir. Bu süreler 30, 60 ve 180 dakika olup, çözücüler ise DMF, 1 mol/L Sodyum Hidroksit (NaOH), 7,9 mmol/L Nitrik Asit (HNO_3), 0,5 mol/L H_2SO_4 'tür. DMF ve NaOH çözeltileri arasındaki temel fark DMF PLA'yı çözünme ile uzaklaştırırken, NaOH ise PLA'yı hidroliz etmektedir. NaOH ile aktive edilen elektrotun, aktivasyonsuz ve DMF ile aktive edilen elektrota göre daha gelişmiş elektrokimyasal tepkiler vermesi artan elektroaktif alan ile açıklanmıştır. En iyi sonuçların 1.0 mol/L NaOH içine 30 dakika daldırma ile elde edildiği belirtilmiştir (Kalinke et al., 2020).

Yine DMF aktivasyon yönteminin araştırıldığı bir diğer araştırma ise Pal ve arkadaşları (2021), tarafından yapılmış olup DMF, karbon siyahı/polilaktik asit (PLA) filamentini kullanılarak üretilen 3B baskılı elektrokimyasal nitrit sensörünün aktivasyonunda kullanılmıştır. 5 mM potasyum ferrisiyanide elektrokimyasal tepkiler, hem DMF ile muamele edilmiş hem de muamele edilmemiş cihazda değerlendirilmiş ve 10 dakika DMF ile muamele edilen elektrotların, yüzey modifikasyonları sayesinde modifiye edilmemiş elektrotlara oranla daha yüksek akım değerleri ve daha iyi sinyaller verdiği bildirilmiştir (Pal et al., 2021).

Gusmao ve arkadaşlarının (2019) yapmış olduğu grafen/PLA ile üretilen elektrotların aktivasyonu üzerine olan çalışmada ise kimyasal aktivasyonu gerçekleştirmek üzere polar aprotik çözücüler (DMF ve aseton) ve polar protik

çözücüler (EtOH, MeOH, ve H₂O) kullanılmıştır. Benzer bir elektrokimyasal performansı elde etmek DMF'den daha az zararlı çözücüler kullanılarak aktivasyonun gerçekleştirilmesi amacıyla araştırmalarda bulunmuşlardır. Uygulanan prosedürde elektrotlar farklı çözücülerini içeren cam şişelere konulup 7 dakikalık sonikasyona tabii tutulmuşlardır. Elektrotların hem ağırlık kayıpları hem de elektrokimyasal performans derecelerinin belirlenmesi neticesinde 3B baskılı elektrotların özelliklerinin, aktivasyon için kullanılan çözücüye bağlı olarak farklılık gösterdiğini ve polar aprotik çözücülerin (DMF ve aseton), polar protik çözücülere (DI su, metanol ve etanol) göre daha iyi aktivasyon yeteneklerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Aktivasyon için en iyi polar aprotik çözücünün seçiminde önemli olanın son uygulama olduğunu ancak gelecekteki çalışmalarda, daha az zararlı olduğu için ve yine de güçlü aktivasyon özelliğine sahip olması nedeniyle DMF yerine aseton kullanımını önermişlerdir (Gusmão et al., 2019).

Daha da doğa dostu bir yöntem olarak ortaya çıkan askorbik asit ve sodyum borohidrit (NaBH₄) ile aktivasyon ise Redondo ve arkadaşlarının (2021) yaptıkları çalışmalar sonucunda 3B karbon baskıların şeklini ve yapısını korurken elektriksel olarak aktif cihazlar elde etmek için etkili kimyasallar olduğunu da göstermişlerdir. NaBH₄ 0.1 M ve 1.0 M olmak üzere iki farklı konsantrasyonda hazırlanarak test edilmiş olup buna ek olarak aktivasyon süreleri de 30 dakika ve 24 saat olmak üzere test edilmiştir. Sonuçların DMF ile yapılan aktivasyon çalışmalarına oldukça yakın olduğu bildirilmiştir. Hidrazin denemelerinde ise önemli bir elektrokimyasal ilerleme elde edilemediği, LiAlH₄'le muamele edilen elektrotların ise mekanik özelliklerini kaybettikleri bildirildi. Buna alüminyum hidrit çözeltisini hazırlamak üzere kullanılan organik çözücü tetrahidrofuran (THF)'in PLA'nın yapısını tamamen bozmasıyla açıklanabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada daha çevre dostu bir aktivasyon yöntemi olan NaBH₄ ile 3B baskılı elektrot geliştirilmesi önerilmiştir (Redondo et al., 2021).

Aktivasyon yöntemlerinin ayrı ayrı denendiği çalışmalar olsada literatürde bildirilen çoğu çalışma aktivasyon yöntemlerinin farklı kombinasyonlarını içermektedir.

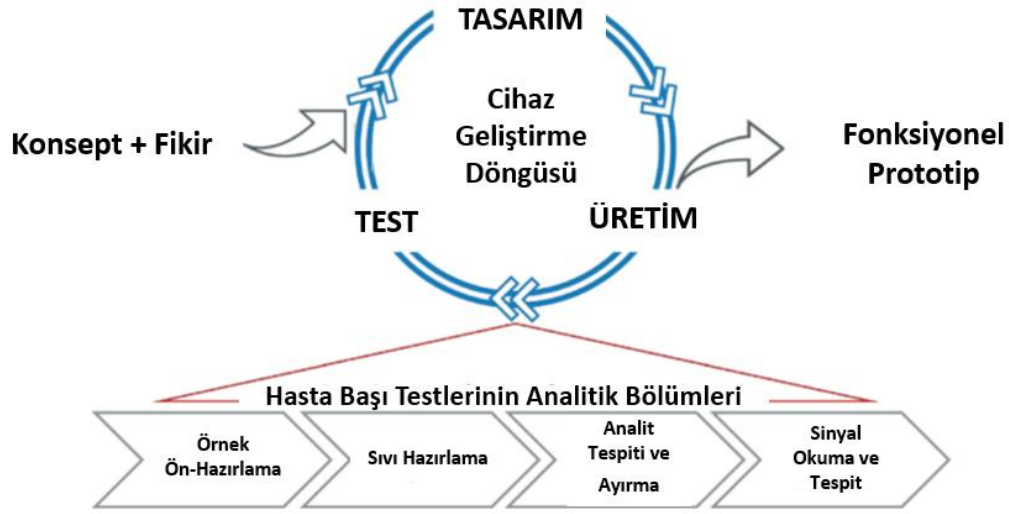
Richter ve arkadaşları (2019), CB/PLA filamenti kullanarak yaptıkları bir elektrokimyasal algılama platformunda kullanılan elektrotların çalışma performansı, homojen bir yüzey elde edene kadar ultra saf su varlığında 600 kum ve 1200 kum zımpara kağıtları kullanılarak mekanik (cilalama) aktivasyonu ve ardından 0,5 mol/L NaOH çözeltisinde +1,4 V/ 200 s ve -1,0 V /200 s elektrokimyasal aktivasyon prosedüründen sonra değerlendirilmiştir. Bu aktivasyon işlemlerinden sonra dopamin, hekzaaminrutenyum(III) klorür, ferrisiyanür/ferrosiyanür, ürik asit ve askorbik asit gibi analitlerin elektrokimyasal davranışlarında (akım yoğunluğu ve voltametrik profil) önemli bir ilerleme sağlandığını bildirmişlerdir (Richter et al., 2019). Carvalho ve arkadaşları da (2021) yine aynı aktivasyon yöntemini (0,5 mol/L NaOH çözeltisinde +1,4 V/ 200 s ve -1,0 V /200 s) kullanarak CB/PLA filamentinin 3B baskısı ile üretmiş oldukları gömülü bir elektrokimyasal dedektöre sahip, iplik tabanlı mikroakışkan cihaz geliştirmişlerdir (Carvalho et al., 2021).

Vaneckova ve arkadaşları (2020), 0,3 M sodyum sülfat (Na_2SO_4) çözeltisi içerisinde 0 ile 60 saniye arasında değişen bir süre boyunca 0 ile 25 V aralığındaki bir değerde sabit voltaj uygulayarak aktivasyon gerçekleştirmişlerdir (Vaněčková et al., 2020).

Martins ve arkadaşlarının (2021) önerdiği aktivasyon yöntemi ise CB/PLA filamenti kullanılarak hazırlanan elektrotların ilk olarak zımpara kağıdı ile yüzeylerin pürüzsüzleştirilmesi ve ardından 100 mV/s'de -1,2 V'dan +1,2 V'a 0,5 mol/L NaOH çözeltisi içinde CV uygulanmasıdır (Martins et al., 2021).

Bu tez kapsamında önerilen bazı aktivasyon yöntemleri denenmiş olup, elektrokimyasal algılaması gerçekleştirilecek olan maddeye göre en uygun olan aktivasyon yöntemi seçilmiştir.

2.4 Hasta Başı Teşhis Sistemleri (Point of Care System)



Şekil 2.22. Point of Care Test üretim aşaması (Chan et al., 2017).

Bakım noktası teşhis testleri sağlık sisteminde oldukça önemli bir yeri olan, hastalık takibi ve teşhisinde etkin rol oynayan, hızlı yanıt süresine sahip, uygun maliyetli, kolay kullanılabilir ve sağlık sisteminin vazgeçilmezi olan bir parçadır. Sadece hastane ortamına ait gibi düşünülmemelidirler, klinik alanın tümünde etkin rolleri vardır. Ev, eczane, acil bakım merkezleri, tıbbi araçlar, ameliyathane gibi birçok noktada kullanım alanları olup temel hedefi hızlı sonuçlar ile zamanında tedaviyi gerçekleştirmek, bulaşıcı hastalıkların erkenden fark edilmesini ve kontrol altında tutulmasını sağlamaktır. Bunun içinde taşınabilir, tekrar kullanılabilir, daha minyatürleştirilmiş, kullanırken özel eğitilmiş bir personel gerektirmeyen POC sistemleri elde etmek için çalışmalar sürmektedir. Günümüzde el tipi ve masa üstü olmak üzere iki farklı çeşidi mevcuttur. **Hasta Başı Teşhis Testleri (PoCT)** analitik testler olup amaç hastaya daha da yakın olmaktadır. Evde kullanılan hastanın kendisini takip ettiği PoCT arasında glikoz şeritleri bulunmaktadır, bu en eski uygulamalarından birisidir. Hasta başı teşhis sistemlerinde günümüzde özellikle **yanal akış immunoassay (kağıt bazlı) ve elektrot teknolojileri** oldukça yaygınlaşan bir araştırma alanı haline gelmiştir. Nanomalzemelerle birleşimi sağlanabilen bu teknolojiler ile biyosensörlerin

geliştirilmesi de mümkündür (Kozel and Burnham-marusich, 2017; St John, 2010; Syedmoradi et al., 2017).

2.4.1 Kağıt tabanlı mikroakışkan sistemler

Kağıt, hammaddesi selüloz lifi olan kendiliğinden hidrofilik bir maddedir. Sıvının içine alınmasına izin verir, kılcal hareketler ile de ilerlemesine imkan sunar. Kağıdın bu özelliği mikroakışkan cihazlar için onu öne çıkarmıştır. 1990'lı senelerin başında, küçültülebilirlikleri, kolay kullanılmaları, maliyetsel uygunlukları nedeniyle mikroakışkan cihazlar hasta başı teşhis sistemlerinde (POC) de iyi bir alternatif haline gelmişlerdir (Adkins et al., 2015; Cate et al., 2015; Li et al., 2010).

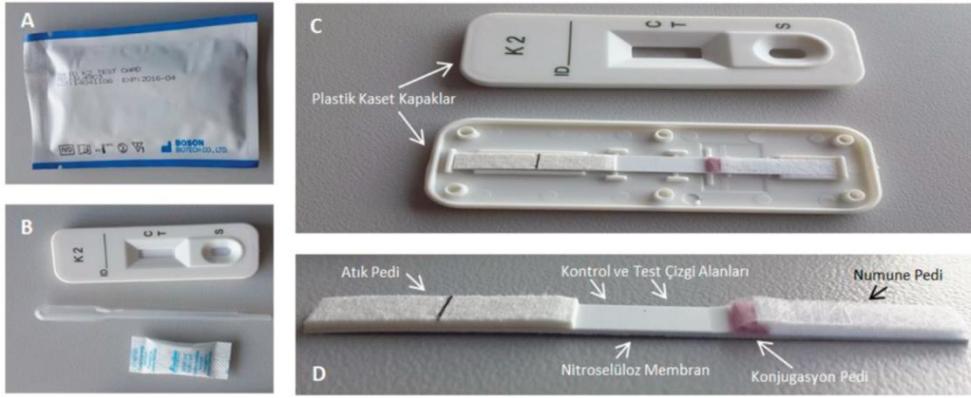
2.4.1.1 Yanal akış immünoassay (Lateral Flow)

Kanımızdaki proteinler dahil olmak üzere bakteriyel veya viral patojenlere kadar çeşitli bir analit grubunu tespit etmekte kullanılan bir yöntemdir. Bakım noktası testlerinde gerekli olan hastalık biyobelirtecini tespitinde de yararlanılabilecek verimli yöntemler arasında yerini almıştır (D. S. Kim et al., 2016).

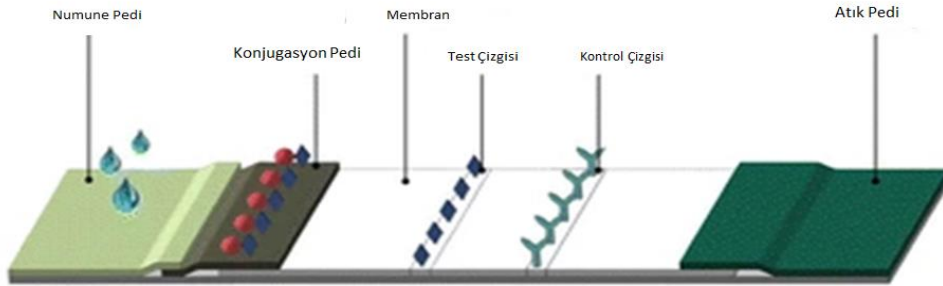
Bir yanal akış cihazı, kromatografi yani reaksiyonun gerçekleştiği membranda ilerleyen karışımın, ilerledikçe bileşenlerin hareketlerin farklılıklarından kaynaklanarak ayrılmaları işlemi ile immunokimyasal reaksiyonlardan oluşmaktadır. Biyosensör olarak tanımlamak gerekirse ise membranda tespit bölgelerinde spesifik tanıma elemanları yani biyoalgılayıcılar bulunmaktadır. Bu spesifik elemanlar çoğunlukla antikorlardır ancak aptamer-analit ve DNA-DNA (veya mikroRNA) olarak işlev görenler de vardır. Sinyal, membranda numune-antikor-prob reaksiyonu sonucunda üretilmektedir. Numunenin membran boyunca ilerlemesini ise kapilerite sağlamaktadır. Bu cihazların bir diğer adı immünokromatografik test ya da şerit testidir. Düşük algılama sınırı, yüksek hassasiyet, az miktarda numune hacmi gerektirmesi, hızlı sonuç verme gibi özellikleri nedeniyle kanser belirteçleri, ağır metal tespiti, mikroorganizma toksinleri gibi oldukça çeşitli moleküllerin tespitinde yıllardır yer

almaktadırlar. İdrarda insan koronik gonadotropini (hCG) tespiti için yanal akış testi 1976 senesinde yapılmış olup günümüzde bu testlere örnek olarak aklımıza ilk hCG beta testlerinin geliştirilmesiyle gebelik testleri gelmektedir (Anfossi et al., 2018; Bahadır and Sezgintürk, 2016).

Bir yanal akış testinde bulunan bölümler sırayla şu şekildedir; Plastik taban ve kaset kapak (destek kartı), numune pedi, reaksiyon pedi, nitroselüloz membran, test ve kontrol çizgisi, atık pedi (Quesada-González and Merkoçi, 2015).



Şekil 2.23. Yanal akış testi genel görünümü (Küçükguven ve Yılmaz, 2014).



Şekil 2.24. Yanal akış testinin iç yapısı (Liu et al., 2018).

2.4.2 3B yazıcı teknolojisinin hasta başı teşhis sistemlerinde kullanımı

3B baskı teknolojisi, katmanlı üretim ile dijital olarak planlanan bir modelin fiziksel nesne haline getirildiği bir yöntemdir. Kullanım alanları endüstriden,

tarıma, gıdadan, mühendisliğe birçok alana yayılmış olmakla beraber klinikteki yeri her geçen gün gelişmekte ve büyümektedir. Tıpta son zamanlarda PoCT cihazların geliştirilmesi üzerine de oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. PoCT ile temel olarak hedeflenen durum, bu cihazların laboratuvar ya da hastane ortamından ev gibi daha günlük alanlarda kullanım alanını sağlayabilmektir. Bu da akademiden başlayan ve zamanla prototiplerin pazara sunulmasıyla devam eden bir süreçtir (Beitler et al., 2022).

POC cihazları Bölüm 2.4’de bahsedildiği gibi mikroakışkan alanında geliştirilmeye devam edilmekte olup 3B baskı teknolojisinin avantajlarıyla bir araya gelince oldukça çok yönlü bir alan ortaya çıkmaktadır (Chan et al., 2017). Bu avantajlar arasında;

- Hızlı tasarım doğrulama; bir prototipin üretilmesi tasarımın ilk aşaması olup verimli bir prototip üretilmezse önceden belirlenmiş işlevleri yerine getiremez. Verimli bir prototip araştırmaların genel etkinliğini belirlemektedir. Geleneksel üretim süreçleri cihaz başına yüksek maliyet gerektirirken 3B baskı teknolojisi kullanılarak üretilen prototipler basit, kolay, hızlı ve tekrarlanabilir üretim sunması ile araştırma ve geliştirme çalışmalarında önemli bir yerdedir.
- Ekipman maliyeti uygunluğu; 3B yazıcıların kullanım oranı arttıkça ticari yazıcı maliyetleri de önemli oranda düşüş göstermiştir. FDM ile PoCT araştırmaları için daha uygun maliyetli üretim ve az miktarda hafif tasarım çeşitleri gibi özelliklere sahip birçok tekrarlanılabilir prototip üretimi sağlanabilir.
- Yinelemeli prototipleme yeteneği; Bir prototip üretiminde maliyete ek olarak harcanan zaman ve verilen emekte önemlidir. 3B yazıcılarda prototip üretiminde diğer yöntemlerin aksine yalnızca tasarımın temel boyut ayrıntılarının bir CAD dosyası haline getirilmesi ve temel mekanizmanın bilinmesi yeterlidir. Bu hem zamandan hem de emekten tasarruf sağlar. Prototipin tasarımında değişiklik yapılmak istendiğinde ise bu bilgisayar destekli tasarım programları kullanılarak kolayca yapılabilir.

- Farklı geometrik şekillerde üretime olanak sağlaması: örneğin biyoanalitik uygulamalarda, 3B baskılı dikey yapılar kolorimetrik algılamanın hassasiyetini artırma işlevi görebilirken 3B baskılı sarmal yapılar bakteri türlerinin izolasyonu ve yakalanması için kullanılabilir. Klinik kullanımda çeşitli arabirimler 3B baskı yoluyla cihaza kolayca yerleştirilebilir, bu da cihazın mevcut tıbbi ekipmanla (ör. şırınga) entegrasyonu için gereken bağlantı adımlarını basitleştirir (Chan et al., 2017).

Bahsedilen özelliklerin yanı sıra geleneksel laboratuvar temelli tekniklere göre mikroakışkan tabanlı teşhis teknolojileri azaltılmış numune ve reaktif tüketimi, otomatik işleme adımları, uygun maliyetli cihaz üretimi ve geliştirilmiş analitik performans sağlar. Bu tür özellikler, Dünya Sağlık Örgütü tarafından bakım noktası cihazları (POC) geliştirmek için olması gereken özellikler olan uygun fiyat, hassasiyet, spesifiklik, kullanıcı dostu kullanım, hızlilik, ekipman ve özel personel gerektirmeyen cihaz kriterlerine uygundur (Chan et al., 2017).

2.4.3 Hasta başı teşhis sistemlerinin çeşitleri

Hasta başı teşhis sistemleri tespit edilecek maddeye göre ve tespit süresine göre çeşitlilik göstermektedir.

- **Çip üstü laboratuvar teknolojisi (Lab on Chip) (LOC)**
- **Etiket Tabanlı (Labeled)**
- **Etiketsiz (Label Free)**

2.4.3.1 Çip üstü labovatuvar teknolojisi (Lab on Chip) (LOC)

Nükleik asitler başta olmak üzere farklı moleküllerin analizini sağlayan, klinik teşhiste önemli bir yeri olan, minyatürleştirilmiş, bir çip üzerine entegre edilen cihazlardır. Mikroakışkan teknolojisinden faydalanır. İçerisinde çok sayıda gömülü mikro kanal bulunan bu cihazlar çok az bir numuneden bile birçok reaksiyon oluşumuna imkan sunmaktadırlar. Moleküler biyoloji alanında hızlı PCR olanağı sunarak, genom diziliminin daha hızlı gerçekleşmesini sağlayan bir

dizi DNA içerir. Hücre biyolojisinde ise birden fazla hücreyi kontrol edip, içlerinden belirtilen tek bir hücreyi algılayarak izole edebilir. Çip üstü laboratuvar teknolojisi özellikle erken tanı teşhislerinde de rol almaktadır. Örneğin küçük hücreli akciğer kanserlerinin tayinleri, LOC teknolojisi ile yapılmış olup tayin edilen bu kanser ELISA ile ortaya çıkmıştır (Patel et al., 2016; Pirzada and Altintas, 2019). LOC, uygun maliyeti, duyarlılığı, hızlı test süresi, kullanım kolaylığı, kompaktlığı nedeniyle taşıma kolaylığı, düşük hacimli numuneler ve gerçek zamanlı izleme gibi özellikleri nedeniyle oldukça avantajlı bir teknolojidir (Patel et al., 2016).

2.4.3.2 Etiket tabanlı algılama (Labeled)

Biyolojik hedeflerin seçici olarak etiketlenmesine dayanır (Muluneh and Issadore, 2014). Etiketli hasta başı teşhis sistemlerine ELISA (enzime bağlı immunosorbent test) örnek verilebilir. ELISA, bir numunedeki bir antikorun veya bir antijenin varlığını tespit etmek için bir enzimi (biyokimyasal reaksiyonu katalize eden bir protein) içeren immünolojik bir tekniktir. ELISA, biri antijene özgü ve diğeri bir enzime bağlı olan iki antikor kullanır ve ikinci antikor, substratın bir sinyal üretmesine neden olur. Bazen bu ikinci antikor, birincil antikor biyotin etiketliyse, avidin veya streptavidin gibi bir proteine bağlanabilir. ELISA testleri kalitatif veya kantitatif olabilir. Niteliksel sonuçlar, bir numune için basit bir pozitif veya negatif sonuç sağlar. ELISA hasta başı teşhis testlerinde cihazların küçültülmesi ve basit yöntemlerle uygulanması durumunda oldukça önem taşır. Entegre ELISA-LOC cihazları kolay kullanım, yüksek hassasiyet, uygun maliyet gibi avantajlarla önemli bir potansiyele sahiptir (Asensio et al., 2008; Durusöz, 2019).

2.4.3.3 Etiketsiz algılama (Label Free)

Moleküler etkileşimlerin etiket kullanılmadan tespitine dayanır. Etiket kullanmadan moleküler etkileşimlerin anlaşılması durumunda moleküllerin doğal davranışlarının yansıtılması olasılığı daha yüksek olup ilaç tespitinde bu algılama yöntemi kullanılabilir. Son yıllarda, küçük moleküller, metal iyonları,

nükleik asitler ve proteinler için bir dizi etiketsiz algılama metodolojileri geliştirilmiştir (Ma et al., 2013). Yüzey plazmon rezonansı etiketsiz algılama ile çalışan bir teknik olup plazmon kayması değerlendirilerek gerçekleştirilir. Kolorimetrik biyosensörler, düşük maliyetleri, hareket kabiliyetleri, hızlı tepkileri ve etiketsiz olmaları nedeniyle ilgi gören bir biyosensör çeşididir (Qian et al., 2019).

2.4.4 3B baskı teknoloji hasta başı teşhis cihazlarında elektrokimyasal metotlar

PoCT’de 3B baskı uygulamaların elektrokimyasal metotlar ile desteklendiği uygulamalar her geçen gün artmaktadır. Empedans, potansiyometri, alan etkili geçişlilik ve piezoelektrik gibi diğer teknikler kullanılmış olsada, araştırmalar daha çok olarak amperometri ya da voltametri metotlarına odaklanır. Bu entegre cihazların görüntü analiz cihazlarına ihtiyaç duymadan yüksek düzeyde nicel veriler, parçaların minyatürleştirilmesi kolaylığı ve çevre koşullarından göreceli bağımsızlığı önemlerini git gide arttırmaktadır. Bu amaçla, elektrikli bileşenlerle başarılı bir şekilde entegre edilebilen 3B baskılı mikroakışkan çipler ve araçlar tasarlamaya yönelik araştırmalar birçok pratik klinik uygulama için önem arz etmektedir (Chan et al., 2017).

Literatüre bakıldığında bu entegre cihazlara örnek olarak Hong ve arkadaşları (2016) tarafından bildirilen Cd(II) ve Pb(II) gibi ağır metal iyonlarının çevresel analizi için esnek bir mikroakışkan elektrokimyasal sensörün 3B üretimi gerçekleştirilmiştir. Mn_2O_3 ile modifiye edilmiş ekran baskılı elektrotlar kullanarak elektrotlar ile entegre bir cihaz üretmişlerdir (Hong et al., 2016). Ayrıca araştırma laboratuvarları, optik okuma testleri gerçekleştirmek için tüketici sınıfı elektroniklere yönelerek kan şekeri ölçüm cihazları ve dijital multimetreler gibi taşınabilir cihazların yanı sıra akıllı telefonlar kullanılarak okunabilen elektrokimyasal testler geliştirmişlerdir. Örneğin, Hall'un laboratuvarında, ses jakı aracılığıyla bir cep telefonu ile tek kullanımlık ekran baskılı elektrotlarla yerleştirilebilen 3B baskılı bir kasaya yerleştirilmiş ucuz, düşük güçlü bir potansiyostat modülü geliştirilmiş olup döngüsel voltametri ölçümleri yapıldı.

Sonuçlar, bir akciğer enfeksiyonu biyobelirteçlerinin fizyolojik seviyelerini izlemek için akıllı telefonda analiz edildi. Böyle taşınabilir ve kullanıcı dostu bir sistem, potansiyel olarak kistik fibroz hastaları üzerindeki tedavi yükünü azaltmak için uygulanabilir (Sun et al., 2016). 3B baskı teknolojisi ek olarak tasarımda özelleştirilebilir parçaların üretilmesinde esnekliği sayesinde elektrotların ve işlevsel olarak iletken elemanların üretiminde rol alır. Buna örnek olarak, sarmal şekilli paslanmaz çelik elektrotlar üretmek için 3B metal baskı kullanan Loo ve arkadaşları (2017) altın-elektrolizle kaplanmış ve DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tespiti için transdüksiyon platformu hazırlamışlardır (Loo et al., 2017).

Araştırmalar 3B basılmış biyoenjeksiyon arayüzlerinin gelecekte PoCT elektrokimyasal tahlillerinin üretiminde büyük bir rol oynayacağını göstermektedir. Elektrokimya tabanlı 3B baskılı cihazların geliştirilmesi doğrultusunda yapılan çalışmalar, DNA tabanlı biyosensörler ve elektroanalitik teknolojileri içerebilecek daha gelişmiş cihazlar için umut vaat etmektedir. 3B baskılı elektrotların mikroakışkan çiplere yerleştirilebilir olması ile akıllı telefon dışındaki kan şekeri ölçüm cihazları ve dijital multimetreler gibi alternatif tüketici elektroniği cihazlarının giderek gelişeceği öngörülmektedir (Chan et al., 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Gereçler

3.1.1 Kullanılan cihazlar ve programlar

- 3 Boyutlu Yazıcı
- Potansiyostat (μ -Autolab Type III)
- Nova 1.10 Yazılımı
- pH Metre
- Hassas Terazî
- Manyetik Karıştırıcı
- Sterilizatör
- Vortex Karıştırıcı
- Sonikatör
- Water Purification Sistem
- SolidWorks (Katı Modelleme Programı)
- Ultimaker Cura 4.1

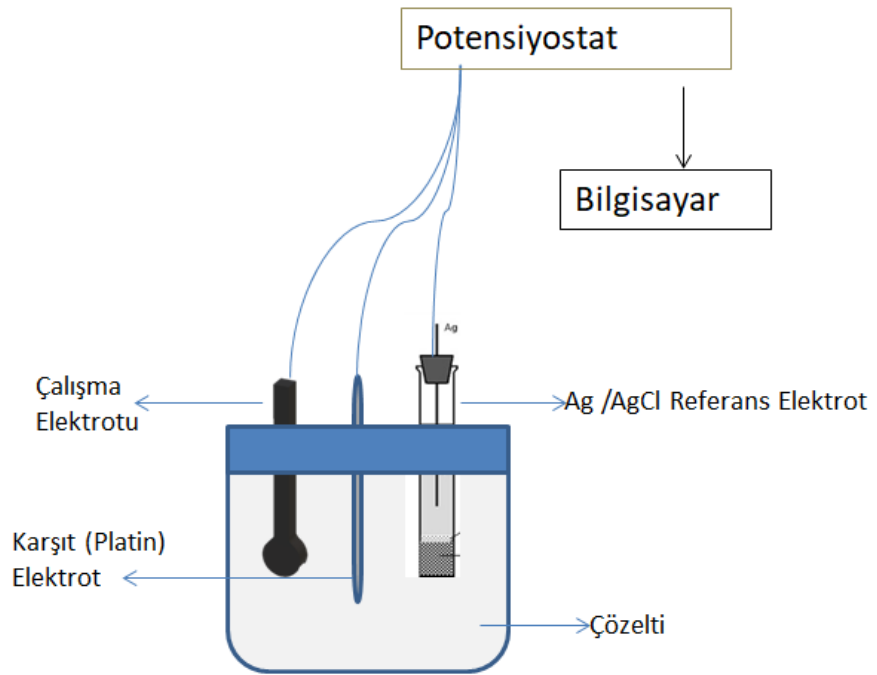
3.1.1.1 Kullanılan 3 boyutlu yazıcı

Bu tez kapsamında kullanılacak elektrotlar 3 Boyutlu yazıcı ile basılmıştır. Kullanılan bu yazıcı FDM (erimiş biriktirme modellemesi) modelleme teknolojisi ile çalışmaktadır. Bilgisayar destekli tasarım (CAD) yazılımı aracılığıyla tasarlanan elektrotların sanal bir görüntüsü oluşturulduktan sonra, 3 boyutlu görüntüyü ilk nesnenin sıralı 2 boyutlu katmanlarına dönüştüren ve bir G kodu dosyası oluşturan, 3B yazıcının yazılımıyla uyumlu bir ‘.STL’ dosyasına dönüştürülür. Bu noktadan itibaren, 3B yazıcı 3B nesneyi katman katman malzeme biriktirme yoluyla oluşturabilir. Yazıcının nesneyi yani bu tezde kullanılan elektrotları oluşturabilmesi için hammadde olan filament gerekmektedir. Bu tez kapsamında karbon siyahı/PLA (CB/PLA) kullanılarak elektrokimyasal biyosensör uygulamaları için elektrot tasarımı ve basımı gerçekleştirilmiştir. Elektrotların basımı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma

Projeleri kapsamında alınan Creality Ender 3 V2 3B Yazıcı ve ProtoPasta Elektrik İletken Kompozit PLA 1.75 mm 3B Yazıcı Filamenti ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.2 Kullanılan elektrokimyasal sistem

Tez kapsamındaki ölçümler üçlü elektrot sistemiyle yapılmıştır. Bu sistem; çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrottan oluşmaktadır. Referans elektrot olarak gümüş klorür içerisinde gümüş tel (Ag/AgCl), karşıt elektrot (yardımcı elektrot) olarak platin (Pt) tel kullanılmıştır. Çalışma elektrotu ise 3 boyutlu baskı teknolojisi ile hazırladığımız karbon siyahı/PLA elektrotlardır (3DcbE). Tasarlanan elektrotun özelliklerini karşılaştırmak amacıyla ek olarak 3 cm boyutunda kesilen Tombo marka HB 0.5 mm kalem grafit elektrotlar (PGE) ve DRP-110-U75 Screen Printed Elektrotlar (SPEs) da kullanılmıştır. 5 mL hacimli tampon çözeltisinin içine daldırılan üçlü elektrot sistemiyle ölçümler alınmıştır.



Şekil 3.1. Üçlü elektrot sistemi

3.1.2 Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan sodyum hidroksit (NaOH), Sodyum Borhidrür (NaBH_4), Sodyum Sülfat (Na_2SO_4) AFG Bioscience (Illinois, Amerika Birleşik Devletleri), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), N-hidroksisüksinimit (NHS) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), glasiyel asetik asit (CH_3COOH), N,N-Dimetilformamid (DMF), Nitrik Asit (HNO_3) Carlo Erba (Val-de-Reuil, Fransa), 1-etil-3-(3-dimetilamino)propil karbodimithidroklorid (EDC) Acros Organics (Geel, Belçika), Hidroklorik Asit (HCl) Chem Lab (Zedelgem, Belçika), Aseton Honeywell (Türkiye), Sülfürik Asit (H_2SO_4) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), dsDNA (DNA from fish sperm pure) Serva firmalarından temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Kullanılacak çözeltiler taze hazırlanmıştır. Hazırlanırken ultra saf su kullanılmıştır. Kullanılmış olan ultra saf su $18.2 \text{ M}\Omega$ iletkenliktedir. Tampon çözeltiler $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. pH ayarlamaları 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl ilave edilerek yapılmıştır. Deneyler oda sıcaklığında ($25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$) gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan çözeltiler ve içerikleri

ÇÖZELTİ ADI	İÇERİĞİ
0.50 M Asetat Tampon Çözeltisi (ACB) (pH: 4.8)	0.5 M Glasiyel Asetik Asit ile 20 mM NaCl ultra saf suyla hazırlanmıştır.
50 mM Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (pH: 7.4)	10 mM KH_2PO_4 , 40 mM K_2HPO_4 ve 20 mM NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
Trizma-HCl Tampon Çözeltisi (TBS) (pH: 7.00)	20 mM Trizma-HCl, ile 20 mM NaCl çözeltisi pH:7.0 olacak şekilde hazırlanmıştır.

Kovalent Bağlama Tamponu	8 mM N-hidroksi süksinimit (NHS) ve 5 mM Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC), 50 mL distile su ile hazırlanmıştır.
Empedans Ölçüm Çözeltisi	5 mM Fe [(CN) ₆] ^{-3/4} çözeltisi 10 mM TBS ile hazırlanmıştır.
Elektrot Aktivasyon Çözeltileri	1. 0,5 M NaOH 2. 7,9 mM HNO₃ 3. 0,5 M H₂SO₄ 4. 0,3 M Na₂SO₄
Ölçüm Çözeltisi	1 mM Fe [(CN) ₆] ^{-3/4} çözeltisi 10 mM Tris-HCl Tampon Çözeltisi (TBS) içinde hazırlanmıştır
Hibridizasyon Tamponu (5xSSC+ %0.05 SDS) pH=7.0	0.075 M Tri-Sodyum Sitrat Dihidrat ile 0.75 M NaCl hazırlanan çözeltisi pH: 7.0 olacak şekilde hazırlanmıştır.
Yıkama Tamponu (1xSSC+ %0.1 SDS) pH=7.0	0.015 M Tri-Sodyum Sitrat Dihidrat ile 0.15 M NaCl hazırlanan çözeltisi pH:7.0 olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.3 Kullanılan DNA dizileri

Aşağıdaki çizelgede tez kapsamında kullanılmış olan DNA molekülleri ve bu DNA moleküllerine ait baz dizilimleri verilmektedir. Çalışmada, DNA tayininde balık sperminden elde edilmiş çift sarmal DNA (dsDNA), hibridizasyon tayininde ait prob ve hedef dizi ile tüm bazları hedeften farklı Non-spesifik bir hedef dizi kullanılmıştır.

Tablo 3.2 Deney aşamasında kullanılan dizilerin baz dizilimleri

DNA Dizisi	DNA'nın Baz Dizilimi
<i>Prob Dizi (İnozin Modifiyeli)</i>	5'-Aminohekzil-CICTAAITICTCTIIAIAIIT-3'
<i>Hedef Dizi</i>	5'-ACCTCTCCAGAGCACTTAGCG
<i>Spesifik Olmayan Hedef</i>	5'-TGGTGCCATAGTCACCGCTGCC-3'

dsDNA Çözelti Hazırlanışı (pH=4.8)

dsDNA analizinde kullanılmak üzere stok çift iplikli yapıya sahip balık sperm çözeltisi ilk olarak 1000xg'de 8 dakika santrifüjlenmiş 18.2 MΩ iletkenliğe sahip olan ultra saf su içerisinde 25°C oda sıcaklığında 1000 ppm (1000 µg/mL) olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan stok dsDNA çözeltisi daha sonra -20°C'de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere istenen derişimlerde dsDNA çözeltileri, stok çözeltinin 0.50 M asetat tampon çözeltisi (ACB) ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Hibridizasyon Tayininde Kullanılan Prob ve Hedef Dizilerinin Hazırlanışı

Her 2 dizi de 21 baz uzunluğunda olup 5 ppm derişiminde olacak şekilde prob dizi ACB tamponunda (pH= 4.8) hedef dizi ise hibridizasyon tamponunda oda sıcaklığında hazırlanmıştır.

3.2 Kullanılan Yöntemler

Çalışmalarımızın ilk basamağında elektrokimyasal ölçümlerde çalışma elektrodu olarak kullanılabilecek, CB/PLA yapısında elektrotlar 3D baskı tekniği ile hazırlanmış ve elektrot vazifesi görme potansiyelleri araştırılmıştır. Tasarlanan bu elektrotların en iyi elektrokimyasal performansını saptamak amacıyla mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal uygulamalar olmak üzere farklı yüzey aktivasyon yöntemleri uygulanarak optimizasyonları saptanmıştır. Bu çalışmalarda 1mM Fe $[(CN)_6]^{-3/4}$ çözeltisindeki elektrokimyasal (voltametrik) davranışları esas alınmıştır.

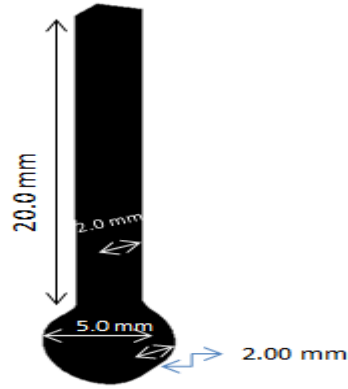
En uygun baskı koşulları ve aktivasyon uygulamasının belirlenmesinin ardından çalışmamızın ikinci basamağında tasarlanan bu elektrotların biyosensörlerde uygulanabilirliği araştırılmıştır. Buna yönelik olarak ilk önce bu elektrotların DNA molekülünü elektrokimyasal olarak görüntülenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Balık sperminden elde edilen dsDNA molekülünün elektrot yüzeyinde ve çözelti içinde olmak üzere +1.0V'da guanin elektrokimyasal sinyali voltametrik olarak ölçüme tabi tutulmuştur. Derişim, bağlanma koşulları (adsorbsiyon, kovalent..) gibi parametrelerin optimizasyonları gerçekleştirilmesinin ardından kısa oligonükleotit dizileri kullanılarak hibridizasyonun algılanması sağlanmıştır.



Şekil 3.2. Hazırlanan çalışma elektrodu ile üçlü elektrot sistemi

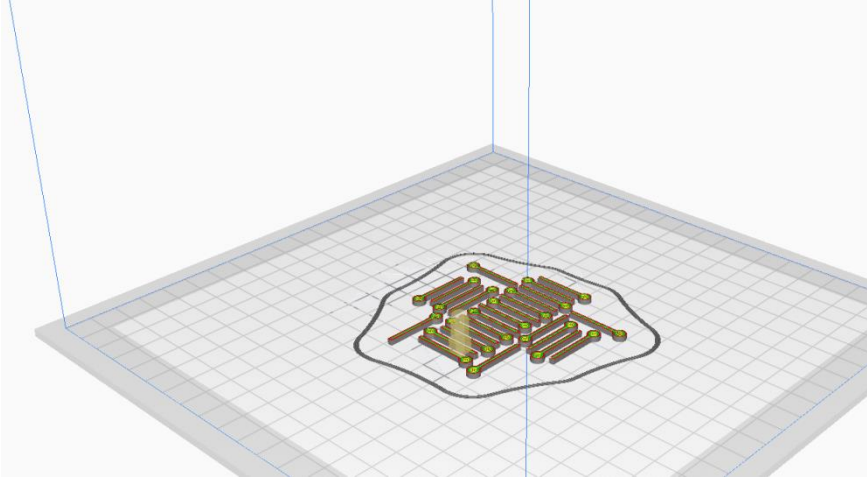
3.2.1 Elektrotların sanal modellemesi ve 3B yazıcı ile baskı prosedürleri

Bu tez kapsamında 3 boyutlu baskı tekniği ile basılmış olan elektrotların; elektrokimyasal ölçümlerde daha kullanışlı, tasarım olarak daha çeşitli ve ekonomik açıdan daha az maliyetli olarak fayda sağlaması beklenmektedir. Bu elektrotlar laboratuvarlarımızda kullanılan PGE ve SPE elektrotlara göre daha hesaplı ve geliştirilmeye açık olacakları için de daha avantajlı olacakları öngörülmektedir. Bu doğrultuda 3B baskılı elektrotların hazırlanmasında ilk olarak çizim aşaması gelmektedir. 3B baskılı elektrotlar SolidWorks (Katı Modelleme) Programı ile tasarım olarak Şekil 3.3’de gösterildiği gibi 5 mm çapında ve 2 mm kalınlıkta bir disk kısmına ve elektrotu timsah klipsine bağlamak için 20 mm uzunluğunda ve 2 mm kalınlığında bir şerit kısmına sahip olacak şekilde çizilmiştir (dos Santos et al., 2019).



Şekil 3.3. 3B baskılı elektrot şekli ve boyutları

Modellemesi tamamlanan elektrotun Bölüm 2.3.1’de belirtildiği gibi baskı kısmına geçmeden önce dilimleyici adı verilen bir yazılım tarafından işlenmesi gerekmektedir. Modelleme kısmından sonra oluşan dosya programı ‘.STL’ olarak geçmekte ve 3 boyutlu model yazdırılmadan önce .STL dosyası bu tez kapsamında Cura adlı dilimleyici program ile G-koda (geometrik kod) dönüştürülmüştür. Daha sonrasında elektrotlar kaynaşmış (erimiş) birikim modellemesi (FDM) yöntemi ile çalışan Creality Ender 3 V2 3B Yazıcı ve 1.75 mm çaplı ProtoPasta Karbon Siyahı/ PLA filamenti kullanılarak basılmıştır. FDM teknolojisinin tercih edilmesinin nedenleri önceki bölümlerde bahsedildiği gibi daha az maliyetli oluşu, özelleştirilmiş tasarım imkanı sunması, seri üretime ve minyatürleşmeye uygunludur. Elektrotların basımı sırasında kullanılan parametreler ise şu şekildedir; 220°C meme (nozzle) sıcaklığı, 60°C yatak (tabla) sıcaklığında 0,6 mm çapında meme (nozzle) ucu kullanılarak 30 mm/s hızla baskı alınmıştır. Katman yüksekliği 0.12 mm olarak ayarlanmıştır. Dolgu yoğunluğu %20 ve dolgu şekli kübik olarak belirlenmiştir. Geri çekme ayarları PLA filament için kullanılan varsayılan değerde uygulanmıştır. Her üretim aşamasında 25 elektrot basılmıştır ve tek bir elektrotun üretiminde 0.1 gram filament kullanıldığı, baskının ise 1 saat 6 dakika sürdüğü belirlenmiş olup baskı önizlemesi Şekil 3.4’de görüldüğü gibidir. Elektrot yüzey alanı 1.47 cm²’dir.



Şekil 3.4. 3DcbE'lerin baskı önizlemesi

Elektrotların kalınlıklarının elektrot performansı üzerindeki etkisinin araştırılması için 1 mm, 1,5 mm, 2 mm, 2,5 mm ve 3 mm olmak üzere 5 farklı kalınlıkta elektrot basımı gerçekleştirilmiştir. Ölçümden önce ilk olarak elektrotlar kalem grafit elektrotların aktivasyonunda kullanılan aktivasyon yöntemi olan 0,5 M ACB tampon çözeltisinde 1,4 V'luk potansiyel uygulanarak diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile 60 saniye boyunca elektrokimyasal olarak aktive edilmişlerdir.

3.2.2 Tasarlanan elektrotların elektrokimyasal performans tayini

Baskıları tamamlanan elektrotları kullanmadan önce yüzeylerindeki toz vb. etkenlerin ortadan kaldırılması için her elektrot distile su içerisine daldırılıp çıkarılarak, her aktivasyon çalışması öncesinde bu işlem gerçekleştirilmiştir.

CB/PLA elektrotların zayıf elektrokimyasal tepkisi literatürde zaten bilinen bir konu olmakla birlikte bu sebeple elektrotların baskıdan sonra ilk olarak analitik performanslarını iyileştirmek gereklidir. Bu nedenle karbon siyahı/PLA (CB/PLA) filamentle basılan elektrotlar baskıdan sonra aktivasyon işlemine tabii tutulmuştur. Elektrotların en iyi elektriksel iletkenliği sağladığı aktivasyon işlemini bulabilmek için birçok farklı deney yapılmıştır. Aktivasyon yöntemleri mekanik aktivasyon ve kimyasal/elektrokimyasal aktivasyon olarak ikiye ayrılmıştır.

3.2.2.1 Mekanik aktivasyon

Bu tez kapsamında elektrotların iletkenliğini arttırmak üzere Bölüm 2.3.4’de bahsedilen mekanik aktivasyon yöntemlerine benzer şekilde homojen bir yüzey elde edene kadar ultra saf su varlığında ilk olarak 500 kum ve ardından 1200 kum zımpara kağıtları ile hepsi birer dakika olacak şekilde mekanik aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Mekanik aktivasyon gerçekleştirilen elektrotlar ve mekanik aktivasyon gerçekleştirilmeyen elektrotlar sonrasında 0,5 M ACB tampon çözeltisinde 1,4 V’luk potansiyel uygulanmasıyla diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile 60 saniye boyunca elektrokimyasal olarak aktive edilmişlerdir. Kıyaslamak amacıyla bazı elektrotlara ise hiçbir aktivasyon yöntemi uygulanmamıştır.

3.2.2.2 Kimyasal/ Elektrokimyasal aktivasyon

Tez kapsamında elektrotların en iyi performansı sağladığı aktivasyonu bulabilmek amacıyla farklı kimyasallar ile aktivasyon işlemleri, elektrokimyasal aktivasyon işlemleri ve kimyasal aktivasyonun elektrokimyasal aktivasyonla art arda uygulandığı çeşitli aktivasyon yöntemleri denenmiştir. Bunlar şu şekildedir;

- NaOH ile kimyasal aktivasyon
- DMF ile kimyasal aktivasyon
- HNO₃ ile kimyasal aktivasyon
- H₂SO₄ ile kimyasal aktivasyon
- Aseton ile kimyasal aktivasyon
- NaBH₄ ile kimyasal aktivasyon
- CV ile aktivasyon
- Na₂SO₄ çözeltisinde aktivasyon
- 0,5 M NaOH içerisinde Pulsed ile aktivasyon
- ACB tamponunda aktivasyon
- Over Oxidation

Bölüm 2.3.4’de bahsedilen Kalinke ve arkadaşlarının (Kalinke et al., 2020) farklı kimyasal maddeler kullanılarak yapılan aktivasyon çeşitleri de bu tez kapsamında denenmiş olup, prosedürler şu şekildedir;

- **Sodyum Hidroksit (NaOH) ile kimyasal aktivasyon prosedürü:**

Elektrotların viallerde 1 M NaOH çözeltisi içinde 30 dakika boyunca muamele edilmesine dayanan aktivasyon yönteminden yola çıkılarak yapılan deneylerden oluşmaktadır (Kalinke et al., 2020). Elektrotların farklı derişimlerde NaOH içerisinde bekletilmesi ardından sonuçların kıyaslanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. NaOH çözeltisi hazırlanan 5 M stok çözeltiden saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır. İlk olarak 1 M, 2 M, 3 M olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda NaOH çözeltisi hazırlanmıştır. Elektrotlar her bir konsantrasyonda 30 dakika boyunca daldırılarak bekletilmişlerdir. Bu prosedüre ek olarak elektrotlar 40°C’de 1 saat sonikatör işlemiyle de aktivasyona tabii tutulmuşlardır. Sonuçların tümü elektrokimyasal ölçümler ile değerlendirilmiştir.

- **Dimetilformamdid (DMF) ile kimyasal aktivasyon prosedürü:**

Kalinke ve arkadaşlarının önerdiği prosedüre ek olarak Bölüm 2.3.4’de bahsedilen Palenzuela ve arkadaşları (Manzanares Palenzuela et al., 2018) ile Pal ve arkadaşlarının (Pal et al., 2021) önermiş oldukları elektrotların DMF çözeltisinde bekletilerek muamelesine dayanan aktivasyon yöntemlerinden yola çıkılarak yapılan deneylerden oluşmaktadır. Bu kapsamda elektrotlar ilk olarak DMF çözeltisinde 5 ve 10 dakika olarak iki farklı sürede bekletilmişlerdir. Daha sonra sonuçlar elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir.

- **Nitrik Asit (HNO₃) ile kimyasal aktivasyon prosedürü:**

Elektrotların hazırlanan vialler içerisindeki 7,9 mM HNO₃ çözeltisinde 1 saat boyunca bekletilmesi ile aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sonuçlar elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir.

- **Sülfirik Asit (H₂SO₄) ile kimyasal aktivasyon prosedürü:**

Elektrotların hazırlanan vialler içerisindeki 0,5 M H₂SO₄ çözeltisinde 1 saat boyunca bekletilmesi ile aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sonuçlar elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir.

- **Aseton ile kimyasal aktivasyon prosedürü:** Gusmao ve arkadaşlarının (Gusmao et al., 2019) önerdiği aktivasyon prosedürü kapsamında elektrotlar aseton içerisinde 7 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakılmışlardır. Aseton ile aktivasyonda ikinci bir alternatif olarak elektrotlar 10 dakika asetona daldırılarak bekletilmişlerdir. Bir diğer aktivasyon prosedürü ise elektrotların asetona direkt temas etmediği, ancak kapalı bir beher içerisinde aseton buharına maruz bırakıldığı yöntemdir. Daha sonra sonuçlar elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir.

- **Sodyum Borhidrür (NaBH_4) ile kimyasal aktivasyon prosedürü:** Redondo ve arkadaşlarının (Redondo et al., 2021) önermiş olduğu aktivasyon prosedürü kapsamında elektrotlar 0.1 M ve 1.0 M olmak üzere iki farklı konsantrasyonda NaBH_4 çözeltilerinde 30 dakika ve 24 saat olmak üzere iki farklı aktivasyon süresinde farklı kombinasyonlarda bekletilerek aktive edilmişlerdir. Daha sonra sonuçlar elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir.

Kimyasal aktivasyon prosedürlerine ek olarak elektrokimyasal veya kimyasal aktivasyon ardından elektrokimyasal aktivasyon prosedürlerinde ise elektrotların yüzeylerine belirli potansiyeller uygulanarak tüm grupların ‘-COOH’ grubuna yükseltgenmesi sağlanacaktır.

- **CV ile aktivasyon prosedürü:** Martins ve arkadaşlarının (Martins et al., 2021) önermiş olduğu aktivasyon prosedüründen yola çıkılarak elektrotların 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde 100 mV/s tarama hızında -1.2 V’dan +1.2 V’a kadar dönüşümlü voltametri (CV) uygulanmasıdır. Bu prosedür uygulandıktan sonra sonuçlar elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir.

- **Sodyum Sülfat (Na_2SO_4) ile aktivasyon prosedürü:** Vaneckova ve arkadaşlarının (Vaněčková et al., 2020) önerdiği aktivasyon prosedüründen yola çıkılarak yine Na_2SO_4 çözeltisi içerisinde farklı bir yöntem denenmiştir. Elektrotlara Na_2SO_4 içerisinde ilk olarak 200 saniye boyunca +1,4 V ve ardından 200 saniye boyunca -1,0 V’luk potansiyel uygulanmıştır. Başka bir grup elektrota ise yine Na_2SO_4 içerisinde 200 saniye boyunca +1,4V’luk potansiyel

uygulanmıştır. Bu iki aktivasyon prosedürünü kıyaslamak için sonuçlar elektrokimyasal ölçüm ile değerlendirilmiştir.

- **Pulsed aktivasyon prosedürü:** Carvalho ve arkadaşlarının (Carvalho et al., 2021) önerdiği aktivasyon prosedürü doğrultusunda elektrotlar 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde +1.4 V'da 200 saniye ve -1.0 V'da 200 saniye potansiyele maruz bırakılmıştır. Sonucunda elektrokimyasal ölçümlerle değerlendirilmiştir.

- **ACB Tamponunda aktivasyon prosedürü:** 0,5 M ACB tampon çözeltisi içerisinde elektrotlara 60 saniye boyunca +1,4 V'luk potansiyel uygulanarak elektrotlar aktive edilmiştir. Sonuçlar elektrokimyasal ölçümler ile değerlendirilmiştir.

- **Over Oxidation prosedürü:** Wei ve arkadaşlarının (2007) SPE için önerdiği iki aşamalı aktivasyon yöntemine ait literatür prosedürü bazı değişikliklerle kullanılmış olup sonraki aşamalarda 'Over oxidation' prosedürü olarak geçmektedir (Wei et al., 2007). Bu prosedürde elektrotlar ilk olarak 1 M NaOH çözeltisine daldırılarak 30 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra bu elektrotlara 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde 60 saniye boyunca +1,4 V'luk potansiyel uygulanarak aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar elektrokimyasal ölçümlerle değerlendirilmiştir.

3.3 3DcbE'lerin Biyosensöre Uygulanması

Laboratuvar koşullarında yapılan biyosensör uygulamaları ile alınan ölçümler, AUTOLAB üzerinden üçlü elektrot sistemi kullanılarak yapılmaktadır. Üçlü elektrot sisteminde çalışma elektrodu olarak aktivasyonu gerçekleştirilen 3DcbE'lar kullanılmıştır. Elektrot yüzeylerine immobilize edilen dsDNA ve hibridizasyona dayalı biyomoleküllerin tespitleri gerçekleştirilmiştir.

Biyosensör uygulamalarına yönelik yapılan elektrokimyasal analizlerin tasarlanan çalışma elektrotları ile incelenen parametreleri aşağıda sıralanmıştır.

3.3.1 DNA bağlanması ve tayinine yönelik yapılan çalışmalar

Laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen, dsDNA çözeltisinin farklı derişimlerdeki tespiti, elektrokimyasal olarak ‘guanin’ bazının +1.0V’da verdiği yükseltgenme sinyaline dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, çift sarmal DNA olarak balık sperminden elde edilen tam bir DNA molekölü kullanılmıştır. Tez kapsamında tasarlanan 3B yazıcı baskılı çalışma elektrotları (3DcbE) ve AUTOLAB ile çift sarmallı DNA’nın tespit edilmesinin ardından dsDNA’nın farklı konsantrasyonlardaki tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışma protokolü, laboratuvarımızda önceden optimize edilen koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak Bölüm 3.2.2.2’de bahsedilen aktivasyon yöntemlerinden 3 tanesinin (Over Oxidation, Pulsed, 1 M NaOH) DNA tespiti üzerindeki etkilerini kıyaslamak üzere dsDNA tespiti çalışmaları yapılmış olup daha sonra dsDNA tayini için en uygun olan prosedürün seçilmesi için 1000 ppm (1000 µg/mL) stok dsDNA çözeltisinden ACB tamponu kullanılarak 50 ppm dsDNA çözeltisi hazırlanp, tespiti DPV tekniğı kullanılarak gerçekleştirildikten sonra bir DNA biyosensörü hazırlanması için her aktivasyon yönteminin sonucunda tespit edilen +1.0 V’daki Guanin bazının yükseltgenme sinyaline ait akım değerlerinin oranları kıyaslanarak en uygun aktivasyon yöntemi seçilmiştir. Sonraki çalışmalarda seçilen aktivasyon yöntemi ile 3DcbE’ların elektrokimyasal aktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

dsDNA tayini, üç farklı tayin yöntemi ile yapılan deneylerle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak ilk olarak 50 ppm dsDNA tayini gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tüm yöntemler ile artan konsantrasyonlarda dsDNA tayini DPV tekniğı ile ölçümlerle gerçekleştirilmiştir. dsDNA tayininde kullanılan üç yöntem sırasıyla şu şekildedir:

3.3.1.1 Cözelti içinde dsDNA tayini:

Aktivasyon işlemi ardından elektrotlar, 1000 ppm (1000 µg/mL) stok dsDNA çözeltisinden ACB tamponu kullanılarak 50 ppm olacak şekilde

seyreltilip 5 mL hücre içerisinde DPV tekniği kullanılarak ölçümler alınmıştır. Buna göre; (+0.55 V) ve (+1.4 V) aralığında adım potansiyeli uygulayarak, AUTOLAB üzerinden ölçülmüştür.

3.3.1.2 dsDNA'nın adsorbe yüzeyde tayini:

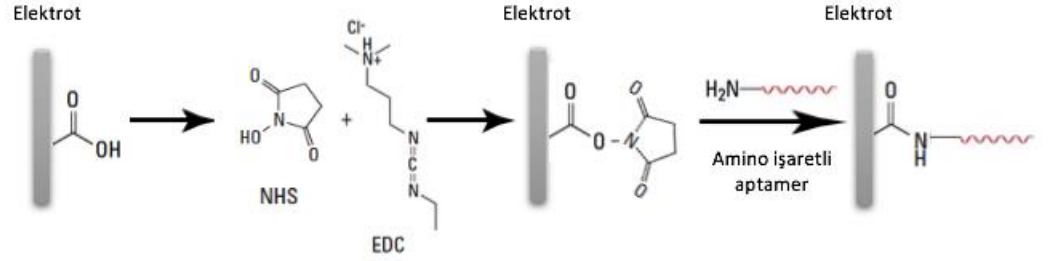
Adsorbsiyon, herhangi bir reaktif veya nükleik asit modifikasyonuna ihtiyaç duyulmadığı için nükleik asitlerin yüzeye tutturulmasında kolay bir yöntemdir. Nükleik asitler elektrot yüzeyine kovalent olmayan kuvvetler ile bağlanır (Rivas et al., 2005).

Aktive edilen elektrotlar aktive edilen yüzeyleri çözelti içerisine girecek şekilde, hazırlanan 50 ppm (50 µg/mL) dsDNA'dan 400 µL koyulan vialler içerisinde 30 dakika boyunca adsorbsiyon yöntemine göre bekletilmiştir. Her bekletilme sonrasında elektrotlar, 0,5 M ACB çözeltisi içerisine birer kez daldırıp çıkarmak suretiyle yıkanıp ölçümler alınmıştır. Yıkama gerçekleştirilerek tam olarak bağlanmamış DNA'ların uzaklaştırılmıştır. Daha sonra voltametrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.3 dsDNA'nın kovalent bağlı yüzeylerde tayini:

Elektrotların aktivasyon işlemi ardından elektrot yüzeylerindeki karboksil gruplarını aktive etmek için 400 µL vialler içerisinde 5 mM NHS ve 8 mM EDC içeren kovalent bağlama ajanında elektrotlar 1 saat inkübe edilmiştir. EDC aracılı kovalent bağlama işleminin etkinliği NHS varlığında artmaktadır (Ligaj et al., 2006).

Elektrot yüzeyinin EDC/NHS ile aktive edilmesinden sonra 1000 ppm (1000 µg/mL) stok dsDNA çözeltisinden ACB tamponu içinde 50 ppm konsantrasyonda dsDNA çözeltileri hazırlanıp 400 µL'lik viallere dağıtılmıştır. 3Dcbe'lar dsDNA çözeltileri içerisinde 1 saat inkübe edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler öncesinde elektrotlar ACB ile 3 saniye boyunca yıkanmıştır. Daha sonra voltametrik ölçümler alınmıştır.



Şekil 3.5. Karbodimid kimyası ile karboksil gruplarına amino gruplarının kovalent bağlanması (Kıvrak, 2019)

3.3.1.4 Artan konsantrasyonlarda dsDNA çalışmaları:

Elektrot yüzeyine bağlanan dsDNA'nın, farklı derişim değerlerindeki etkileşimleri ayrı ayrı ölçülerek değerlendirilmiştir. Artan derişim değerleri çözelti içerisinde gerçekleştirilen deneylerde 1 ppm, 4 ppm, 16 ppm, 63 ppm, 126 ppm, 251 ppm, 501 ppm, 1000 ppm olarak belirlenmiş olup her dsDNA konsantrasyon değişikliğinde çözelti içinde yapılan deneylerde elektrokimyasal hücre içerisindeki manyetik karıştırıcı ile çözeltinin 5 dakika karıştırılmasının ardından ölçüm alınmıştır. +1.0 V'daki 'guanin' sinyalinin değerleri (+0.55 V) ile (+1.4 V) aralığında DPV tekniği kullanılarak potansiyostattaki NOVA 1.10 yazılımı kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Elektrot yüzeyine bağlanan dsDNA'nın adsorbe edilerek ve karbodimid kimyasıyla kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleştirilen deneylerde ise konsantrasyon değerleri 1 ppm, 4 ppm, 16 ppm, 63 ppm ve 126 ppm olarak belirlenmiştir. Elektrot yüzeylerine dsDNA adsorbe edilen yöntemde, aktive edilen elektrotlar aktive edilen yüzeyleri çözelti içersine girecek şekilde, hazırlanan artan derişimlerdeki dsDNA çözeltilerinden oluşan 400 µL'lik vialler içerisinde 30 dakika boyunca adsorbsiyon yöntemine göre bekletilmiştir. Artan derişimlerdeki dsDNA'lar 1000 ppm (1000 µg/mL) stok dsDNA çözeltisinden ACB tamponu kullanılarak seyreltilip hazırlanmışlardır. Her bekletilme sonrasında elektrotlar, 0,5 M ACB çözeltisi içersine birer kez daldırıp çıkarmak suretiyle yıkanp ölçümler alınmıştır. Yıkama gerçekleştirilerek tam olarak bağlanmamış DNA'lar uzaklaştırılmıştır.

Elektrot yüzeyine karbodimid kimyasıyla kovalent olarak dsDNA bağlanan yöntemde ise elektrotların aktive edilmesi ardından vialler içerisinde 400 μL 5 mM NHS ve 8 mM EDC içeren kovalent bağlama ajanında elektrotlar 1 saat inkübe edilmiştir. Elektrot yüzeyinin EDC/NHS ile muamele edilmesinden sonra 1000 ppm (1000 $\mu\text{g/mL}$) stok dsDNA çözeltisinden ACB tamponu içinde artan konsantrasyonlarda dsDNA çözeltileri hazırlanıp 400 μL 'lik viallere dağıtılmıştır. 3DcbE'lar viallerdeki dsDNA çözeltileri içerisinde 1 saat inkübe edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler öncesinde elektrotlar ACB ile 3 saniye boyunca yıkanmıştır.

Daha sonra voltametrik ölçümler alınmıştır. Her konsantrasyon için en az 4 elektrot ile ölçümler tekrarlanmıştır.

3.3.2 Hibridizasyon çalışmaları

3DcbE'lar ile dsDNA'nın başarıyla görüntülenmesinin ardından hibridizasyon tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, seçilen diziler ile sensör yüzeylerinde hibridizasyon tayini gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan biyosensörün seçiciliğini tayin etmek amacıyla tüm bazları hedeften farklı bir dizi kullanılmıştır. Çalışma koşulları, laboratuvarımızda yürütülmekte olan çalışmalara ait optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Elektrot Yüzeyinin Aktivasyonu: Elektrot yüzeyleri, seçilen puls yöntemi doğrultusunda 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde DPV tekniği +1.4 V'luk potansiyel uygulanarak 200 saniye süreyle ardından -1,0 V'luk potansiyel uygulanarak 200 saniye elektrokimyasal olarak aktive edilmiştir.

Prob Dizi Kaplanması: Elektrot yüzeyi prob dizi ile kaplanmadan önce yüzeye 5 mM NHS ve 8 mM EDC içeren kovalent bağlama prosedürü uygulanmıştır. Daha sonra seçilen prob dizi 0.5 M ACB tampon çözeltisi içerisinde, 5 ppm derişiminde hazırlanmıştır. Elektrotlar hazırlanan prob dizi çözeltisi içerisinde 1 saat boyunca immobilize edilmiştir.

Hibridizasyon: Yüzeylerine prob tutturulmuş elektrotlar, 5 ppm derişiminde hedef dizi ve tüm bazları hedeften farklı diziyi içeren hibridizasyon tamponu (5xSSC + %0,05 SDS) içerisinde 30 dakika hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, elektrot yüzeyinde düzgün bağlanmayan dizilerin elektrot yüzeyinden uzaklaştırmak amacıyla elektrotlar 1xSSC + %0.1 SDS içeren yıkama tamponu içerisinde 2 dakika boyunca bekletilmişlerdir.

DPV ile Ölçüm: Hibridizasyon tayininin saptanmasına dair elektrokimyasal ölçümler 50 mM ACB tampon çözeltisi içerisinde (+0.55V) ve (+1,4.V) potansiyel aralığında DPV tekniğı ile alınmıştır.

3.3.3 3DcbE'ların stabilite çalışmaları

3DcbE'ların baskıları gerçekleştirildiğı günden itibaren ne kadar süre ile özelliklerini, verimliliklerini koruduklarını görmek üzere baskıdan sonra oda sıcaklığında saklanmışlardır. Baskıdan sonra 7., 15., 30. günler ve 3. aydan sonra elektrotlara uygulanan pulsed aktivasyon işleminin ardından çözelti içerisindeki 50 ppm derişimde dsDNA'nın voltametrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.4 Elektrokimyasal ölçümler

Elektrokimyasal ölçüm cihazı olarak μ -Autolab Type III potansiyostat (Eco Chemie, Hollanda) kullanılmıştır. Voltametrik ölçümler Nova 1.10 yazılımı yardımıyla okunabilir sinyallere dönüştürülmüştür. Tüm deneylerde Ag/AgCl referans elektrot ve Pt tel yardımcı elektrot olarak kullanıldı.

Tasarlanan elektrotların elektrot vazifesi görüp görmediklerini değerlendirmek, uygun aktivasyon yöntemini belirlemek için ve artan konsantrasyon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ çalışmalarında döngüsel voltametri ölçümleri -1.0 V ile +1.4 V potansiyel aralığında 100 mV/s tarama hızında bir elektrolit çözeltisi olan $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ içerisinde gerçekleştirilmiştir (Bkz. Bölüm 4.1.2 ve Bölüm 4.1.3).

Diğer voltametrik ölçümler 0.5 M ACB içerisinde Diferansiyel Puls Voltametrisi tekniği ile (+0.55) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında, 15,9 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak alınmıştır. Bu teknik sadece aktivasyon yöntemi belirlenen elektrot yüzeylerinin DNA ile etkileşimini araştırmak için ve hibridizasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Bkz. Bölüm 4.2).

3.3.5 3DcbE'lerin taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelenmesi

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) cihazı ile görüntüleme, numuneye gönderilen hızlandırılmış elektronların numunenin atomları ile etkileşmesi sonucunda saçılan elektronların çeşitli dedektörler yardımıyla analiz edilmesi esasına dayanır. Bu saçılmaların değerlendirilmesi ile malzeme içerisindeki yapıların mikro (10^{-6} m) ve nano (10^{-9} m) mertebesinde görüntüleme analizi yapılabilmektedir. Mikroyapı morfolojisi ve kimyasal bileşim karakterizasyonlarının incelenmesi ve analizi için çok yönlü araçlardan biridir.

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri, Ege Üniversitesi Merkezi Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Aktivasyonsuz 3DcbE ve Bölüm 3.2.2'de önerilen bazı aktivasyon yöntemleri ile (Over oxidation, 1 M NaOH, Pulsed, DMF, NaBH₄) hazırlanan 3DcbE'lerin yüzeyi ve elektrotların hammaddesi CB/PLA filamentin işlenmemiş halinin yüzeyi SEM cihazı ile 20 µm çözünürlükte (ölçek) görüntülenmiştir.

3.3.6 3DcbE ile EIS tekniği ile ölçüm

Yüzey karakterizasyonu gerçekleştirmek amacıyla impedimetrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. İmpedimetrik ölçümler elektron transferine dayalı olarak 5 mM olan [Fe(CN₆)]^{-3/4} çözeltisi içerisinde Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) tekniği ile gerçekleştirilip ölçümlerin frekans aralığı 10 kHz ile 5 mHz, 0.24 V sabit potansiyel ve 10 mV alternatif akım altında alınmıştır. EIS tekniği kullanılarak AUTOLAB üzerinden alınan ölçümlerle 50 ppm dsDNA tayini yapılmıştır. Ölçümler sonucunda meydana gelen daire şeklindeki Nyquist

diyagramları, Randless devre modelini kullanarak analiz edilmiştir. Alınan impedans ölçümleri, her bir frekans değerine karşılık gelen direnç değerlerinin ohm (Ω) cinsinden analizi ile gerçekleştirilmektedir. NOVA 1.10 yazılım sistemi ile eğriler okunabilir pikler haline dönüştürülüp elde edilen pik yükseklikleri değerlendirilmektedir.

3.3.7 3DcbE'lar ile PGE ve SPE'ların kıyaslanması

Çalışmanın bu aşamasında 3DcbE'lar ile elektrokimyasal ölçümlerde sıklıkla kullanılan tek kullanımlık 3 cm boyutunda kesilen Tombow marka HB 0.5 mm kalem grafit elektrotlar (PGE) ve DRP-110-U75 Perde Baskılı Elektrotlar (SPE)'in kıyaslanması amacıyla 1000 ppm (1000 $\mu\text{g/mL}$) stok dsDNA çözeltisinden ACB tamponu kullanılarak 63 ppm olacak şekilde seyreltilip Bölüm 3.3.1'de bahsedilen 3 farklı dsDNA tayin yöntemiyle ve daha sonra artan konsantrasyonlarda dsDNA tayini için 5 ml hacimli tampon çözeltisinin içine daldırılan üçlü elektrot sistemiyle ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu deney çalışmalarının sonuçlarıyla 'guanin' bazına ait yükseltgenme sinyalinin akım değerlerinin aritmetik ortalaması ve standart sapma değeri, çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı (LOD), doğrusallık (R^2), tayin sınırı (LOQ) değerleri hesaplanacaktır. Bunlara ek olarak elektrotların maliyetleri de kıyaslanmıştır.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan üçlü elektrot sisteminde yer alan çalışma elektrotları çeşitlilik göstermektedir. Bu tez kapsamında çalışma elektrotlarının üretiminde yeni bir alternatif teknoloji olan 3 boyutlu baskı teknolojisi kullanılarak bir elektrot üretimi gerçekleştirilmiştir. Mevcut elektrotlara göre daha uygun maliyetle, daha kısa sürede üretilebilir bir alternatif olmasının yanı sıra elektrokimyasal yöntemler ile bir araya gelerek çeşitli biyosensörlerin üretimlerinde de yer alabilir.

Tez kapsamında 3 boyutlu yazıcı baskılı elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin en iyi hale getirilmesi için çeşitli aktivasyon yöntemleri denenip, yüzey aktivasyonları optimize edilen bu elektrotlarla dsDNA tespiti gerçekleştirilerek bir genosensörün yapısına sensör yüzeyi olarak dahil olması için çalışmalar yapılmıştır.

4.1 Tasarlanan Elektrotların (3DcbE) Elektrot Performanslarının Değerlendirilmesi

Tablo 4.1’de belirtilen 5 farklı kalınlıktaki elektrotların kalınlık-iletkenlik performansını değerlendirmek üzere Bölüm 3.2.1’de belirtilen aktivasyon işleminden sonra 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ çözeltisi içinde diferansiyel puls voltmetri ile (-1 V) ile (+1 V) potansiyel aralığında ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1 Elektrotların kalınlık-iletkenlik performanslarının karşılaştırılması

Elektrot Kalınlığı	Pik Pozisyonu (V)	Pik Yüksekliği (nA)
3 mm	0,22	379
2,5 mm	0,21	435
2 mm	0,26	1022
1,5 mm	0,22	1118
1 mm	0,22	1549

Tablo 4.1’de görüldüğü üzere elektrot kalınlığı azaldıkça iletkenlik artmaktadır ancak baskı sırasında daha ince kalınlıktaki elektrotların 3 boyutlu yazıcı tablasından çıkarılırken kırılğan yapı sergilemeleri gibi zorluklar ve pik kayması nedeniyle hem baskı kolaylığı açısından hem de iletkenlik açısından ortalama davranış sergileyen 2 mm kalınlıktaki elektrotlar ile çalışılmaya devam edilmiştir.

4.1.1 Mekanik aktivasyon prosedürünün elektrot performansı üzerindeki etkisine ait sonuçlar

Boyutu belirlenen 3DcbE’lara Bölüm 3.2.2.1’de bahsedilen mekanik aktivasyon prosedürünün etkisi incelenmiştir. Bazı elektrotlara mekanik aktivasyon uygulanıp bazı elektrotlara ise mekanik aktivasyon prosedürü uygulanmayarak bu prosedürün elektrot performansı üzerindeki etkisini incelemek üzere 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ çözeltisi içinde diferansiyel puls voltmetri ile (-1.0V) ile (+1.4V) potansiyel aralığında ölçüm alınmıştır.

Tablo 4.2 Mekanik aktivasyon prosedürünün elektrot iletkenliği üzerindeki etkisi

Mekanik Aktivasyon Yapılan Elektrotlar		Mekanik Aktivasyon Yapılmayan Elektrotlar	
Pik Pozisyonu (V)	Ortalama Pik Yüksekliği (nA) ve Standart Sapma	Pik Pozisyonu (V)	Ortalama Pik Yüksekliği (nA) ve Standart Sapma
0,19	3642 ±1223	0,25	2373±458

Tablo 4.2’deki değerler ve pik pozisyonları incelendiğinde mekanik aktivasyon (zımpara) uygulanan elektrotlar her ne kadar iletkenlik açısından iyi sonuçlar verse de piklerin kaymasından dolayı ve de standart sapmanın daha fazla

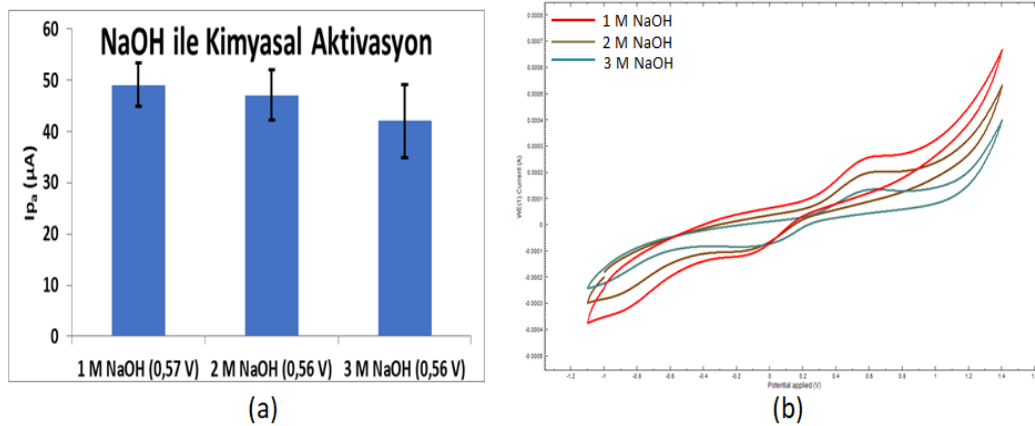
olmasından dolayı mekanik aktivasyon prosedürünün uygulanmasına devam edilmemiştir.

4.1.2 Farklı kimyasal/elektrokimyasal aktivasyon prosedürlerinin

elektrot performansı üzerindeki etkilerine ait sonuçlar

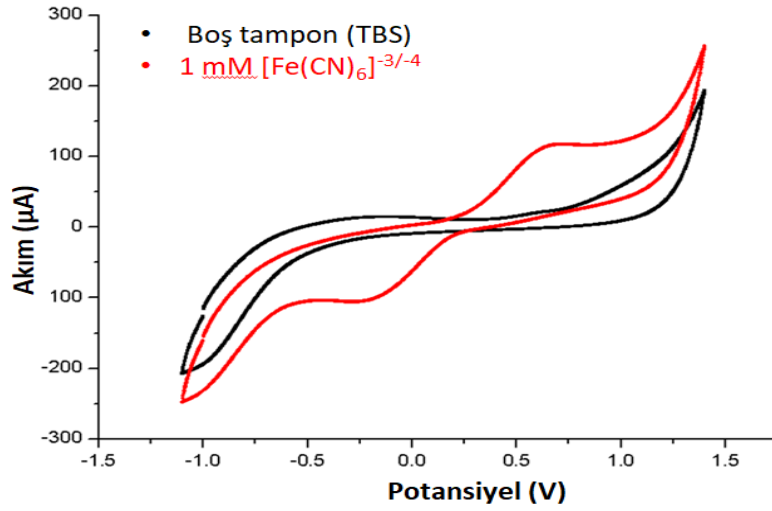
Bölüm 3.2.2.2’de açıklanan prosedürler denenmiş olup, farklı aktivasyon yöntemlerinin elektrotlar üzerindeki etkileri sırasıyla şu şekildedir;

- **NaOH ile kimyasal aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Bölüm 3.2.2.2’de bahsedilen oda sıcaklığında farklı NaOH derişimleri ve farklı bekletilme süreleri uygulandıktan sonra NaOH ile aktivasyon prosedürleri içinden elektrotların 1 M NaOH çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca bekletildiği yöntem en ideal yöntem seçilmiştir. Bu Kalinke ve arkadaşlarının (Kalinke et al., 2020) önerdiği prosedür ile uyumlu bir sonuçtur. Ek olarak elektrotların 40°C’lik sonikatör içerisinde deney tüplerinde 1 saat bekletilmesi sonucu yapılan CV ölçümlerinde herhangi bir yanıt elde edilememiştir. Şekil 4.1’de 30 dakika boyunca 1 M, 2 M ve 3 M NaOH çözeltisi içeren 400 μ L’lik vialler içerisinde bekletilen elektrotların voltametrik ölçümlerinden elde edilen aritmetik ortalama ve standart sapma değerleri histogram grafiği yardımıyla gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyon değerlerindeki NaOH çözeltilerinde aktivasyon uygulanan elektrotların CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin karşılaştırılmasına ait (a) histogram grafiği, (b) voltamogram grafiği.

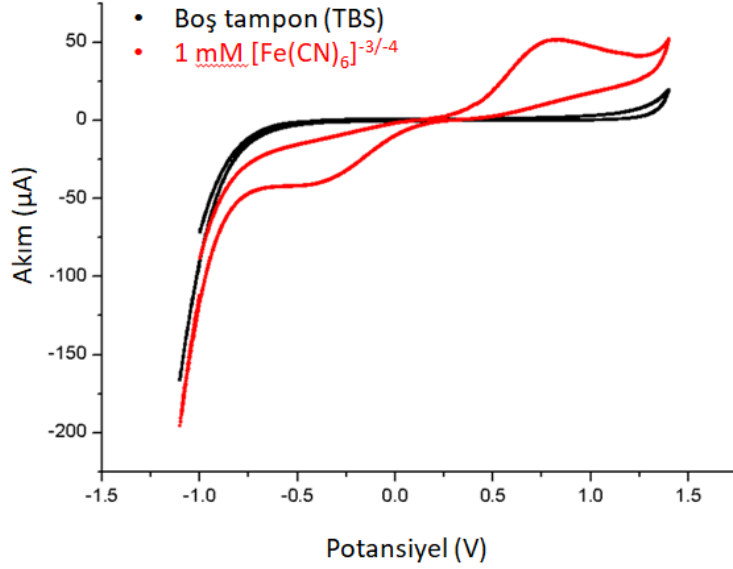
Elektrotların 1 M NaOH çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca bekletildiği aktivasyon prosedürü uygulanarak bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.2’de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.2. 1M NaOH çözeltisinde 30 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

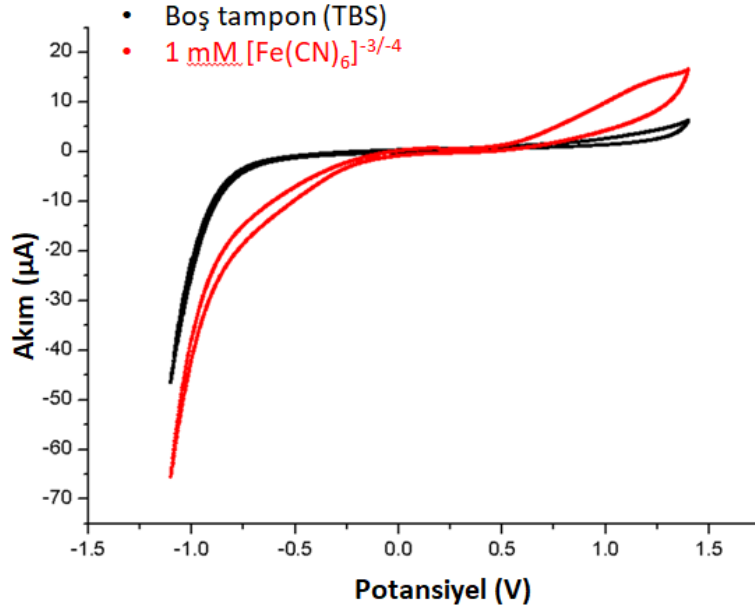
- **Dimetilformamid (DMF) ile kimyasal aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Bölüm 3.2.2.2’de bahsedilen DMF ile aktivasyon prosedürleri uygulanmıştır. Daha sonra elektrotların elektrokimyasal yöntemlerle ölçümleri gerçekleştirilmiştir ve DMF içerisinde 5 dakika bekleme süresine sahip elektrotlar elektrokimyasal bir yanıt oluşturmadığı için aktivasyon yöntemi olarak 10 dakika DMF çözeltisi içerisinde bekletilme prosedürü seçilmiştir. Kalan deneyler bu prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Bu Bölüm 2.3.4’de bahsedilen DMF ile aktivasyon prosedürleri içinden önerilen prosedüre uygun bir sonuçtur. Seçilen prosedür ile boş tampon (TBS) çözeltisi ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel

voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.3’de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



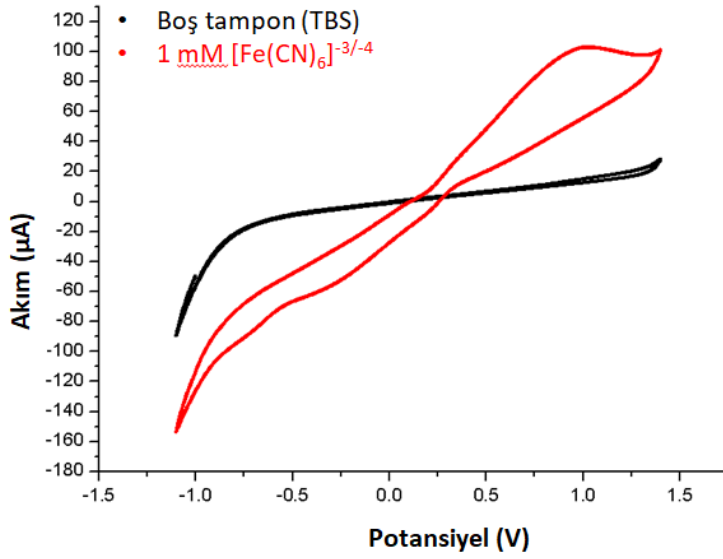
Şekil 4.3. DMF çözeltisinde 10 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

• **Nitrik Asit (HNO_3) ile kimyasal aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Elektrotların 7,9 mM HNO_3 çözeltisi içeren 400 μL 'lik viallerde 60 dakika boyunca bekletildiği aktivasyon prosedürü uygulanarak, bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.4’de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.4. HNO_3 çözeltisinde 60 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

- **Sülfirik Asit (H_2SO_4) ile kimyasal aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Elektrotların 0,5 M H_2SO_4 çözeltisi içeren 400 μL 'lik viallerde 60 dakika boyunca bekletildiği aktivasyon prosedürü uygulanarak, bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.5'de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



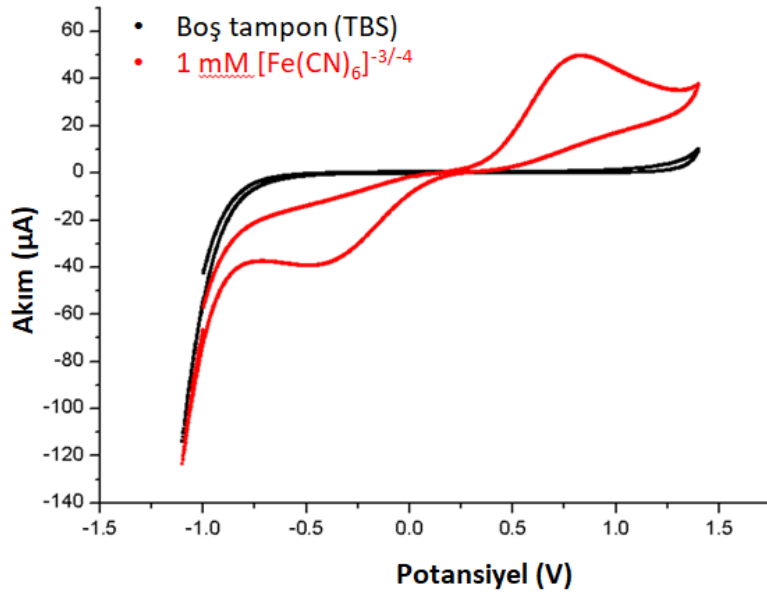
Şekil 4.5. H_2SO_4 çözeltisinde 60 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

- **Aseton ile kimyasal aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Elektrotların aseton içerisinde 7 dakika boyunca sonikasyona maruz bırakıldığı aktivasyon prosedüründe elektrotların Şekil 4.6’da gösterildiği gibi parçalandığı gözlemlendi. Bu yüzden bu elektrotlar ile ölçüm alınamadı. Ayrıca elektrotların asetona direkt temas etmediği, ancak kapalı bir beher içerisinde aseton buharına maruz bırakıldığı yöntemde ise alınan ölçümlerde herhangi bir pike rastlanmadığı için bu iki aktivasyon yöntemi çalışmanın geri kalanında kullanılmadı.



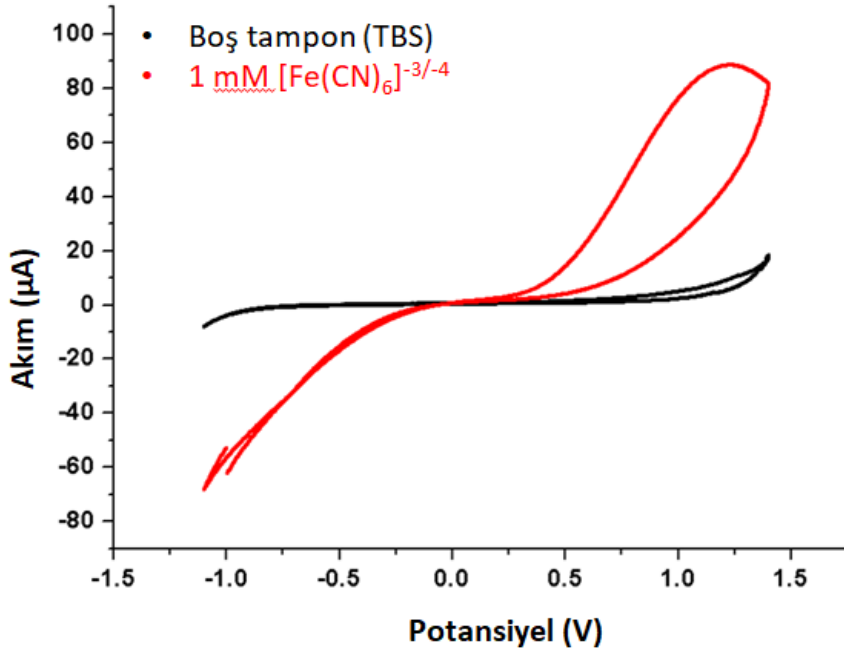
Şekil 4.6 Sonikatörde aseton ile muamele edilen elektrotlar

Ancak elektrotların 10 dakika boyunca 400 μL 'lik vialler içerisinde asetonda bekletildiği aktivasyon prosedürü uygulanarak bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.7'de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



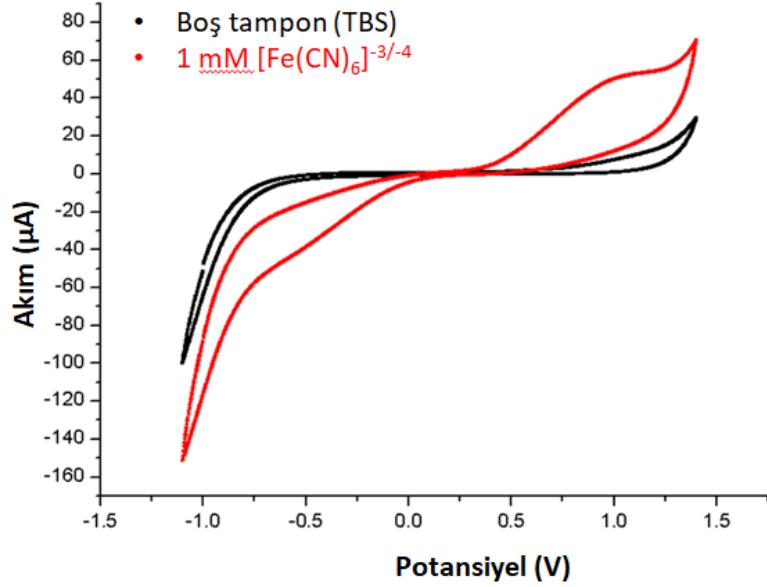
Şekil 4.7. Aseton içerisinde 10 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

• Sodyum Borhidrür (NaBH_4) ile kimyasal aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi: Elektrotların 0.1 M ve 1.0 M olmak üzere iki farklı konsantrasyonda NaBH_4 çözeltisi içerisinde 30 dakika ve 24 saat olmak üzere iki farklı aktivasyon süresinde bekletilmeleri sonucu en iyi kombinasyon 0.1 M çözelti içinde 30 dakika bekletilen elektrotlar seçilmiştir. Seçilen aktivasyon yöntemi uygulanan bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.8'de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.8. 0,1M NaBH₄ çözeltisinde 30 dakika bekletilen elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

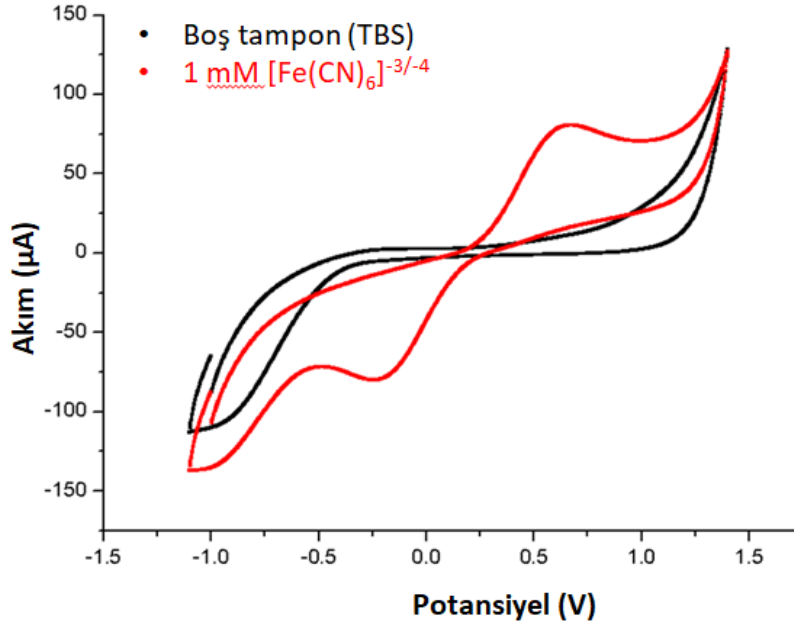
- **CV ile aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Elektrotlara 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde 100 mV/s tarama hızında -1.2 V'dan +1.2 V'a kadar potansiyel uygulanması sonucu bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.9'da gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.9. CV ile aktivasyonu yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

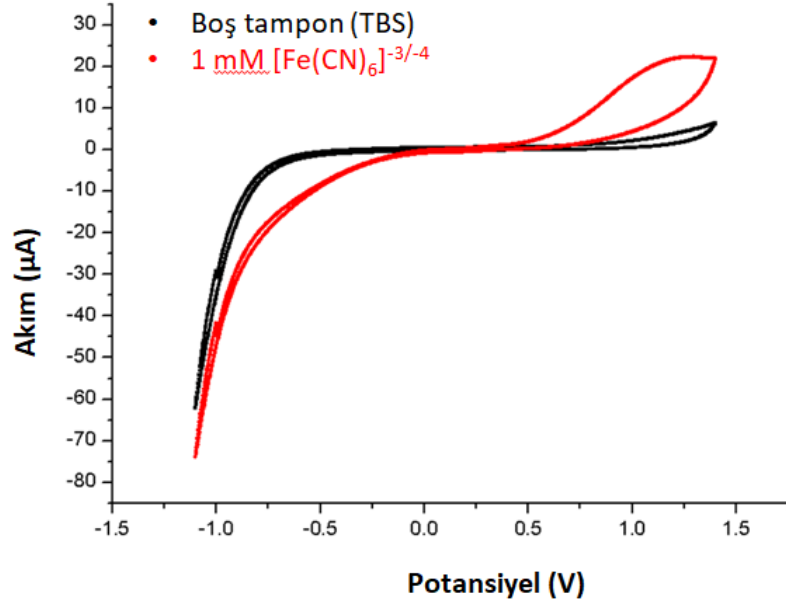
• **Sodyum Sülfat (Na_2SO_4) ile aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Bölüm 3.2.2.2’de bahsedilen her iki aktivasyon prosedürü ile yapılan elektrokimyasal ölçümler sonucu 0’a yakın akım değerleri elde edildiği için bu prosedür ile kalan deneyler gerçekleştirilmemiştir.

• **Pulsed aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Elektrotlar 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde +1.4 V’da 200 saniye ve -1.0 V’da 200 saniye boyunca potansiyele maruz bırakılmışlardır ve aktive edilen bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.10’da gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



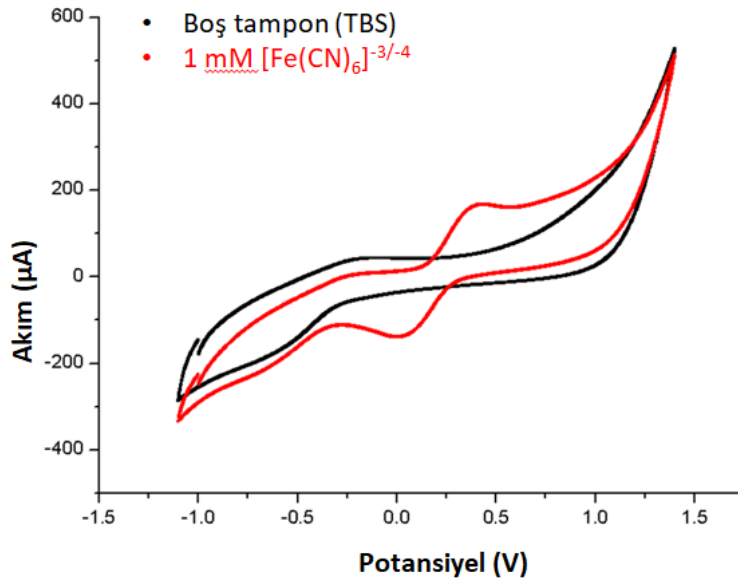
Şekil 4.10. Pulsed ile aktivasyonu yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

- **ACB Tamponunda aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** 0,5 M ACB tampon çözeltisi içerisinde elektrotlara 60 saniye boyunca +1.4 V'luk potansiyel uygulanması sonucunda aktive edilen bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.11'de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.11. ACB tamponunda aktivasyonu yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

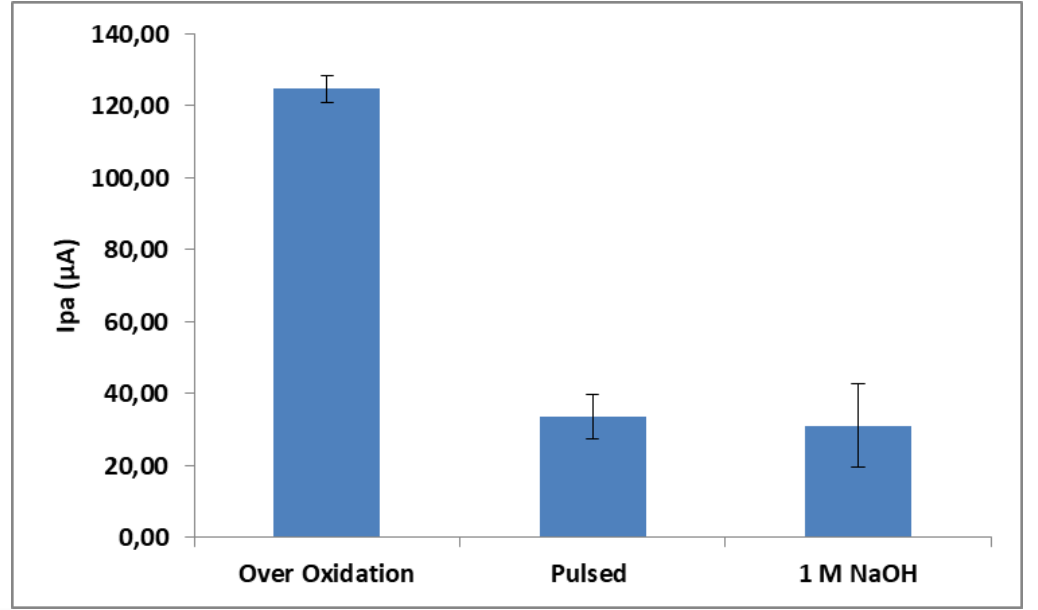
- **Over Oxidation aktivasyonun elektrot iletkenliği üzerindeki etkisinin incelenmesi:** Elektrotlar ilk olarak 1 M NaOH çözeltisine daldırılarak 30 dakika bekletilmişlerdir. Daha sonra bu elektrotlara 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde 60 saniye boyunca +1.4 V'luk potansiyel uygulanarak aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Aktivasyonu gerçekleştirilen bazı elektrotlar ile ilk olarak boş tampon TBS çözeltisinde bazı elektrotlar ile de 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ çözeltisinde (-1.0 V) ile (+1.4 V) potansiyel aralığında 2 döngü ve 100 mV/s tarama hızında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri alınıp, Şekil 4.12'de gösterilen dönüşümlü voltamogram grafiği ile kıyaslanmıştır.



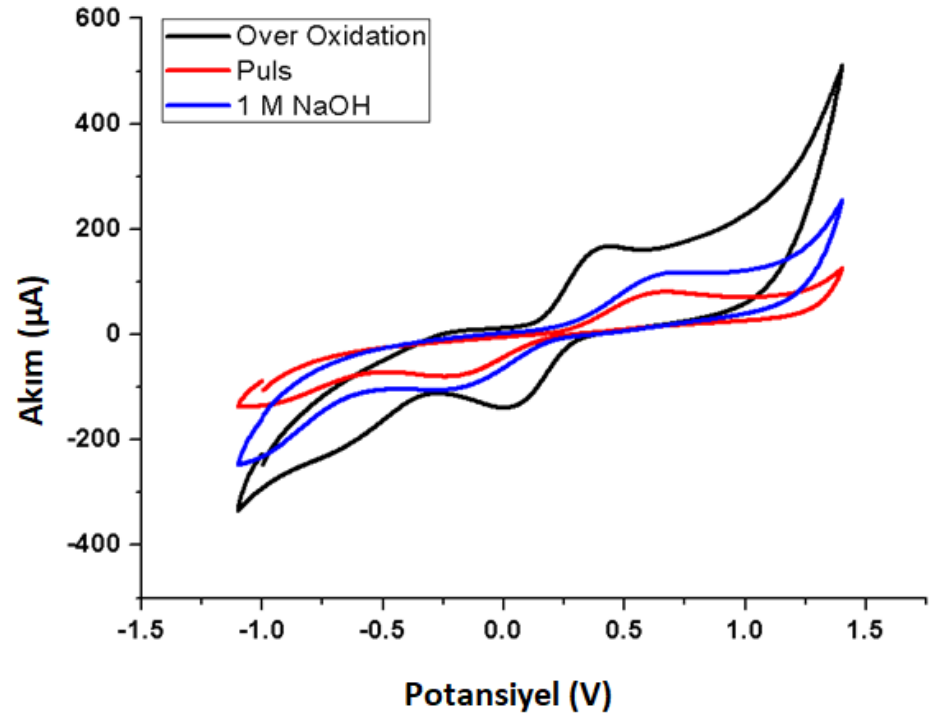
Şekil 4.12. Over oxidation prosedürüyle aktivasyonu yapılan elektrotların boş TBS tamponunda ve 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ çözeltisinde CV yöntemi ile elde edilen akım değerlerinin voltamogram grafiği.

4.1.3 Uygun aktivasyon yöntemlerinin seçilmesi ve seçilen aktivasyon yöntemlerine ait elektrot performanslarının sonuçları

Tüm bu aktivasyon yöntemlerine ait 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ çözeltisinde ve boş TBS tamponunda alınan ölçümler ve artan konsantrasyonlarda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ deneyleri sonucu oluşturulan dönüşümlü voltamogram grafiklerinde tersinir bir tepkime gözlemlenmek istemiştir. Fe^{+2} ve Fe^{+3} indirgenme/yükseltgenme (redoks) piklerinin iyi karakterize edilmiş, birbirine eşit ve yükseltgenme piklerinin ortalama 0,24 ila 0,26 potansiyel aralığında olması yorumlandığında içlerinden 3 farklı aktivasyon yöntemi seçilmiştir. Seçilen 1 M NaOH, Pulsed ve Over Oxidation aktivasyon yöntemlerinin akım değerlerinin karşılaştırıldığı histogram grafiği Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

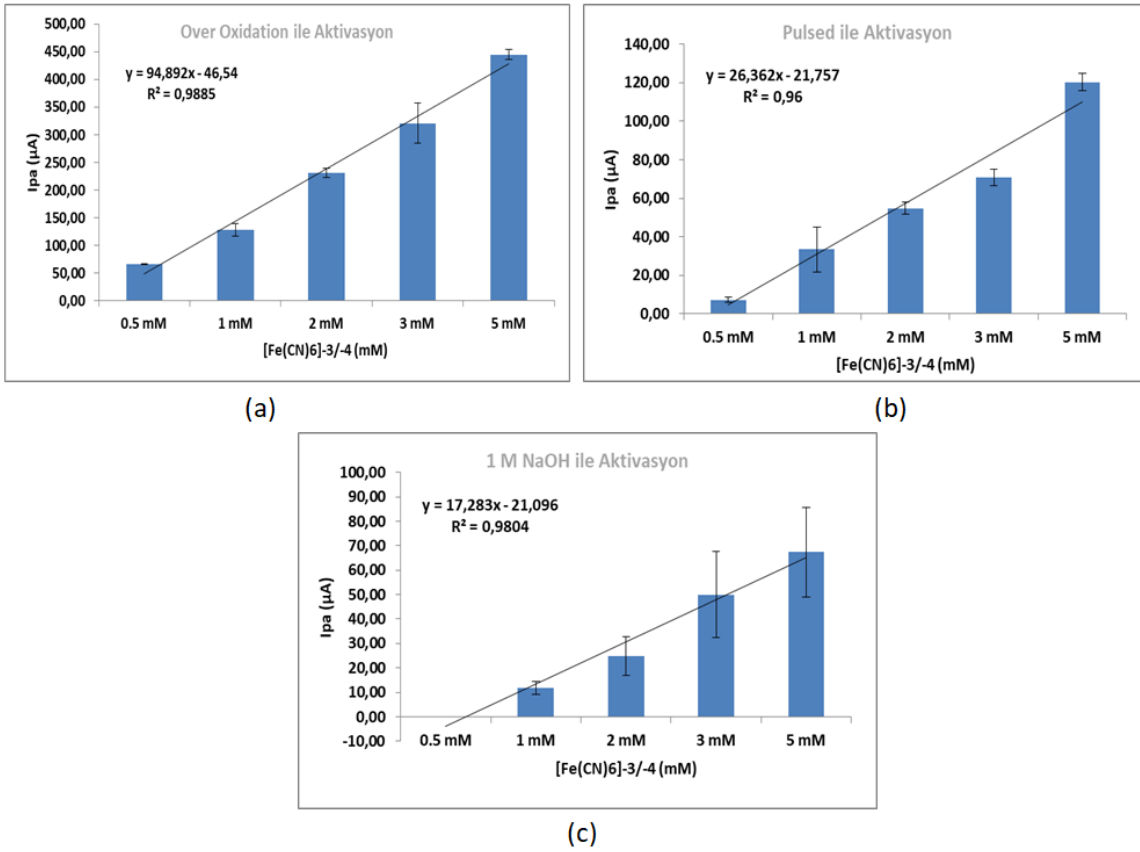


Şekil 4.13. 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4}$ çözeltisinde, seçilen aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafiği.

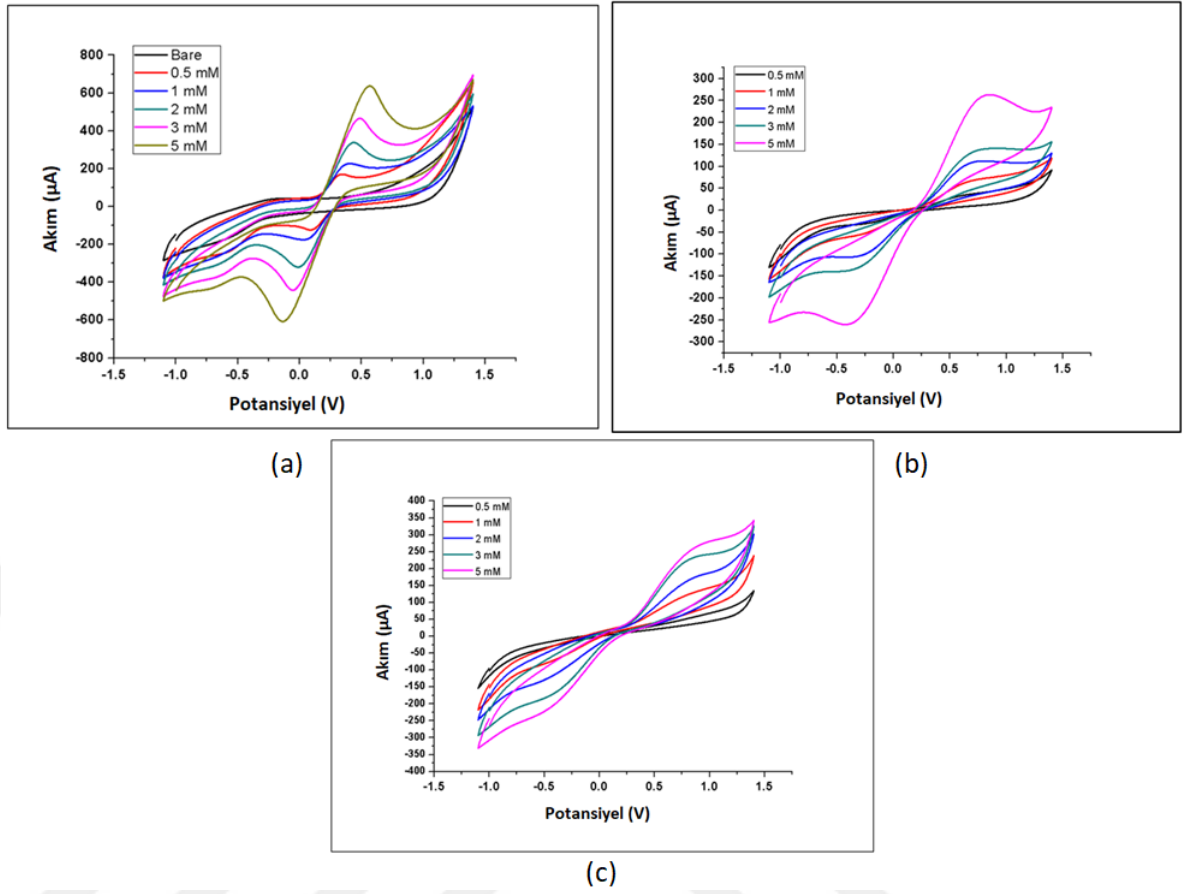


Şekil 4.14. 1 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4}$ çözeltisinde, seçilen aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin karşılaştırmalı döngüsel voltamogram grafiği.

Seçilen aktivasyon yöntemleri ile aktive edilen elektrotlarla 0,5 M, 1 M, 2 M, 3 M ve 5 M derişimlerinde olmak üzere artan konsantrasyonlarda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ zeltisinde (-1.0 V) ile $(+1.4 \text{ V})$ potansiyel aralığında, 2 dg ve 100 mV/s tarama hızında dgsel voltametri (CV) lmleri alınmıştır ve bulunan akım değerleri şekil 4.15’de histogram grafikleri olarak gsterilmiştir.  aktivasyon yönteminin de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ ‘e verdiği yanıtın spesifikliğini grmek için bu deneyler gerçekleştirilmiştir.



şekil 4.15. Artan konsantrasyon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ zeltelerinde, (a); Over oxidation ile, (b); Pulsed ile, (c); 1 M NaOH ile aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafikleri ve R^2 değerleri.



Şekil 4.16. Artan konsantrasyon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltilerinde, (a); Over oxidation ile, (b); Pulsed ile, (c); 1 M NaOH ile aktivasyon yöntemlerinin CV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin döngüsel voltamogram grafikleri.

Ayrıca üç aktivasyon yöntemine ait Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'daki grafikler incelendiğinde tez kapsamında 3B baskı teknolojisi kullanılarak hazırlanan çalışma elektrotunun (3DcbE) en iyi elektrot performansını over oxidation aktivasyon yöntemi ile sağlandığı görülmüştür. Ancak biyosensör çalışmalarına bu yöntemlerin bağlanan moleküle göre elektrot performansında farklılık oluşturabilmesi nedeniyle 3 aktivasyon yönteminin tekrar denenerek devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2 Tasarlanan Elektrotların DNA Biyosensörlerine Uygulanması

Laboratuvar koşullarında yapılan biyosensör uygulamaları için gerçekleştirilen deneylerin ölçümleri AUTOLAB üzerinden alınmaktadır. Üçlü elektrot sistemi kullanılmaktadır. Tezin amacına uygun tasarlanan üçlü elektrot sisteminde kullanılmak üzere 3B baskı teknolojisi kullanılarak hazırlanan çalışma elektrotu ile alınan ölçümlerle çeşitli elektrokimyasal analizler yapılmıştır. Buna yönelik yapılan çalışmalar arasında çözelti içerisinde, yüzeye adsorbe edilerek, karbodimid kimyasıyla kovalent olarak yüzeye bağlanma ile dsDNA tayini gerçekleştirilmesi ve hibridizasyon deneyleri yer almaktadır.

Biyosensör uygulamalarında yapılan elektrokimyasal analizlerin hazırlanan elektrot (3DcbE) kullanılarak incelenen parametreler aşağıda anlatılmaktadır.

4.2.1 DNA bağlanması ve tespitine ait sonuçlar

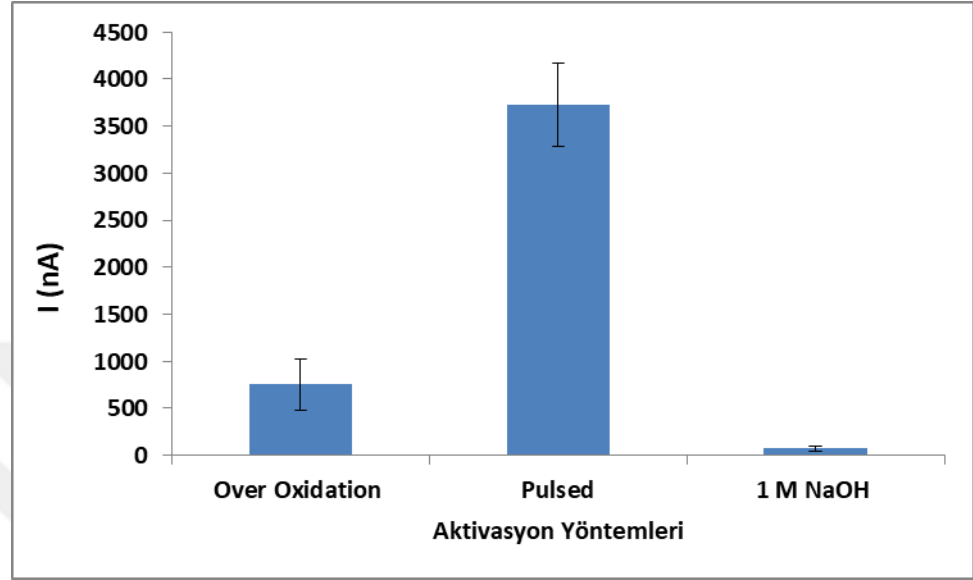
Bu çalışmada hazırlanan 3DcbE ile dsDNA çözeltisinin elektrokimyasal tayini yapılmıştır. Bölüm 3.3.1’de bahsedilen parametreler tek tek incelenmiştir.

4.2.1.1 Seçilen 3 aktivasyon yönteminin dsDNA tespiti üzerindeki etkilerinin karşılaştırılmasına ait sonuçlar:

Elektrotlar sırayla over oxidation, pulsed ve 1 M NaOH aktivasyon yöntemlerine tabii tutulmuşlardır ve ardından her biriyle 50 ppm dsDNA çözeltisine ait +1.0 V’daki Guanin bazının yükseltgenme sinyalinin tespiti gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.17’de 3 farklı aktivasyon yöntemi uygulanan elektrotlar ile DPV tekniğiyle alınan sonuçlarda 50 ppm dsDNA derişimine karşılık gelen yükseltgenme sinyallerine ait histogram grafiği gösterilmiştir. Üç farklı aktivasyon yöntemi ile aktive edilen elektrotların ile alınan ölçümlerdeki yükseltgenme sinyalleri arasında oluşan akım farkı incelendiğinde pulsed yöntemi kullanılarak aktivasyonu gerçekleştirilen elektrotların DNA bağlamaya daha yatkın olduğu görüldü. Bu nedenle DNA görüntülemesi gerçekleştirilen

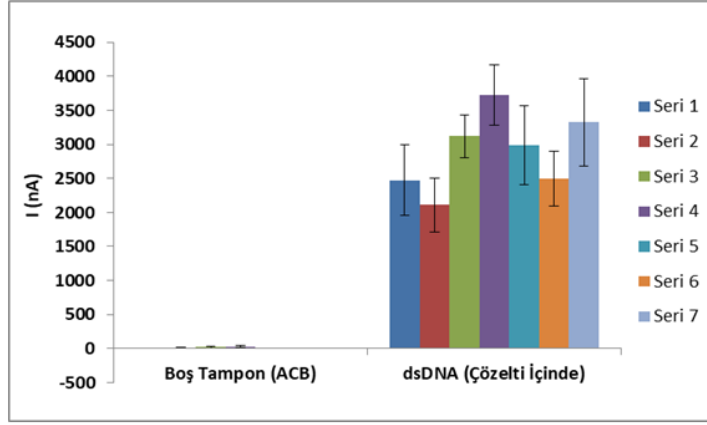
alışmalara ‘**pulsed aktivasyon yöntemi**’ kullanılan elektrotlar ile devam edilmiştir. Bu sonuç bize görüntülenmek istenen kimyasala, moleküle göre aktivasyon yöntemlerinin daha farklı verimlilikler sağlayabileceğini göstermektedir.



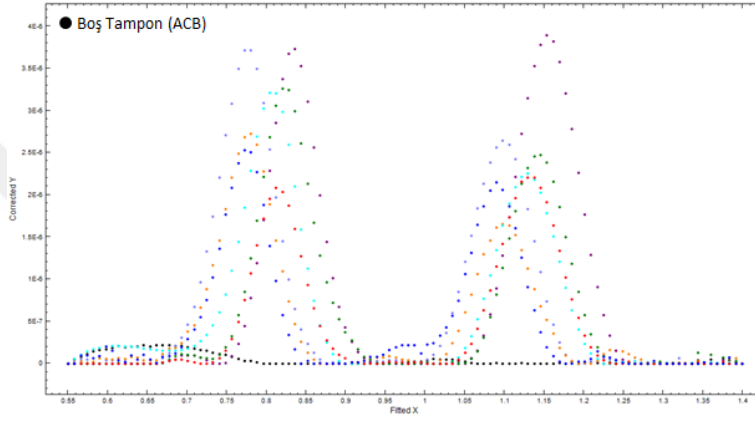
Şekil 4.17. 3 farklı aktivasyon yöntemiyle aktive edilen elektrotların 50 ppm derişim değeriindeki dsDNA çözeltisi içerisinde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyaline ait akım değeriğerlerinin histogram grafikleri.

4.2.1.2 Seçilen aktivasyon yöntemi kullanılarak farklı bağlama yöntemleri ile dsDNA tayinine ait sonuçlar:

Elektrotların aktivasyonu pulsed aktivasyon yöntemi ile gerçekleştirildikten sonra Bölüm 3.3.1’de bahsedilen dsDNA bağlama yöntemleri (çözelti içinde, adsorbe yüzeyde, kovalent bağlı yüzeylerde) ile **farklı elektrot serileriyle** 50 ppm derişimdeki dsDNA tayini gerçekleştirilmiştir ve sinyallerin ‘Guanin’ bazına ait olduğunu göstermek amacıyla boş ACB tamponu ile kıyaslanmıştır.



(a)

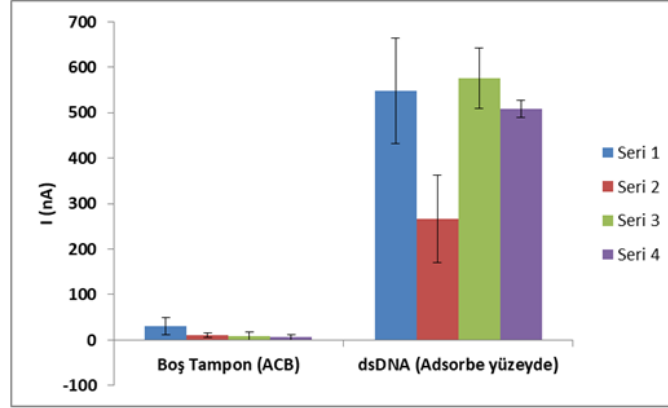


(b)

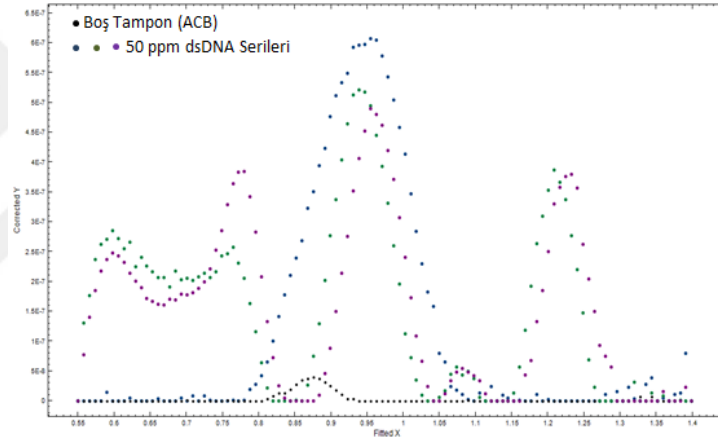
Şekil 4.18. Farklı elektrot serilerine ait 50 ppm derişimdeki dsDNA çözeltisinde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait, (a); histogram grafiğı, (b); voltamogram grafiğı.

Şekil 4.18’de görüldüğü üzere çözelti içerisinde 50 ppm derişimde dsDNA Bölüm 3.3.1.1’de bahsedilen şekilde hazırlanmıştır. dsDNA tespiti 7 farklı elektrot serisiyle gerçekleştirilmiş olup, her seride en az 3 elektrot ile ölçüm alınmıştır. ‘Guanin’ bazına ait yükseltgenme sinyalleri yorumlanmıştır. DPV tekniğı ile alınan sonuçlarda +0.8 V’da 50 ppm dsDNA derişimine karşılık gelen yükseltgenme sinyaline ait voltamogram grafiğı incelenmiştir. 7 farklı seri ile alınan 50 ppm dsDNA’ya ait ‘guanin’ bazının yükseltgenme sinyalinin aritmetik ortalaması ve standart sapması; $2890,98 \pm 560,64$ nA olarak hesaplanmıştır. Elde edilen yanıtlar birbirinden çok büyük farklılıklar göstermemiştir. 3DcbE ile ölçülen ‘guanin’ sinyallerinde 0.2 V’luk bir kayma gözlenmiştir. Bu kayma, elektrotların hammaddesinden veya çözelti içerisinde ACB tamponunun kendine

ait sinyali nedeniyle bir girişim gerçekleşmiş olabilir ancak artan konsantrasyonlarda DNA deneylerinde linner artış gördüğümüz için bu durumun DNA tayinini engellemediğini görmekteyiz.



(a)

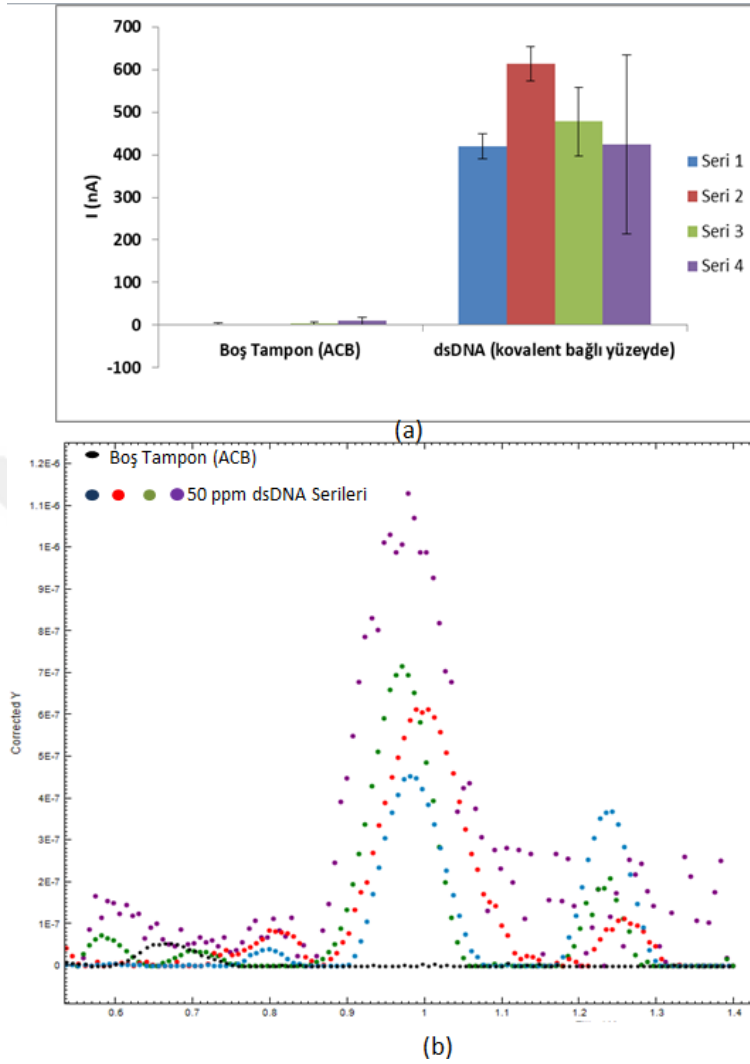


(b)

Şekil 4.19. Farklı elektrot serilerine ait 50 ppm derişimdeki dsDNA'nın adsorbe yüzeyde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait, (a); histogram grafiği, (b); voltamogram grafiği.

Şekil 4.19'da görüldüğü üzere elektrot yüzeyine 50 ppm derişimde dsDNA adsorbe edilerek tespiti için Bölüm 3.3.1.2'de bahsedilen prosedürler uygulanmıştır. Deneyler 4 farklı elektrot serisiyle gerçekleştirilmiş olup, her seride en az 3 elektrot ile ölçüm alınmıştır. 'Guanin' bazına ait yükseltgenme sinyalleri yorumlanmıştır. DPV tekniği ile alınan sonuçlarda +0.97 V'da 50 ppm dsDNA derişiminde 'Guanin' bazının yükseltgenme sinyaline ait voltamogram grafiği incelenmiştir. 4 farklı seri ile alınan 50 ppm dsDNA'ya ait 'Guanin'

bazının yükseltgenme sinyalinin aritmetik ortalaması ve standart sapması; $474,28 \pm 140,92$ nA olarak hesaplanmıştır.



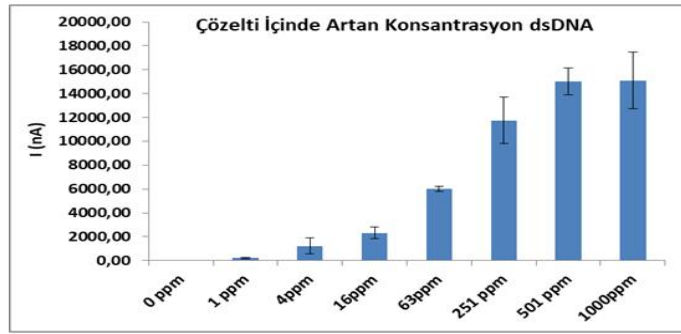
Şekil 4.20. Farklı elektrot serilerine ait 50 ppm derişimdeki dsDNA elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanmasıyla elde edilen Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait, (a); histogram grafiğı, (b); voltamogram grafiğı.

Şekil 4.20’de görüldüğü üzere 50 ppm derişimdeki dsDNA elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanarak dsDNA tespiti için Bölüm 3.3.1.3’de bahsedilen prosedürler uygulanmıştır. Deneyler 4 farklı elektrot serisiyle gerçekleştirilmiş olup, her seride en az 3 elektrot ile ölçüm alınmıştır. ‘Guanin’ bazına ait yükseltgenme sinyalleri yorumlanmıştır. DPV tekniğı ile alınan

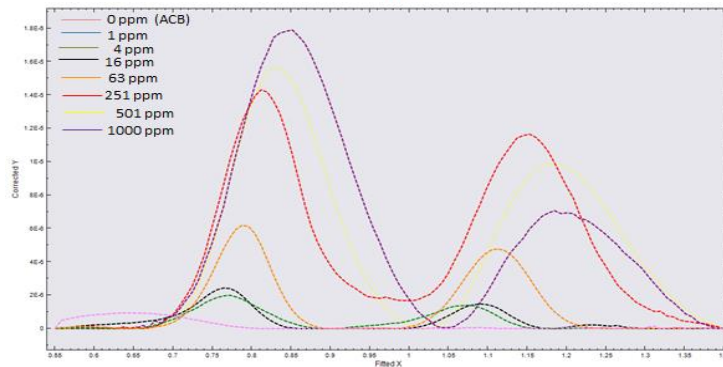
sonuçlarda +0.97 V'da 50 ppm dsDNA derişiminde 'Guanin' bazının yükseltgenme sinyaline ait voltamogram grafiğı incelenmiştir. 4 farklı seri ile alınan 50 ppm dsDNA'ya ait 'guanin' bazının yükseltgenme sinyalinin aritmetik ortalaması ve standart sapması; $483,9854 \pm 89,73$ nA olarak hesaplanmıştır. Bu da beklentimiz üzerinde bir sonuçtur.

4.2.1.3 Artan derişimlerde dsDNA tayini:

Bu çalışmada Bölüm 3.3.1.4'de bahsedilen prosedürler uygulanmış olup ilk olarak 1, 4, 16, 63, 126, 251, 501 ve 1000 ppm olmak üzere artan derişimlerde hazırlanmış olan dsDNA çözeltisinin elektrokimyasal tayini yapılmıştır. dsDNA çözeltisinin artan derişim değerlerine sahip parametrelerin ölçümleri, 3DcbE'lar kullanılarak AUTOLAB üzerinden ardışık olarak dörder kez alınmıştır ve 'Guanin' bazına ait yükseltgenme sinyalleri yorumlanmıştır.



(a)

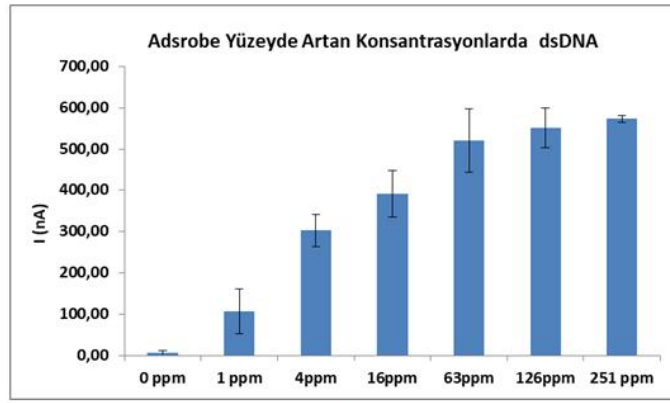


(b)

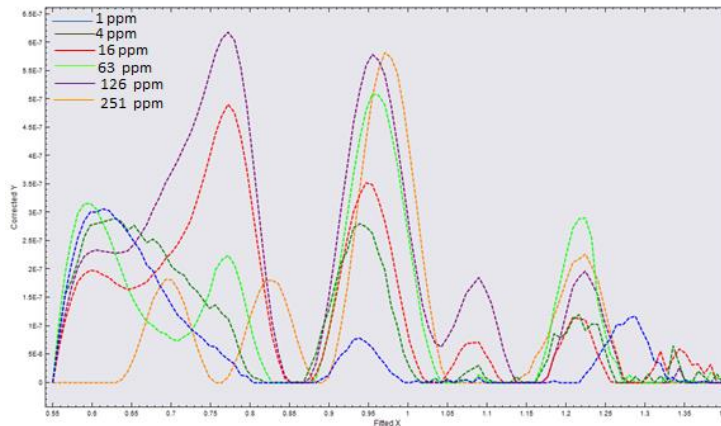
Şekil 4.21. Artan derişimlerdeki dsDNA çözeltilerinde Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun (0 ppm) sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait; (a); histogram grafiğı, (b); voltamogram grafiğı.

Şekil 4.21’de DPV tekniği ile alınan sonuçlarda artan dsDNA derişimine karşılık gelen Guanin bazının yükseltgenme sinyaline ait voltamogram grafiği incelenmiştir. Elde edilen ‘Guanin’ sinyalleri 0.2 V’luk bir kayma ile +0.8 V’da gözlenmiştir.

Bir diğer çalışmada 1, 4, 16, 63, 126 ppm olmak üzere artan derişimlerde hazırlanmış olan dsDNA çözeltisi elektrot yüzeylerine adsorbe edilerek elektrokimyasal tayin yapılmıştır. dsDNA çözeltisinin artan derişim değerlerine sahip parametrelerin ölçümleri, 3DcbE’lar kullanılarak AUTOLAB üzerinden ardışık olarak üçer kez alınmıştır ve ‘Guanin’ bazına ait yükseltgenme sinyalleri yorumlanmıştır.



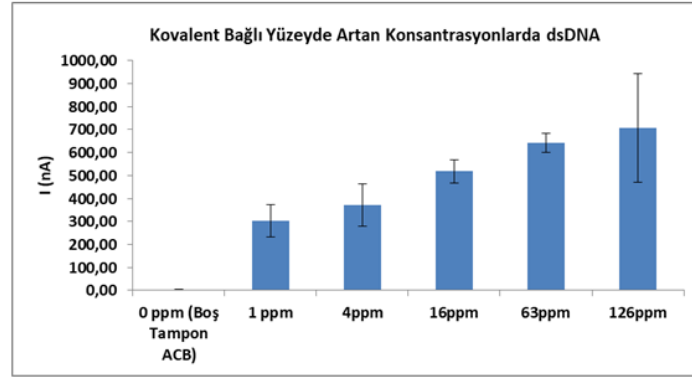
(a)



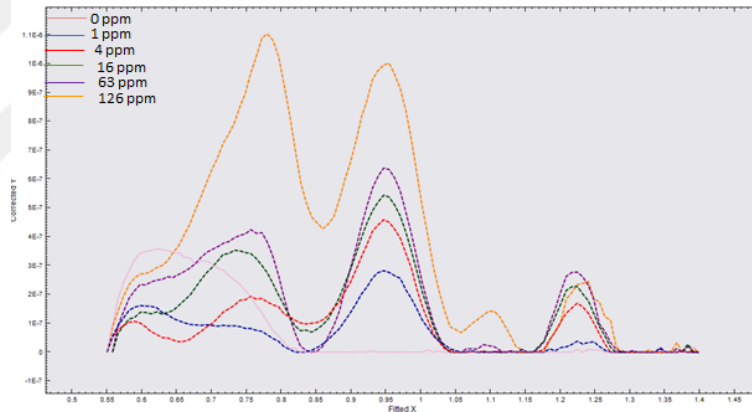
(b)

Şekil 4.22 Artan derişimlerdeki dsDNA elektrot yüzeyine adsorbe edilerek Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun (0 ppm) sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait; (a); histogram grafiği, (b); voltamogram grafiği.

Bir diğer çalışmada ise 1, 4, 16, 63, 126 ppm olmak üzere artan derişimlerde hazırlanmış olan dsDNA çözeltisi elektrot yüzeylerine karbodimid kimyasıyla kovalent olarak bağlanarak elektrokimyasal tayin yapılmıştır. dsDNA çözeltisinin artan derişim değerlerine sahip parametrelerin ölçümleri, 3DcbE'lar kullanılarak AUTOLAB üzerinden ardışık olarak üçer kez alınmıştır ve 'Guanin' bazına ait yükseltgenme sinyalleri yorumlanmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.23. Artan derişimlerdeki dsDNA elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanıp Guanin bazına ait yükseltgenme sinyallerinin ve boş ACB tamponunun (0 ppm) sinyallerinin DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin kıyaslanmasına ait; (a); histogram grafiğı, (b); voltamogram grafiğı.

Her üç DNA bağlama yöntemiyle gerçekleştirilen artan konsantrasyonlarda DNA'nın voltametrik ölçümleri sonuçları bize elde edilen pikin Guanin pikine ait olduğunu ve derişime bağlı olarak arttığını göstermektedir.

Tablo 4.3 3 farklı dsDNA tespit metoduyla gerçekleştirilen deney sonuçlarına ait validasyon parametrelerine ait değerler

Validasyon Parametreleri / dsDNA tespit metotları	Çalışma Aralığı (Range)	Gözlenebilme Sınırı (LOD)	Doğrusallık (Linearity) (R^2)	Tayin Sınırı (LOQ)
Çözelti içerisinde	1 - 501 ppm	1,59 ppm	0,9258	1,69
Adsorbe yüzeyde	1 - 63 ppm	0,14 ppm	0,9756	0,43
Kovalent bağlı yüzeyde	1 - 63 ppm	0,04 ppm	0,9812	0,07

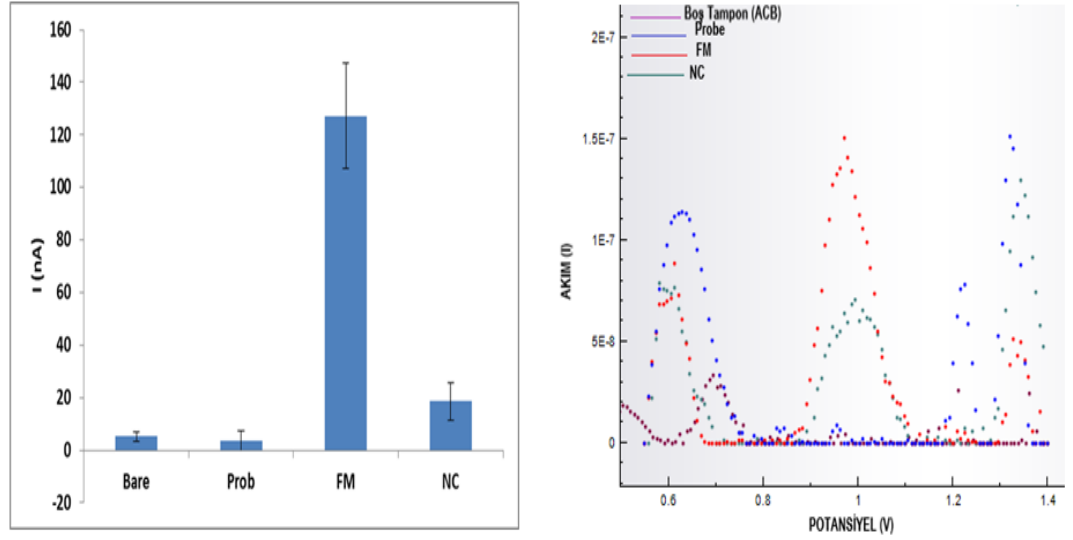
Tablo 4.3’de hazırlanan 3DcbE ile gerçekleştirilen 3 farklı dsDNA tayin metoduna ait analitik performanslarının karşılaştırılması üzerine validasyon değerleri yer almaktadır. Çalışma aralığı ‘Guanin’ bazına ait yükseltgenme değerinin sabitlediği noktaya göre seçilmiş olup, diğer değerler histogram grafiklerinden elde edilen kalibrasyon eğrisine göre oluşturulan denklemler ile hesaplanmıştır.

3 farklı DNA bağlama metodu ile gerçekleştirilen artan konsantrasyonlarda dsDNA çalışmaları incelendiğinde en yüksek Guanin yükseltgenme sinyaline ait değerlerin çözelti içerisinde dsDNA bağlama yönteminde elde edildiği tespit edilmiş olup, çalışmanın geri kalanına bu metot ile devam edilmiştir. Ancak her üç yönteminde kendine göre kullanım kolaylığı, standart sapma değerleri olduğu için farklı avantaj ve dezavantajları olduğu söylenebilir.

4.2.2 Hibridizasyon çalışmalarına ait sonuçlar

Bu çalışmada nükleik asit hibridizasyonu belirlenen optimum koşullar altında 5 ppm prob dizi ile 5 ppm hedef dizi (FM) ve 5 ppm tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Prob dizisinin elektrot yüzeyine bağlanması ile prob dizisinin karşılığı olan hedef dizi ile birbirlerine hidrojen bağıyla bağlanarak hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Prob-hedef dizi hibridizasyonu sonrasında alınan ölçümler sonucunda oluşan voltametrik sinyallerin I (nA) değerleri hibridizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

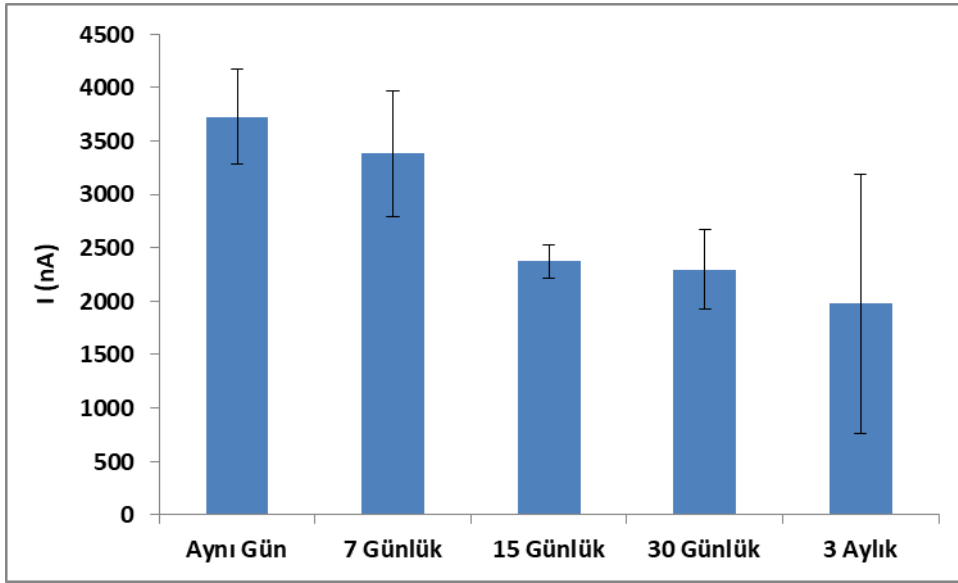


Şekil 4.24. Elektrot yüzeyinin prob dizi ile bağlanması (hibridizasyondan önce) ve prob ile sentetik hedef dizi (FM) ve tüm bazları hedeften farklı dizi (NC)'nin hibridizasyonundan DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin (a); histogram grafiği, (b); voltamogram grafiği.

Şekil 4.24'de görüldüğü üzere, elektrot yüzeyinde ortalama $128 \pm 19,99$ nA FM değeri elde edilmiştir. Hibridizasyon gerçekleştiği, biyosensör seçiciliği için önemli olan FM/NC ayrımının yüksek olduğu görülmüştür. Non-spesifik dizi ile gerçekleştirilen hibridizasyon sonrasında prob diziler ile elde edilen sonuçlara yakın sonuçlar bağlanma olmadığını göstermiştir. Prob dizi olarak inozin modifiyeli prob kullanılarak 1.0 V'da Guanin sinyali elde edilmeyerek, FM ile Guanin sinyalinin artışı gözlenmesi hedeflendi ve geliştirilen elektrot kullanılarak oldukça yüksek verimlilikte hibridizasyon tayini gerçekleştirilebildiği saptandı.

4.2.3 3DcbE'lerin stabilite çalışmalarına ait sonuçlar

3DcbE'lerin baskıları gerçekleştirildiği günden itibaren ne kadar süre ile özelliklerini koruduğunu görmek üzere baskıdan sonra oda sıcaklığında bekletilen elektrotlar ile 7., 15., 30. günlerde ve 3. ayda 1000 ppm (1000 µg/mL) stok dsDNA çözeltisinden ACB tamponu içinde 50 ppm konsantrasyonda dsDNA çözeltisi Bölüm 3.3.3'de bahsedildiği gibi hazırlanarak içerisinde voltametrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.25. Elektrotların basıldıkları tarihten itibaren farklı zamanlarda 50 ppm dsDNA tayinine ait DPV yöntemiyle elde edilen akım değerlerinin histogram grafiği.

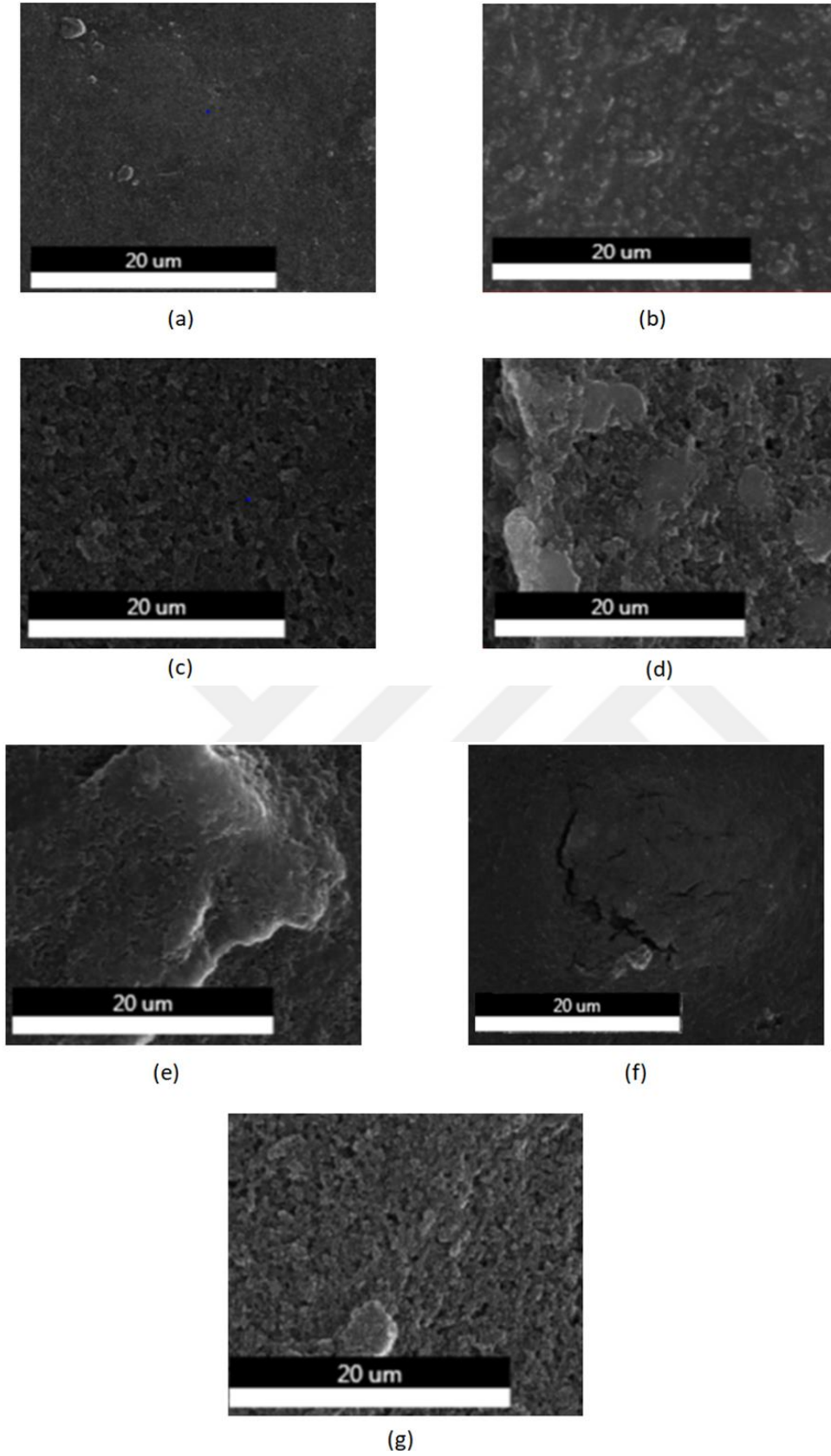
Tablo 4.4 Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçlarının karşılaştırılması

Günler	Aynı gün	7. gün	15. gün	30. gün	3. ay
I (nA) ve Standart Sapma	3725,54 ± 445,9 nA	3379,96 ± 591,0 nA	2496,76 ± 131,3 nA	2296,4 ± 373,0 nA	1974,08 ± 1213,6 nA
Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) (%RSD)		%6,89	% 27,94	%33,56	%43,45

Tablo 4.4’de tekrarlanabilirlik (%RSD) değerleri verilmiştir. 7., 15., 30. gün ve 3. aya ait sonuçların herbiri basım günü ve ölçümlerin gerçekleştirildiği gün aynı olan deney sonuçları ile kıyaslanmıştır. RSD göreceli standart sapma anlamına gelmektedir ve sonuçların ortalamasının hassasiyetini vermektedir. $(\text{Standart sapma}/\text{ortalama}) \times 100$ formülü ile RSD değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin küçük olması ölçümün daha hassas olduğu anlamına geldiği için elektrotların basıldıkları tarihten itibaren 3 aya kadar kullanımı %43 performansla sağlıklı sonuçlar verecektir. Zamanla RSD değerlerinde hassasiyet azalmış olsa da Bölüm 4.2.1.2’de bahsedilen 7 farklı seri ile alınan 50 ppm dsDNA’ya ait ‘Guanin’ bazının yükseltgenme sinyalinin aritmetik ortalaması; 2890,98 nA’ye hala yakın sonuçlar vermektedirler. Bu yüzden saklama koşulları geliştirilerek elektrotların tekrarlanabilirlik sonuçları daha da iyileştirilebilir ve piyasaya sürülebilirlik gösterilmiş bulunmaktadır.

4.2.4 3DcbE’lerin taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelenmesi

Şekil 4.26’da aktivasyonsuz 3DcbE, işlenmemiş CB/PLA filament ve aktivasyonlu (1 M NaOH, Over Oxidation, Pulsed, DMF, NaBH₄) 3DcbE’ler ile elde edilen SEM görüntüleri gösterilmiştir. Aktivasyonlu yüzeylerde, aktivasyonsuz yüzeye göre boşluklar meydana geldiği görülmüştür. Bu da PLA’nın kaldırıldığını ve karbon siyahı nanopartiküllerin açığa çıkarak elektrot performansı artışına katkıda bulunduğunu göstermektedir (Rocha et al., 2020).



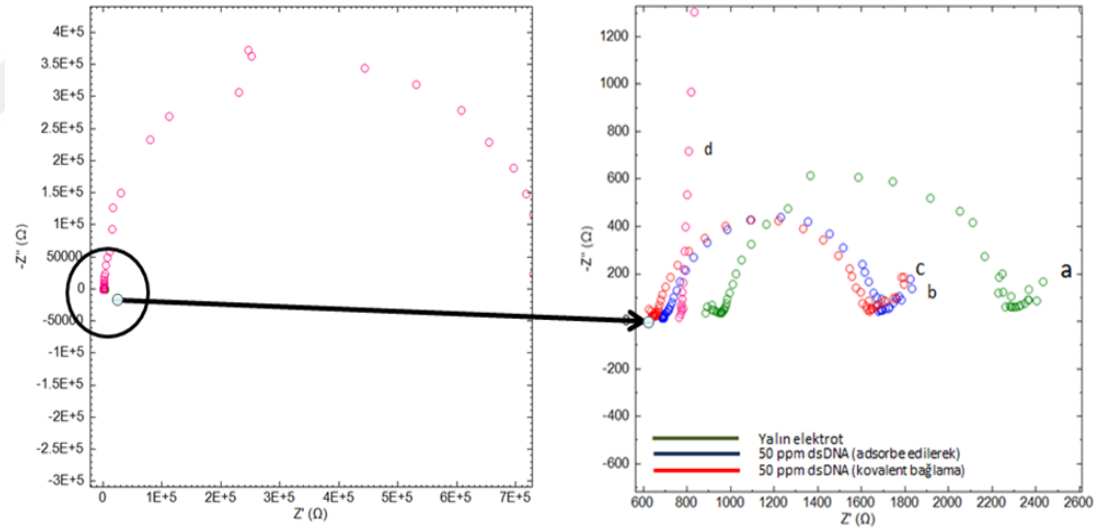
Şekil 4.26. 3DcbE yüzeylerinin SEM görüntüleri, (a); CB/PLA filament, (b); aktivasyonsuz, (c); NaBH₄ ile aktivasyonlu, (d); 1 M NaOH ile aktivasyonlu, (e); over oxidation ile aktivasyonlu, (f); Pulsed ile aktivasyonlu, (g); DMF ile aktivasyonlu.

4.2.5 3DcbE'lar ile EIS tekniği ile ölçüm sonucunda elde edilen

bulguların incelenmesi

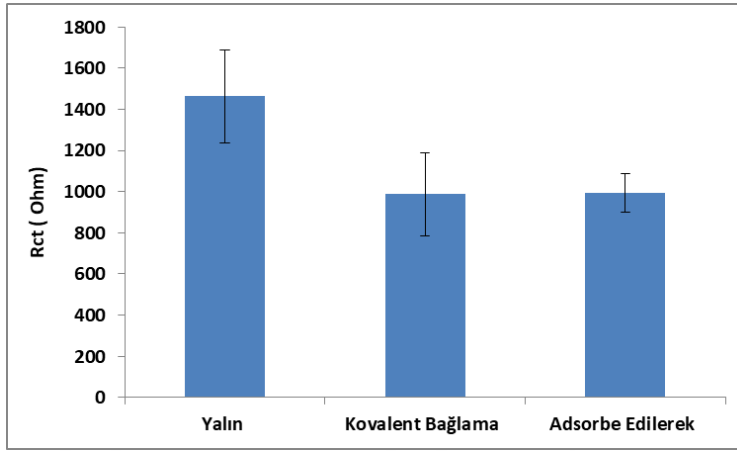
50 ppm dsDNA tayinine yönelik elektrot yüzeyine adsorbe edilerek ve karbodimid kimyasıyla kovalent bağlama metotları Bölüm 3.3.1.2'de ve 3.3.1.3'de detaylı olarak anlatılmıştır. Bu çalışmada aktivasyonsuz, pulsed ile aktivasyonlu ve aktivasyon sonrası adsorbe edilerek ve karbodimid kimyasıyla kovalent olarak 50 ppm dsDNA bağlanan elektrot yüzeyleri 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ çözeltisi içerisinde EIS tekniği ile ölçülerek elde edilen direnç değerlerinin sonuçları incelenmiştir.

Şekil 4.27'de aktivasyonsuz elektrot ile aktivasyonlu elektrotlarla dsDNA tayinine yönelik EIS tekniği ile alınan ölçümlere ait Nyquist diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 4.27. EIS tekniği ile 3DcbE'ların aktivasyonlu ve aktivasyonsuz Nyquist diyagramları ve yapılan 50 ppm dsDNA tayininin incelenmesi, (a); pulsed aktivasyonlu yalın elektrot (3DcbE), (b); elektrot yüzeyine 50 ppm dsDNA adsorbe edilerek, (c); elektrot yüzeyine karbodimid kimyasıyla 50 ppm dsDNA kovalent olarak bağlanarak, (d); aktivasyonsuz elektrot.

Şekil 4.28’de 50 ppm dsDNA tayinine yönelik EIS tekniği ile alınan ölçümlere ait histogram grafiği incelenmiştir.



Şekil 4.28. EIS tekniği ile yapılan 50 ppm dsDNA tayininden elde edilen Rct değerlerinin histogram grafikleri.

Şekil 4.27’de gösterilen ilk Nyquist diyagramında görüldüğü gibi aktivasyon uygulanmayan 3DcbE’un Rct değeri oldukça yüksektir. Aktivasyon uygulanan elektrotlarda (yalın 3DcbE) ise bu değerin düştüğü görülmektedir. Rct değerlerinin düşüşü sensör yüzeyinin iletken hale geldiğini bunun da elektron transferini kolaylaştırdığı sonucuna varmak mümkündür. Bu sonuca göre, uygulanan aktivasyon yönteminin geçerli olduğu söylenebilir. 3DcbE’ların yüzeyine adsorbe edilerek ve karbodimid kimyasıyla kovalent olarak bağlanan DNA değerlerine bakıldığında ise Rct değerinde tekrar bir düşüş gözlemlenmiştir. Bunun nedeni çoğunluğu yalıtkan olan elektrotların aktivasyonla yüzeyleri belirli bir oranda iletken hale getirilse de hala yalıtkanlığını koruması nedeniyle yarı-iletken DNA molekülün yüzeye bağlanarak bir miktar daha iletkenlik artışı gerçekleştirmesi olarak yorumlanabilir.

4.3 3DcbE’lar ile PGE ve SPE’ların Kıyaslanmasına Ait Sonuçlar

Tasarlanan çalışma elektrotları (3DcbE), tek kullanımlık elektrotlar (PGE) ve Perde Baskılı Elektrotlar (SPE) ile Bölüm 3.3.7’de bahsedilen elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirilerek sonuçlar Tablo 4.5’de kıyaslanmıştır.

Tablo 4.5 3DcbE'lar ile PGE ve SPE'ların validasyon parametrelerinin kıyaslanması

ELEKTROTLAR	Ortalama (nA) ve Standart Sapma (63 ppm dsDNA)	Çalışma Aralığı (Range)	Gözlenebilme Sınırı (LOD)	Doğrusallık (R ²)	Tayin Sınırı (LOQ)
Çözeltili İçinde (dsDNA)					
3DcbE	5995,95 ± 204,89	1-501 ppm	1,59 ppm	0,9258	1,69
PGE	1127,17 ± 214,34	0,5-32 ppm	1,36 ppm	0,9303	1,51
SPE	989,13 ± 7,54	1-126 ppm	2,11 ppm	0,6789	2,14
Adsorbe Yüzeyde (dsDNA)					
3DcbE	520,18 ± 76,41	1-63 ppm	0,14 ppm	0,9756	0,43
PGE	3087,13 ± 315,76	0,25-63 ppm	0,53 ppm	0,9692	0,54
SPE	711,41 ± 6,63	0,25 -32 ppm	0,015 ppm	0,9887	0,061
Kovalent Bağlı Yüzeyde (dsDNA)					
3DcbE	641,81 ± 40,51	1-63 ppm	0,04 ppm	0,9812	0,07
PGE	2628,77 ± 372,10	0,25-32 ppm	0,53 ppm	0,9671	0,59
SPE	664,56 ± 23,77	0,25-32 ppm	0,57 ppm	0,9937	0,62

Tablo 4.6 Elektrotlar ve maliyetleri

Elektrotlar	Maliyet (Ortalama 25 adet için)
3DcbE	4,52 TL = 0,25 \$
PGE	9 TL
SPE	1817,57 TL=100 €

Tablo 4.6 incelendiğinde tasarlanan 3B baskılı elektrotların diğer elektrot çeşitlerine göre oldukça uygun maliyetli oluşu en dikkat çeken özelliğidir. (Maliyetler 1 \$=18,10 ve 1 €=18,18 TL olarak hesaplanmıştır.) Tablo 4.5’de ise farklı dsDNA bağlama yöntemlerinin sonuçlarına ait validasyon parametreleri incelenmiştir. 3DcbE’lar ile elde edilen sonuçların laboratuvarımızda ve uluslararası literatürde sıklıkla kullanılan PGE ve SPE ile elde edilen analitik

performanslara oldukça yakın sonuçlar verdiği ve bu 3DcbE'lerin oldukça yüksek verimlilik ve kapasitede çalışabilirliği görülmektedir. Laboratuvar koşullarında istenilen zamanda, istenilen miktarda üretilebilmesi ve tasarım olarak da oldukça çeşitlilik sağlayabilecek olması, uygun maliyeti ve analitik performansı 3DcbE'lerin ticarileşebilecek elektrokimyasal biyosensörlerin sensör yüzeyi olarak önemli bir parçası olacağını göstermektedir.



5.GENEL SONUÇLAR

Bu çalışmada 3 boyutlu baskı teknolojisinin hızlı, kolay uygulanabilirliği, kolay kullanımı, tasarımda çeşitlilik sağlaması gibi özelliklerinden yararlanılarak elektrokimyasal çalışmalarda kullanılmak üzere elektrot geliştirilmiş ve bir DNA tayinine yönelik biyosensör çalışmalarında da kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Tez kapsamında bir elektrokimyasal sistemde kullanılmak üzere 3 boyutlu yazıcı kullanılarak çalışma elektrotu üretimi sağlanmış olup bu parçanın elektrot olarak vazife gördüğü, gerekli analitik performansı sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İlk olarak bu elektrotların farklı kalınlıklarda gösterdiği elektrot performansı değerlendirilip, her ne kadar 2 mm altındaki kalınlıklarda iyi sonuçlar elde edilse de baskı sırasındaki bazı teknik sorunlar sebebiyle hem iletkenlik hem baskı kolaylığı açısından çalışılacak olan elektrot kalınlığı 2 mm olarak belirlenmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerin devamında bu elektrotlar kullanılmıştır. Elektrotların elektrot performansının en iyi hale getirilmesi için Bölüm 3.2.2.2’de bahsedilen aktivasyon yöntemleri uygulanmış ve içlerinden 3 tanesi (1 M NaOH ile kimyasal aktivasyon, Pulsed ile Aktivasyon, Over Oxidation) DNA tayini çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen bu aktivasyon yöntemleri ile artan konsantrasyonlarda çift sarmal DNA’nın tespitine yönelik adsorbe etme, karbodimid kimyasıyla kovalent olarak yüzeye bağlama ve çözelti içinde yapılan deneyler kapsamında biyomolekül olarak balık sperminden elde edilen çift sarmallı dsDNA ile hibridizasyon tayininde kullanılan prob ve hedef dizileri ile tüm bazları hedeften farklı olan bir dizi kullanılırken DNA tayininde (DPV) tekniği kullanılarak sonuçlar alınmıştır ve ‘Guanin’ bazının yükseltgenme sinyallerinin (+1.0V)’taki ‘base line correlation’ değerleri yorumlanmıştır. Çift sarmallı dsDNA tayini sonuçları neticesinde Pulsed Aktivasyon yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Sonuç olarak yapılan bu çalışmalarda puls aktivasyon uygulanan elektrotlar ile DNA tespitinde çalışmalara çözelti içinde DNA tespiti gerçekleştirilerek devam etmeye karar verilmiştir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalar içinde geliştirilen elektrotlar ile DNA ile ilgili çalışma olmamakla birlikte farklı biyomolekülerin tespitinde elde edilen çalışmalarda Pulsed Aktivasyon ile iyi sonuçlar elde edildiği belirtilmiş olup tez

kapsamında gerçekleştirilen deney sonuçlarının da bu çalışmalara paralel çıktığını belirtebiliriz.

Hazırlanan bu sensör yüzeği vazifesindeki 3DcbE’lar; DNA hasarı kaynaklı hastalıkların tespitinde kullanılmak üzere yapılacak çalışmalar için 3 boyutlu baskı teknolojisi ve elektrokimyanın yeterli duyarlılığa sahip, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir oluşu özelliklerinin bir araya geldiği, oldukça avantajlı özelliklere sahip, minyatürleştirilebilir olan biyosensörlerin geliştirilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Yapılacak sonraki çalışmalar ile rutin kullanıma uygun, küültölmüş, uygun maliyetli, piyasaya sürülebilir hasta başı teşhis sistemlerinde kullanılabilen cihazların üretimi hedeflenmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdalla, A. and Patel, B. A.**, 2020, 3D-printed Electrochemical Sensors: A New Horizon for Measurement of Biomolecules, *Current Opinion in Electrochemistry*, 20, 78–81pp.
- Adkins, J., Boehle, K. and Henry, C.**, 2015, Electrochemical Paper-based Microfluidic Devices, *Electrophoresis*, 36(16), 1811–1824pp.
- Altay, İ.**, 2020, Farklı Bileşimdeki Metallerin Ferrisiyanür İyonunun Elektrokimyasal İndirgenmesinde Katot Olarak Kullanılabilirliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , Malatya, 101s.
- Anfossi, L., Di Nardo, F., Cavalera, S., Giovannoli, C. and Baggiani, C.**, 2018, Multiplex lateral flow immunoassay: An overview of strategies towards high-throughput point-of-need testing, *Biosensors*, 9(2), 1–14pp.
- Asensio, L., González, I., García, T. and Martín, R.**, 2008, Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Food Control*, 19(1), 1–8pp.
- Aykut, U. ve Temiz, H.**, 2006, Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2006(3), 51–59s.
- Bahadır, E. B. and Sezgintürk, M. K.**, 2016, Lateral flow assays: Principles, designs and labels, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286–306pp.
- Bebenek, A. and Kunkel, T. A.**, 2000, DNA replication fidelity, *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 497–529pp.
- Beilen, J. B. van. and Li, Z.**, 2002, Enzyme technology: An overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 338–344pp.
- Beitler, B. G., Abraham, P. F., Glennon, A. R., Tommasini, S. M., Lattanza, L. L., Morris, J. M. and Wiznia, D. H.**, 2022, Interpretation of regulatory factors for 3D printing at hospitals and medical centers, or at the point of care. *3D Printing in Medicine*, 8(1), 1–7pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bertolino, M., Battegazzore, D., Arrigo, R. and Frache, A.,** 2021, Designing 3D printable polypropylene: Material and process optimisation through rheology. *Additive Manufacturing*, 40, 101944, 1-9pp.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. and Estrela, P.,** 2016, Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8pp.
- Biology LibreTexts,** Nükleotid yapısı ve Anti sarmal DNA yapısı, <https://bio.libretexts.org/Special:Search?qid=&fpid=230&fpth=&query=nucleotide&type=wiki> , (Erişim Tarihi : 25 Haziran 2022)
- Bonanni, A., Esplandiu, M. J., Pividori, M. I., Alegret, S. and Del Valle, M.,** 2006, Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(7), 1195–1201pp.
- Borisov, S. M. and Wolfbeis, O. S.,** 2008, Optical Biosensors. *Optical Biosensors*, 108(941), 423–463pp.
- BoyutKat,** ABS Filament, <https://www.boyutkat.com/3d-yazici-filament/abs-filament-nedir/> , (Erişim Tarihi: 1 Temmuz 2022).
- Brett, C. M. A. and Brett, A. M. O.,** 1993, Electrochemistry: Principles , Methods , and Applications, Oxford University Press, New York.
- Browne, M. P., Novotný, F., Sofer, Z. and Pumera, M.,** 2018, 3D Printed Graphene Electrodes' Electrochemical Activation, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(46), 40294–40301pp.
- Cantopcu, M.,** 2014, Nanomalzemelerle Modifiye Edilmiş Tek Kullanımlık Sensörlerle Dopaminin Elektrokimyasal Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Cardoso, R. M., Castro, S. V. F., Silva, M. N. T., Lima, A. P., Santana, M. H. P., Nossol, E., Silva, R. A. B., Richter, E. M., Paixão, T. R. L. C. and Muñoz, R. A. A.,** 2019, 3D-printed flexible device combining sampling and detection of explosives, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 292, 308–313pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cardoso, R. M., Kalinke, C., Rocha, R. G., dos Santos, P. L., Rocha, D. P., Oliveira, P. R., Janegitz, B. C., Bonacin, J. A., Richter, E. M. and Munoz, R. A. A.**, 2020, Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review, *Analytica Chimica Acta*, 1118, 73–91pp.
- Cardoso, R. M., Silva, P. R. L., Lima, A. P., Rocha, D. P., Oliveira, T. C., do Prado, T. M., Fava, E. L., Fatibello-Filho, O., Richter, E. M. and Muñoz, R. A. A.**, 2020, 3D-Printed graphene/polylactic acid electrode for bioanalysis: Biosensing of glucose and simultaneous determination of uric acid and nitrite in biological fluids, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 307, 127621.
- Carvalho, R. M., Ferreira, V. S. and Lucca, B. G.**, 2021, A novel all-3D-printed thread-based microfluidic device with an embedded electrochemical detector: First application in environmental analysis of nitrite, *Analytical Methods*, 13(11), 1349–1357pp.
- Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J. and Henry, C. S.**, 2015, Recent Developments in Paper-Based Micro fluidic Devices, *Analytical Chemistry*, 87, 19–41pp.
- Chan, H. N., Tan, M. J. A. and Wu, H.**, 2017, Point-of-care testing: Applications of 3D printing, *Royal Society of Chemistry*, 17(16), 2713–2739pp.
- Clark, L. C. and Lyons, C.**, 1962, Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 29–45pp.
- Contreras-Naranjo, J. E., Perez-Gonzalez, V. H., Mata-Gómez, M. A. and Aguilar, O.**, 2021, 3D-printed hybrid-carbon-based electrodes for electroanalytical sensing applications, *Electrochemistry Communications*, 130.
- Curulli, A.**, 2020, Nanomaterials in electrochemical sensing area: Applications and challenges in food analysis, *Molecules*, 25(23), 1-35pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- D'Souza, S. F.**, 2001, Microbial biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 337–353pp.
- de Oliveira, G. C., Pereira, L. C., Silva, A. L., Semaan, F. S., Castilho, M. and Ponzio, E. A.**, 2018, Acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) composite electrode for the simultaneous determination of vitamins B2 and B6 in pharmaceutical samples, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 22(5), 1607–1619pp.
- Dennison, M. J. and Turner, A. P. F.**, 1995, Biosensors for environmental monitoring, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 13(94), 1–12pp.
- Doğan Topal, B.**, 2011, Bazı Antiviral ve Antineoplastik İlaç Etken Maddelerinin DNA ile Etkileşimi ve Elektrokimyasal Analizleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1–338s.
- dos Santos, P. L., Katic, V., Loureiro, H. C., dos Santos, M. F., dos Santos, D. P., Formiga, A. L. B. and Bonacin, J. A.**, 2019, Enhanced performance of 3D printed graphene electrodes after electrochemical pre-treatment: Role of exposed graphene sheets, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 281, 837–848pp.
- Driussi, B., Matos, M., Rocha, V., Jannone, E., Henrique, F., Amaral, C., Andrea, S., Helida, C., Oliveira, G. De, Hernane, B. and Ribeiro, C. A.**, 2019, *Evaluation of commercially available polylactic acid (PLA) filaments for 3D printing applications*, 3, 555–562pp.
- Durusöz, H.**, 2019, Biyomoleküllerin Algılanmasına Yönelik Elektrokimyasal Nanobiyosensörler Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ekşi, H.**, 2011, Nanoparçacık Etiketli Biyosensör Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-136s.
- Eokul Tv**, Denatürasyon ve Renatürasyon, <https://www.eokultv.com/proteinler/15141/denaturasyon-ve-renaturasyon> , (Erişim Tarihi: 8 Haziran 2022).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H., McMullan, M., Karadeniz, H. and Sharma, S.,** 2010, Streptavidin modified carbon nanotube based graphite electrode for label-free sequence specific DNA detection, *Electroanalysis*, 22(6), 611–617pp.
- Eroglu, M. E.,** 2019, Meloksikamın Elektrokimyasal Davranışının İzlenmesi ve Tayini için Voltametrik Anodik Adsorptif Sıyırma Yöntemlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-69s.
- Ferreira, P. A., de Oliveira, F. M., de Melo, E. I., de Carvalho, A. E., Lucca, B. G., Ferreira, V. S. and da Silva, R. A. B.,** 2021, Multi sensor compatible 3D-printed electrochemical cell for voltammetric drug screening, *Analytica Chimica Acta*, 1169, 338568.
- Foster, C. W., Down, M. P., Zhang, Y., Ji, X., Rowley-Neale, S. J., Smith, G. C., Kelly, P. J. and Banks, C. E.,** 2017, 3D Printed Graphene Based Energy Storage Devices, *Scientific Reports*, 7, 1–11pp.
- Ghorbani, F., Abbaszadeh, H., Mehdizadeh, A., Ebrahimi-Warkiani, M., Rashidi, M. R. and Yousefi, M.,** 2019, Biosensors and nanobiosensors for rapid detection of autoimmune diseases: a review, *Microchimica Acta*, 186(12), 1–11pp.
- Gokhare Vinod G., Raut D. N. and Shinde D. K.,** 2017, A Review paper on 3D-Printing Aspects and Various Processes Used in the 3D-Printing, *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 6(06), 953–958pp.
- Guan, J. G., Miao, Y. Q. and Zhang, Q. J.,** 2004, Impedimetric biosensors, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(4), 219–226pp.
- Gupta, B. and Revagade, N.,** 2007, Poly (lactic acid) fiber : An overview. *Progress in Polymer Science*, 32, 455–482pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gusmão, R., Browne, M. P., Sofer, Z. and Pumera, M.,** 2019, The capacitance and electron transfer of 3D-printed graphene electrodes are dramatically influenced by the type of solvent used for pre-treatment, *Electrochemistry Communications*, 102, 83–88pp.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H. and Martin, K.,** 2018, Molecular Cell Biology 5th Ed., *W.H. Freeman and Company*, New York.
- Homola, J.,** 2003, Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3), 528–539pp.
- Hong, Y., Wu, M., Chan, G., Dai, Z., Zhang, Y., Chen, G. and Dong, X.,** 2016, 3D Printed Microfluidic Device with Microporous Mn₂O₃-Modified Screen Printed Electrode for Real-Time Determination of Heavy Metal Ions, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(48), 32940–32947pp.
- Ispas, C. R., Crivat, G. and Andreescu, S.,** 2012, Review: Recent Developments in Enzyme-Based Biosensors for Biomedical Analysis, *Analytical Letters*, 45(2–3), 168–186pp.
- João, A. F., Squissato, A. L., Richter, E. M. and Muñoz, R. A. A.,** 2020), Additive-manufactured sensors for biofuel analysis: copper determination in bioethanol using a 3D-printed carbon black/polylactic electrode, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(12), 2755–2762pp.
- Kalinke, C., Neumsteir, N. V., Aparecido, G. D. O., Ferraz, T. V. D. B., Dos Santos, P. L., Janegitz, B. C. and Bonacin, J. A.,** 2020, Comparison of activation processes for 3D printed PLA-graphene electrodes: Electrochemical properties and application for sensing of dopamine, *Analyst*, 145(4), 1207–1218pp.
- Kara Kadayırcılar, P.,** 2007, Klinik Tanıya Yönelik DNA Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Katseli, V., Economou, A. and Kokkinos, C.,** 2019, Single-step fabrication of an integrated 3D-printed device for electrochemical sensing applications, *Electrochemistry Communications*, 103, 100–103pp.
- Kerman, K., Kobayashi, M. and Tamiya, E.,** 2004, Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology, *Measurement Science and Technology*, 15(2).
- Kim, D. S., Kim, Y. T., Hong, S. B., Kim, J., Huh, N. S., Lee, M. K., Lee, S. J., Kim, B. Il, Kim, I. S., Huh, Y. S. and Choi, B. G.,** 2016, Development of lateral flow assay based on size-controlled gold nanoparticles for detection of hepatitis B surface antigen, *Sensors (Switzerland)*, 16(12).
- Kim, H. and Lee, S.,** 2020, Characterization of Electrical Heating of Graphene/PLA Honeycomb Structure Composite Manufactured by CFDM 3D Printer, *Fashion and Textiles*, 7(1), 1–18pp.
- Kissinger, P. T. and Heineman, W. R.,** 1963, Cyclic voltammetry, *Journal of Chemical Education*, 60(9), 702–706pp.
- Kıvrak, E.,** 2019, Klinik Analizlere Yönelik Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensör Tasarımı, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 106 s.
- Kozel, T. R. and Burnham-marusich, A. R.,** 2017, Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Part, Present, and Future, *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8), 2313–2320pp.
- Küçüküven, E. ve Yılmaz, İ.,** 2014, İmmünokromatografik Kart Testlerinin Çalışma Prensipleri ve Üretim Teknikleri, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(3), 46–54s.
- Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A.,** 2006, Microbial biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 568(1–2), 200–210pp.
- Li, X., Tian, J., Garnier, G. and Shen, W.,** 2010, Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(2), 564–570pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, Y.**, 2006, Section 2.3 Biosensors, *Handbook of Agricultural Engineering Information Technology*, VI, 52–93pp.
- Ligaj, M., Jasnowska, J., Musiał, W. G. and Filipiak, M.**, 2006, Covalent attachment of single-stranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups, *Electrochimica Acta*, 51(24), 5193–5198pp.
- Liu, J., Wang, J., Li, Z., Meng, H., Zhang, L., Wang, H., Li, J. and Qu, L.**, 2018, A lateral flow assay for the determination of human tetanus antibody in whole blood by using gold nanoparticle labeled tetanus antigen, *Microchimica Acta*, 185(2).
- Loo, A. H., Chua, C. K. and Pumera, M.**, 2017, DNA biosensing with 3D printing technology. *Analyst*, 142(2), 279–283pp.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J. and Chan, D. W.**, 2001, Immunosensors - Principles and applications to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 314(1–2), 1–26pp.
- Ma, D. L., He, H. Z., Leung, K. H., Zhong, H. J., Shiu-Hin Chan, D. and Leung, C. H.**, 2013, Label-free luminescent oligonucleotide-based probes, *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3427–3440pp.
- Manzanares-Palenzuela, C. L., Hermanova, S., Sofer, Z. and Pumera, M.**, 2019, Proteinase-sculptured 3D-printed graphene/polylactic acid electrodes as potential biosensing platforms : towards enzymatic modeling of 3D-printed structures , *Nanoscale*, 25, 12124–12131pp.
- Manzanares Palenzuela, C. L., Novotný, F., Krupička, P., Sofer, Z. and Pumera, M.**, 2018, 3D-Printed Graphene/Polylactic Acid Electrodes Promise High Sensitivity in Electroanalysis, *Analytical Chemistry*, 90(9), 5753–5757pp.
- Martins, G., Gogola, J. L., Budni, L. H., Janegitz, B. C., Marcolino-Junior, L. H. and Bergamini, M. F.**, 2021, 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection, *Analytica Chimica Acta*, 1147, 30–37pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Masai, H. and Foiani, M.**, 2017, DNA Replication From Old Principles to New Discoveries, Springer (electronic), Singapore, 580p.
- Mayorga-Martinez, C. C., Pumera, M. and Adaris, M. L.**, 2020, 3D-printed graphene direct electron transfer enzyme biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 151.
- Mehrotra, P.**, 2016, Biosensors and their applications - A review, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159pp.
- Moina, C. and Ybarr, G.**, 2012, Fundamentals and Applications of Immunosensors, *Advances in Immunoassay Technology*, March, 65–80pp.
- Monošík, R., Stred’ansky, M. and Šturdík, E.**, 2012, Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26(1), 22–34pp.
- Muluneh, M. and Issadore, D.**, 2014, Microchip-based detection of magnetically labeled cancer biomarkers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 101–109 pp.
- Muñoz, J., Montes, R. and Baeza, M.**, 2017, Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization, architecture surface and bio-sensing, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 97, 201–215pp.
- Nabaei, V., Chandrawati, R. and Heidari, H.**, 2018, Magnetic biosensors: Modelling and simulation, *Biosensors and Bioelectronics*, 103(December 2017), 69–86 pp.
- Neto, B. A. D. and Lapis, A. A. M.**, 2009, Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: Principles, design, synthesis, applications and trends, *Molecules*, 14(5), 1725–1746pp.
- Olivera, S., Muralidhara, H. B., Venkatesh, K., Gopalakrishna, K. and Vivek, C. S.**, 2016, Plating on acrylonitrile–butadiene–styrene (ABS) plastic: a review. *Journal of Materials Science*, 51(8), 3657–3674pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Osteryoung, J.**, 1993, Voltammetry for the Future, *Accounts of Chemical Research*, 26(3), 77–83pp.
- Pal, A., Amreen, K., Dubey, S. K. and Goel, S.**, 2021, Highly Sensitive and Interference-Free Electrochemical Nitrite Detection in a 3D Printed Miniaturized Device, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 20(2), 175–182pp.
- Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S. and Mohapatra, E.**, 2016, Biosensors in health care: The milestones achieved in their development towards lab-on-chip-analysis, *Biochemistry Research International*, 2016, 12p.
- Pirzada, M. and Altintas, Z.**, 2019, Nanomaterials for healthcare biosensing applications, *Sensors (Switzerland)*, 19(23), 56p.
- Popov, V. N.**, 2004, Carbon nanotubes: Properties and application. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 43(3), 61–102pp.
- Prodromidis, M. I.**, 2010, Impedimetric immunosensors-A review, *Electrochimica Acta*, 55(14), 4227–4233pp.
- Qian, L., Li, Q., Baryeh, K., Qiu, W., Li, K., Zhang, J., Yu, Q., Xu, D., Liu, W., Brand, R. E., Zhang, X., Chen, W. and Liu, G.**, 2019, Biosensors for early diagnosis of pancreatic cancer: a review, *Translational Research*, 213, 67–89pp.
- Quesada-González, D. and Merkoçi, A.**, 2015, Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 73, 47–63pp.
- Rahim, T. N. A. T., Abdullah, A. M., Akil, H. M., Mohamad, D. and Rajion, Z. A.**, 2015, Preparation and characterization of a newly developed polyamide composite utilising an affordable 3D printer, *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 34(19), 1628–1638pp.
- Rasouli, P., Steefel, C. I., Mayer, K. U. and Rolle, M.**, 2015, Benchmarks for multicomponent diffusion and electrochemical migration, *Computational Geosciences*, 19(3), 523–533pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Razavi, H. and Janfaza, S.**, 2015, Medical nanobiosensors: A tutorial review, *Nanomed J*, 2(2), 74–87pp.
- Redondo, E., Muñoz, J. and Pumera, M.**, 2021, Green activation using reducing agents of carbon-based 3D printed electrodes: Turning good electrodes to great, *Carbon*, 175, 413–419pp.
- Richter, E. M., Rocha, D. P., Cardoso, R. M., Keefe, E. M., Foster, C. W., Munoz, R. A. A. and Banks, C. E.**, 2019, Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform, *Analytical Chemistry*, 91(20), 12844–12851pp.
- Rivas, G. A., Pedano, M. L. and Ferreyra, N. F.**, 2005, Electrochemical biosensors for sequence-specific DNA detection, *Analytical Letters*, 38(15), 2653–2703pp.
- Rocha, D. P., Squissato, A. L., da Silva, S. M., Richter, E. M. and Munoz, R. A. A.**, 2020, Improved electrochemical detection of metals in biological samples using 3D-printed electrode: Chemical/electrochemical treatment exposes carbon-black conductive sites, *Electrochimica Acta*, 335, 1–11pp.
- Rodríguez-Panes, A., Claver, J. and Camacho, A. M.**, 2018, The influence of manufacturing parameters on the mechanical behaviour of PLA and ABS pieces manufactured by FDM: A comparative analysis, *Materials*, 11(8), 21p.
- Sadık, Ş. E., M., S. H., A., E. M., Gürol, İ. ve Koçak, F. E.**, 2016, Quartz Crystal Microbalance (QCM) Tabanlı Sensör ile Glikoz Seviyelerinin Ölçülmesi, *TIPTEKNO'16*, 433–436pp.
- Schmickler, W.**, 1996, Electronic effects in the electric double layer, *Chemical Reviews*, 96(8), 3177–3200pp.
- Scholz, F.**, 2009, Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications 2nd, revised and extended edition, Springer, Germany.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shahrubudin, N., Lee, T. C. and Ramlan, R.**, 2019, An overview on 3D printing technology: Technological, materials, and applications, *Procedia Manufacturing*, 35, 1286–1296pp.
- Silva, A. L., Salvador, G. M. da S., Castro, S. V. F., Carvalho, N. M. F. and Munoz, R. A. A.**, 2021, A 3D Printer Guide for the Development and Application of Electrochemical Cells and Devices, *Frontiers in Chemistry*, 9(July), 1-19pp.
- Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D. S., Datta, S., Prasad, R. and Singh, J.**, 2020, Biological Biosensors for Monitoring and Diagnosis, *Springer Singapore*, 317–335pp.
- Srinivasan, R., Prathap, P., Raj, A., Kannan, S. A. and Deepak, V.**, 2020, Influence of fused deposition modeling process parameters on the mechanical properties of PETG parts, *Materials Today: Proceedings*, 27, 1877–1883pp.
- St John, A.**, 2010, The Evidence to Support Point-of-Care Testing. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 31(3), 111–119pp.
- String Fixer**, Polylactide, <https://stringfixer.com/tr/Polylactide> , (Erişim Tarihi: 1 Temmuz 2022)
- Sun, A. C., Yao, C., Venkatesh, A. G. and Hall, D. A.**, 2016, An Efficient Power Harvesting Mobile Phone-Based Electrochemical Biosensor for Point-of-Care Health Monitoring, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 235(1), 126–135pp.
- Suni, I. I.**, 2008, Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(7), 604–611pp.
- Syedmoradi, L., Daneshpour, M., Alvandipour, M., Gomez, F. A., Hajghassem, H. and Omidfar, K.**, 2017, Point of care testing: The impact of nanotechnology, *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 373–387pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thakur, M. S. and Ragavan, K. V.**, 2013, Biosensors in food processing, *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 625–641pp.
- TurkceWiki**, RNA Dünyası Hipotezi,
http://www.turkcewiki.org/wiki/RNA_d%C3%BCnyas%C4%B1_hipotezi ,
 (Erişim Tarihi: 30 Haziran 2022)
- Vaněčková, E., Bouša, M., Nováková Lachmanová, Š., Rathouský, J., Gál, M., Sebechlebská, T. and Kolivoška, V.**, 2020, 3D printed polylactic acid/carbon black electrodes with nearly ideal electrochemical behaviour, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 857.
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C. C., Senthilkumaran, B. and Prakash, H.**, 2016, Recent advances in biosensor technology for potential applications - an overview, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 1–9pp.
- Vo-Dinh, T. and Cullum, B.**, 2000, Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6–7), 540–551pp.
- Wei, H., Sun, J. J., Xie, Y., Lin, C. G., Wang, Y. M., Yin, W. H. and Chen, G. N.**, 2007, Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure, *Analytica Chimica Acta*, 588(2), 297–303pp.
- Wijesuriya, D. C. and Rechnitz, G. A.**, 1993, Biosensors based on plant and animal tissue, *Biosensors and Bioelectronics*, 8, 155–160pp.
- Xiao, J. and Gao, Y.**, 2017, The manufacture of 3D printing of medical grade TPU, *Progress in Additive Manufacturing*, 2(3), 117–123pp.
- Yunus, S., Jonas, A. M. and Lakard, B.**, 2013, Potentiometric Biosensors, *Encyclopedia of Biophysics*, Springer, 1941–1946pp.
- Zhang, Y. and Tadigadapa, S.**, 2004, Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels, *Biosensors and Bioelectronics*, 19(12), 1733–1743pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışma sürecimde edindiğim tüm bilgiler ve ihtiyaç duyduğum tüm konularda gösterdiği anlayış ve destek için saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarına maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarına verdiği değerli katkılar için ve yaşadığım aksaklıklarda yardımını hiçbir zaman esirgemediği için Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Görevlisi Mehmet Ali EGE'ye teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamında geçirdiğim yüksek lisans tez çalışma sürecimi daha verimli, daha keyifli hale getiren, ihtiyaç duyduğum anlarda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen çalışma arkadaşlarım Ezgi KIVRAK'a, Sezin YÜKSEL'e, İrem AYDIN KIRLANGIÇ'a ve Marina SERİN'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatımda aldığım her kararda, her doğrumda veya yanlışımda büyük bir sabırla yanımda oldukları, hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri için canım aileme annem Sevilay GÜNDEN'e, babam Ali GÜNDEN'e ve yüksek lisans sürecimde her anımda yanımda olan canım kardeşim Osman GÜNDEN'e teşekkür ederim.

Bu süreçte desteklerini uzak mesafelerden bile hissedebildiğim can dostlarım İbrahim DEMİRKOL, Raziye DOLAY, Şeyda EREN, Defne TÜRKMENÖĞLU ve Melisa AKOL'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

26. / 09 / 2022

Fatma Selen GÜNDEN

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi ve Yeri:

E-mail:

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: Pamukkale Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği (2019)

Lisans: Anadolu Üniversitesi Sağlık Yönetimi (Halen)

Lise: Aydın Adnan Menderes Anadolu Lisesi (2015)

Tamamladığı ve Halen Yürüttüğü Proje Çalışmaları:

1.Elektrokimyasal Biyosensör Çalışmalarına Yönelik 3 Boyutlu Baskı Tekniği (3D Printing) ile Elektrot Hazırlanması (Yüksek lisans tezi) (BAP Proje No: FYL-2021-23218), 2022