

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ DOKTORA PROGRAMI**

**ZİNCİRLEME POLİMERAZ REAKSİYONU İÇİN MİKRO
SICAKLIK DÖNGÜLEYİCİ TASARIMI VE
GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN

GAMZE TİLBE İNCE

DOKTORA TEZİ

ANKARA – 2024

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ DOKTORA PROGRAMI**

**ZİNCİRLEME POLİMERAZ REAKSİYONU İÇİN MİKRO
SICAKLIK DÖNGÜLEYİCİ TASARIMI VE
GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN

GAMZE TİLBE İNCE

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ ERDEM HABERAL

TEZ EŞ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET YÜKSEKKAYA

ANKARA – 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Gamze Tilbe İNCE tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:19 / 07 / 2024

Tez Adı: Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu için Mikro Sıcaklık Döngüleyici Tasarımı ve Gerçekleştirilmesi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Erdem Haberal - Başkent Üniversitesi (Danışman)	
Prof. Dr. Hilal Göktaş - Ankara Üniversitesi (Başkan)	
Prof. Dr. Erkan Yurtcu - Kırıkkale Üniversitesi	
Prof. Dr. Cengiz Koçum - Başkent Üniversitesi	
Doç. Dr. Mehmet Cem Çatalbaş - Ankara Üniversitesi	

ONAY

Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Enstitü Müdürü

Tarih : ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 25 / 07 / 2024

Öğrencinin Adı, Soyadı : Gamze Tilbe İnce

Öğrencinin Numarası : 21720161

Anabilim Dalı : Biyomedikal Mühendisliği

Programı : Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Dr. Öğr. Üyesi Erdem Haberal

Tez Başlığı : Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu için Mikro Sıcaklık Döngüleyici Tasarımı ve Gerçekleştirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 199 sayfalık kısmına ilişkin, 25 / 07 / 2024 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %8'dir. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Öğrenci Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Erdem HABERAL

Tarih: ... / ... / 20...

*Bu tezi hayatımı anlamlandıran, motivasyon kaynağım sevgili kızım Dolunay Mavi'ye,
Sevgili dayım Rüstem ÖZİŞİK'a ve
Yol gösterenim, canım babam Cengiz ŞEN'e ithaf ediyorum.*

Gamze Tilbe İNCE
Ankara - 2024

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve öneriler ile beni yönlendiren, tecrübelerini paylaşan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Erdem HABERAL'a teşekkür ederim.

Ayrıca eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YÜKSEKKAYA'ya çalışmalarım ve ilgili araştırmalarım sırasında sürekli desteği, paha biçilmez rehberliği ve sabrı için teşekkür ederim.

Motive olmama yardımcı olan, değerli bilgileri ile araştırmamı teşvik edip desteklerini asla esirgemeyen, deneylerimin yapılması sırasında sabırla destek olan değerli hocam Prof. Dr. Erkan YURTCU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez için tez komitemin geri kalanına teşekkür etmek isterim: Pof. Dr. Cengiz KOÇUM, Prof. Dr. Hilal GÖKTAŞ ve Doç. Dr. Mehmet Cem ÇATALBAŞ'a anlayışlı yorumları ve teşvikleri için teşekkür ederim.

En önemlisi, desteğiyle hep yanımda olan, sevgi dolu, destekleyici, teşvik edici ve sabırlı eşim Erdal'a teşekkür etmek istiyorum. Sen olmasan başaramazdım.

Son olarak aileme tüm sevgileri ve teşvikleri için teşekkür etmek isterim. Beni sorumluluk bilinciyle yetiştiren ve her konuda bana destek olan annem için. Teşekkür ederim..

ÖZET

Gamze Tilbe İNCE

ZİNCİRLEME POLİMERAZ REAKSİYONU İÇİN MİKRO SICAKLIK DÖNGÜLEYİCİ TASARIMI VE GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2024

Biyolojik ve kimyasal analitik cihazların mikroeletromekanik sistemler (MEMS) teknolojisi ile minyatürleştirilmesi, tıbbi ve mikrobiyolojik teşhis ve diğer biyolojik analizler için önemli olmuştur. Mevcut veya ortaya çıkmakta olan bulaşıcı hastalıklar, zamanında teşhisi iyileştirmek için hasta başında (POC) test ihtiyacını arttırmaktadır.

Nükleik asit tespiti için geleneksel yöntemler birçok adım gerektirmektedir. Bu teknolojilerin bazıları yüksek hassasiyette olabilir. Ancak, düşük algılama limitleri, zaman ve enstrümantasyon gereksinimleri nedeniyle POC cihazlarını geliştirmede geride kalmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, örnek ön işleme, reaksiyonlar, ayırmalar ve teşhis dahil tüm analitik adımların küçük bir çip üzerindeki mikro kanallarda verimli ve otomatik olarak gerçekleştirilmesine izin veren mikroakışkan teknolojiler kullanılmaktadır.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden biri olan polimeraz zincir reaksiyonu veya zincirleme polimeraz reaksiyonu (PCR), basitliği nedeniyle en çok kullanılan yöntem olmuştur. Mikroakışkan teknolojiler, PCR işlemlerinin hız, maliyet, taşınabilirlik, verim ve otomasyon gibi potansiyel faydaları olan bir çipte minyatürleştirilmesini sağlamaktadır.

Tez çalışması ile PCR gerçekleştirebilmek için gerekli olan mikroçip ve mikro sıcaklık döngüleyici tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan mikroçip tasarımında Bilgisayar Destekli Tasarım (CAD) programı kullanılmış, üretiminde ise CAD yöntemlerinden biri olan lazer kesici kullanılmış ve tek odacıklı bir çip üretilmiştir. Mikroçip üretiminde kullanılan malzemeler lamel, çift taraflı bant (DSA) ve polimetilmetakrilat (PMMA) polimeri olmuştur.

Mikro sıcaklık döngüleyici üretiminde kullanılmak üzere ısıtıcı eleman olarak Peltier modülü seçilmiştir. Sıcaklık kontrollerinin gerçekleştirilmesinde mikrodenetleyici ve H-Köprü modülleri kullanılmıştır. Sıcaklık döngüleyici devre analizi öncelikle bir simülasyon

programında yapılmış ve PCR döngüsü gerçekleştirilebilmiştir. Daha sonra bu devreyi gerçekleyebilmek için uygun elemanlar temin edilmiştir. H köprü tipi sürücülerin modları, mikrodnetleyici ile nasıl sürüldüğüne ilişkin devre düzeneklerinin çalışması yapılmıştır. Motor sürme tekniklerinden biri olan darbe genişlik modülasyonu (PWM) tekniği ile H köprü sürme (bir mikrodnetleyici yardımı ile) denenmiştir. Temin edilen elemanlar ile öncelikle peltier modül sıcaklık testleri gerçekleştirilmiştir. Uygunlukları test edilen devre elemanları ile sıcaklık döngüsü kontrolü için geliştirilen PID kontrol algoritması birleştirilerek PCR döngüsü gerçekleştirilmiştir.

Isı transferi ve akışkan akışını simüle etmek için farklı bir CAD programı daha kullanılmıştır. Bu yazılım sonlu-eleman yöntemine dayanmaktadır. Fiziğin farklı alanlarından kısmi diferansiyel denklemleri birleştirmek ve çözmek için kolaylık sağlamaktadır. Akışkan akış modülü kullanılarak mikroçip içerisinde laminar akış simüle edilmiştir. Ayrıca ısı transfer modülü kullanılarak çip malzemelerindeki ısı transferi simüle edilmeye çalışılmıştır.

Tasarlanan mikro sıcaklık döngüleyici ile DNA örneği, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında amplifiye edilmiştir. Yapılan tasarımın PCR gerçekleştirdiğini test edebilmek için, sıcaklık döngüleyici üzerinde kullanılan örnek ticari bir sıcaklık döngüleyici kullanılarak da amplifiye edilmiş ve sonrasında uygun bir analiz yöntemiyle sonuçlar belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Mikroakışkanlar (microfluidics), Mikroçip, Sıcaklık Döngüleyici, Hasta Başı Teşhis Sistemleri (Point of Care Testing).

ABSTRACT

Gamze Tilbe İNCE

DESIGN AND IMPLEMENTATION OF MICRO TEMPERATURE CYCLER FOR POLYMERASE CHAIN REACTION

Başkent University Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biomedical Engineering

2024

Miniaturization of biological and chemical analytical devices with microelectromechanical systems (MEMS) technology has been important for medical and microbiological diagnostics and other biological analyses. Existing or emerging infectious diseases are increasing the need for point-of-care (POC) testing to improve timely diagnosis.

Traditional methods for nucleic acid detection require many steps. Some of these technologies can be highly sensitive. However, it lags behind in developing POC devices due to low detection limits, time and instrumentation requirements. To overcome these challenges, microfluidic technologies are used that allow all analytical steps, including sample pretreatment, reactions, separations, and diagnostics, to be performed efficiently and automatically in microchannels on a small chip.

Polymerase chain reaction (PCR), one of the nucleic acid amplification methods, has become the most used method due to its simplicity. Microfluidic technologies enable the miniaturization of PCR processes on a chip with potential benefits such as speed, cost, portability, efficiency and automation.

With the thesis study, the design and production of the microchip and micro temperature cycler required to perform PCR were carried out. For this purpose, Computer Aided Design (CAD) program was used in the microchip design, and a laser cutter, one of the CAD methods, was used in its production and a single-chamber chip was produced. The materials used in microchip production were coverslips, double-sided tape (DSA) and polymethylmethacrylate (PMMA) polymer.

Peltier module was chosen as the heating element to be used in the production of micro temperature cycler. Microcontroller and H-Bridge modules were used to perform temperature control. Temperature cycler circuit analysis was first made in a simulation

program and the PCR cycle could be performed. Then, appropriate elements were provided to implement this circuit. The modes of H bridge type drivers and the circuit mechanisms regarding how they are driven with a microcontroller have been studied. H-bridge driving (with the help of a microcontroller) has been tried with the pulse width modulation (PWM) technique, which is one of the motor driving techniques. Firstly, Peltier module temperature tests were carried out with the supplied elements. The PCR cycle was realized by combining the circuit elements whose suitability was tested with the PID control algorithm developed for temperature cycle control.

A different CAD program was used to simulate heat transfer and fluid flow. This software is based on the finite-element method. It makes it easy to combine and solve partial differential equations from different fields of physics. Laminar flow was simulated within the microchip using the fluid flow module. Additionally, an attempt was made to simulate the heat transfer in chip materials by using the heat transfer module.

The DNA sample was amplified with the designed micro temperature cycler at Kırıkkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology. To test that the design performed PCR, the sample used on the temperature cycler was also amplified using a commercial temperature cycler and the results were then determined with an appropriate analysis method.

KEYWORDS: Polymerase Chain Reaction (PCR), Microfluidics, Microchip, Temperature Cycler, Point of Care Testing.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xx
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç	2
1.2. Kapsam	3
1.3. Yöntem	3
1.4. Önceki Çalışmalar	3
1.4.1. COVID-19 ve Mikro PCR ile ilgili Çalışmalar	6
1.4.2. Patentler	10
2.TEMEL BİLGİLER.....	16
2.1. Nükleik Asitler	16
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	17
2.3. Tarihçe ve Genel Bilgiler: Geleneksel PCR Cihazları.....	20
2.4. PCR Çeşitleri.....	25
2.5. İzotermal Amplifikasyon.....	28
2.6. PCR Uygulama Alanları	30
2.7. PCR Sonrası Analiz	33
2.8. Hasta Başında Teşhis Yöntemleri	34
2.9. Mikroakışkanlar Teknolojisinin Hasta Başında Teşhis Yöntemleriyle Entegrasyonu.....	36
2.10.Mikroakışkan Tabanlı PCR Çipler.....	38
2.11.Mikroçip Üretiminde Kullanılan Malzemeler	39
2.12.Mikroçip Üretim Teknikleri	41
2.13.Mikro PCR Çip Çeşitleri.....	42
2.14.Mikro Sıcaklık Döngüleyici	43
2.15.Mikro Isıtıcılar ve Uygulamaları.....	46
2.16.Sıcaklık Döngüleyicide Soğutma	48
2.17.Mikrokanalda Akışkan Akışı ve Isı Transferi	49

2.17.1. Akışkan akışı.....	49
2.17.2. Isı transferi	50
2.18.Sayısal Simülasyon.....	52
2.19.Kontrol Sistemleri.....	53
2.20.Oransal İntegral Türev Kontrolörü.....	55
2.20.1. Oransal kontrolör	55
2.20.2. İntegral kontrolörü.....	56
2.20.3. Türev kontrolörü	56
2.21.PID Parametreleri	57
2.22.Ziegler Nichols Kapalı Döngü Ayar Yöntemi	59
2.23.Dinamik Analizler, Zaman Cevabı ve Transfer Fonksiyonu.....	62
2.24.Dijital/Sayısal Sistemlerde PID Kontrolörü	64
2.25.PID Kontrolör ile Sıcaklık Kontrolü.....	65
2.26.Termoelektrik Sistemler	69
2.27.Termoelektrik Sistemlerin Çalışma Esasları	69
2.26. Peltier Eleman	70
2.28.Transistör ve MOSFET	71
2.29.H-Köprüsü.....	72
2.30.Hız Kontrolü ve Darbe Genişlik Modülasyonu.....	73
2.31.Röle.....	74
2.32.Sıcaklık ve Ölçümü	74
2.33.Mikrodenetleyici Sistemler	78
3.MATERYAL ve YÖNTEM	79
3.1. Mikroçip Üretiminde Kullanılan Malzemeler	79
3.1.1. Çift taraflı bant	79
3.1.2. Lamel	80
3.1.3. Polimetilmetakrilat.....	80
3.2. Mikroçip Tasarımı.....	81
3.3. Mikro Sıcaklık Döngüleyici Tasarımı	87
3.3.1. Peltier Elemanlar	87
3.3.2. Kartuş Isıtıcı.....	88
3.3.3. Sıcaklık Sensörü.....	89
3.3.4. Mikrodenetleyici	91
3.3.5. Fan	94
3.3.6. H-Köprüsü.....	95

3.3.7. Röle	104
3.3.8. Bluetooth Modülü	106
3.4. Mikro Sıcaklık Döngüleyici Kutu Tasarımı	107
3.5. Sıcaklık Kontrol Devresi için Baskı Devre Tasarımı.....	111
4.YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	113
4.1. Peltier Modül Sıcaklık Testleri.....	113
4.2. Peltier Eleman ve Kartuş Isıtıcının PID Kontrolör ile Sıcaklık Kontrolü	116
4.3. TB6612FNG H-Köprü Modülü ve PID Kontrolör ile Peltier Sıcaklık Kontrolü	116
4.4. L298N H-Köprü Modülü ve PID Kontrolör ile Peltier Sıcaklık Kontrolü.....	132
4.5. Röle Modülü ile Kartuş Isıtıcı Sıcaklık Kontrolü	137
4.6. BTS7960 H-Köprü Modülü ve PID Kontrolör ile Peltier Sıcaklık Kontrolü.	140
4.7. Sıcaklık Döngüleyici Devresi	144
4.8. Transfer Fonksiyonu Yöntemini ile Sistemin Modellenmesi ve İncelenmesi.	148
4.9. DNA Amplifikasyonu için PCR Protokolü.....	158
4.10.Malzeme Listesi.....	159
5.SİMÜLASYONLAR.....	161
5.1. Laminar Akış ve Isı Transferi Simülasyonu	161
5.2. Sıcaklık Döngüleyici Elektronik Devre Simülasyonu.....	169
6.BULGULAR	174
7.SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	193
KAYNAKLAR.....	198

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Ticarileştirilmiş COVID-19 Teşhis Testleri [15], [20], [21].....	10
Tablo 2.1. Her bir PCR yönteminin yıllar içinde değişimi.....	23
Tablo 2.2. Piyasada bulunan hızlı PCR cihazlarının karşılaştırılması.....	24
Tablo 2.3. Ticari olarak kullanılmakta olan FDA onaylı d-PCR testleri [49]–[51].	28
Tablo 2.4. Biyomedikal analiz için ticari olarak temin edilebilen mikroakışkan sistem örnekleri.	37
Tablo 2.5. PCR çipleri için kullanılan soğutma tekniklerine genel bakış.	49
Tablo 2.6. PID Parametrelerinin Sisteme olan Etkisi.	58
Tablo 2.7. Ziegler-Nichols Ayarlama Tablosu [117].	60
Tablo 2.8. Ziegler – Nichols Kontrolör Kazançlarının Belirlenmesi [117].....	60
Tablo 2.9. Sıcaklık Döngüleyicilerin Kontrolör Tipi ve PCR Koşullarının Karşılaştırılması.	68
Tablo 2.10. Sıcaklık Döngüleyici Cihazlarında Kullanılan Sıcaklık Ölçüm Yöntemleri ve Karşılaştırmalar.	77
Tablo 3.1. Temin edilen malzemeler, özellikleri ve fiyatları.	79
Tablo 3.2. Çift taraflı bantlar ve özellikleri.	80
Tablo 3.3. Mikro kanal hacim hesabı tablosu. Hesaplamalar dikdörtgenler prizması hacim hesabı dikkate alınarak 24 mm x 50 mm boyutlu çip için yapılmıştır. İstenilen ve kullanılabilecek hacimler kırmızı ile belirtilmiştir.	82
Tablo 3.4. Termal Peltier Modüllerine ait özellikler tablosu.	88
Tablo 3.5. Arduino UNO ve Arduino Nano kartları özellikleri karşılaştırma tablosu.	93
Tablo 3.6. Rampage Helios C1 teknik özellikleri.	94
Tablo 3.7. L298N Pin Fonksiyonları (blok diyagrama göre).	97
Tablo 3.8. Motor A Doğruluk Tablosu.....	99
Tablo 3.9. Motor B Doğruluk Tablosu.....	99
Tablo 3.10. TB6612FNG Pin Fonksiyonları ve Açıklamaları.....	101
Tablo 3.11. T6612FNG Kontrol Fonksiyonları.....	102

Tablo 3.12. TB6612FNG ile L298N H-Köprü Karşılaştırılması.....	103
Tablo 3.13. BTS7960 Kontrol Pin Fonksiyonları ve Açıklamaları.	104
Tablo 3.14. Çift Kanallı Röle Modülü Bağlantıları.....	106
Tablo 4.1. Farklı PID kontrolör parametreleri kullanılarak elde edilen sonuçlar (95°C)..	155
Tablo 4.2. Farklı PID kontrolör parametreleri kullanılarak elde edilen sonuçlar (72°C)..	157
Tablo 4.3. PCR işlemi için örneğin bileşim oranı.	159
Tablo 4.4. Tasarımda Kullanılan Ana Parçalar.	160
Tablo 6.1. Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.	177
Tablo 6.2. 30 döngüden oluşan PCR protokolü için Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.....	181
Tablo 6.3. 45 döngüden oluşan PCR protokolü için Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.....	185
Tablo 6.4. 42 döngüden oluşan PCR protokolü için Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.....	192
Tablo 7.1. Mikroçip Kullanan Sıcaklık Döngüleyicilerin Tip, Boyut ve Hızının Karşılaştırılması.	195
Tablo 7.2. İnce Cidarlı Amplifikasyon Tüp Kullanan Sıcaklık Döngüleyicilerin Malzeme, Kontrolör ve PCR Koşulları Karşılaştırılması.	197

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. PCR Mikroçip ve Mikro Sıcaklık Döngüleyici Blok Diyagramı.	2
Şekil 1.2.a) “Microfluidic DNA amplification”, b) “PCR Chip”, c) “PCR ve COVID-19”, d) “POC ve COVID-19” anahtar kelimeleriyle aranan 2023 yılına kadar olan ilgili yayınlar, PubMed veri tabanından alınmıştır.	4
Şekil 1.3. COVID-19 semptomları ve tespitinde kullanılan altın standart PCR adımları.	7
Şekil 1.4. Üretilen minyatürize PCR Sistemi [17].	9
Şekil 1.5. US9044754B2 numaralı patent Isıtıcı ve termistörü kontrol eden devrenin bir düzenlemesinin blok diyagramı.	12
Şekil 1.6. US9044754B2 numaralı patent LTCC mikro PCR çipinin bir düzenlemesinin üç boyutlu görünümü.	12
Şekil 1.7. US2013/0101983A1 numaralı patent, Temassız mikro PCR sisteminin blok diyagramı (1; PDMS çip, 2; ısıtıcı, 3; kızılötesi sıcaklık sensörü).	15
Şekil 2.1. DNA örneği, primerler, nükleotidler, DNA polimerazdan oluşan PCR bileşenleri.	18
Şekil 2.2. PCR adımları; 1 denatürasyon; 2 bağlanma veya primer bağlanması; 3 uzama veya uzatma.	18
Şekil 2.3. Tipik Bir Polimeraz Zincir Tepkimesi Sıcaklık Döngüsü. Önce çift sarmallı DNA'yı denatüre etmek için sıcaklık yaklaşık 95°C'ye yükseltilmekte, ardından primerlerin bağlanmasını sağlamak için sıcaklık düşürülmekte (yaklaşık 55°C) ve son olarak polimerazın primerleri uzatması için sıcaklık 70-72°C'ye ayarlanmaktadır. Bir adımdan diğerine geçiş çok hızlı, yaklaşık 1 ila 2 saniye içinde gerçekleşmelidir.	19
Şekil 2.4. PCR uygulamalarına örnekler.	31
Şekil 2.5. POC Testinin ve POC Test Cihazlarının Çeşitli Avantajları.	35
Şekil 2.6. a) Kuyucuk/Odacık temelli PCR Mikroçip Tasarımı, b) Sürekli – Akış PCR Mikroçip Tasarımı.	43
Şekil 2.7. Dört ısıtma yönteminin karşılaştırılması. a) Gerekli sıcaklığa ulaşmak için ısıtma blokları kullanarak; b) termal döngü sağlamak için tek bir termostatik ısıtıcı kullanarak; c) termoelektrik soğutucunun (TEC) gerekli sıcaklığa ulaşmasını sağlamak için devre kontrolü ile; d) bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) reaksiyonunun termal döngüsünü sağlamak için tek bir TEC kullanarak [94]–[97].	46
Şekil 2.8. a) Açık Döngü Kontrol Sistemi Blok Şeması, b) Kapalı Döngü Kontrol Sistemi Blok Şeması.	54

Şekil 2.9. Oransal Kontrolör (P Kontrolör) Blok Diyagramı.	56
Şekil 2.10. İntegral Kontrolör (I Kontrolör) Blok Diyagramı.	56
Şekil 2.11. Türev Kontrolör (D Kontrolör) Blok Diyagramı.	57
Şekil 2.12. PID Kontrolör Blok Diyagramı.	57
Şekil 2.13. Ku ve Tu değerlerinin sürekli salınım yapan sinyalden bulunması.	60
Şekil 2.14. Deneysel adım yanıtı [121], [122].	64
Şekil 2.15. H-Köprü Devresi.	72
Şekil 2.16. H-Köprü Topolojisi – a) İleri Yön, b) Ters/geri yön.	73
Şekil 3.1. Üç boyutlu mikroçip tasarımı.	83
Şekil 3.2. 24 mm x 50 mm boyutlu mikroçip tasarımı (bu mikroçip örneği 20.16 µl hacme sahiptir).	83
Şekil 3.3. 22 mm x 22 mm boyutlu tasarlanan mikroçip 26.62 µl hacme sahiptir.	84
Şekil 3.4. 22 mm x 22 mm boyutlu tasarlanan çapraz kanala sahip mikroçip 15,84 µl hacme sahiptir.	84
Şekil 3.5. 24 mm x 32 mm boyutlu tasarlanan u şekilli kanala sahip mikroçip 28,62 µl hacme sahiptir.	85
Şekil 3.6. 24 mm x 32 mm boyutlu tasarlanan kanala sahip mikroçip 16,56 µl hacme sahiptir.	86
Şekil 3.7. Üç katmandan oluşan (üst PMMA, orta DSA, alt LAMEL) PCR mikroçip tasarımı.	86
Şekil 3.8. Lazer kesici kullanılarak kesilmiş DSA ve PMMA lamel ile birleştirildiğinde elde edilen mikroçipler.	87
Şekil 3.9. 12V - 40W kartuş ısıtıcılar.	88
Şekil 3.10. DS18B20 Sıcaklık Sensörü.	89
Şekil 3.11. 10 kΩ NTC halka sıcaklık sensörü.	90
Şekil 3.12. MLX90614 Kızılötesi temassız sıcaklık sensörü.	90
Şekil 3.13. Arduino UNO kartı.	91
Şekil 3.14. Arduino Nano Kartı.	92
Şekil 3.15. 12V Salyangoz üfleyici.	95
Şekil 3.16. L298 pin bağlantıları.	96

Şekil 3.17. L298 Blok Diyagramı.....	96
Şekil 3.18. L298N Kart Pinleri İşlevleri.....	97
Şekil 3.19. TB6612FNG Modüle Genel Bakış.....	100
Şekil 3.20. BTS7960 Modüle Genel Bakış.	103
Şekil 3.21. Çift Kanallı Röle Modülü.....	105
Şekil 3.22. Çift kanallı röle modülü bağlantıları.	106
Şekil 3.23. Sıcaklık Döngüleyici Kutu Tasarımı.....	108
Şekil 3.24. Sıcaklık Döngüleyici Kutusu Devre Elamanları ve Kapaklı Mikroçip Kutusu Üstten Görünüm.....	108
Şekil 3.25. PCR mikroçip Kutusu Tasarımı.	109
Şekil 3.26. İç ve Dış katmanlardan oluşan PCR Kutusu tasarımı.	110
Şekil 3.27. PCR Sisteminin Güncel görüntüsü.....	110
Şekil 3.28. a) Sıcaklık Döngüleyici Baskı Devre Tasarımı b) H-Köprü, Sıcaklık sensörü, Bluetooth Modülü, Röle ve Arduino Nano bileşenlerinden oluşan PCB Tasarımı.	112
Şekil 4.1. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu peltier modülün uygulanan akım ile zamanla ısınma grafiği.	113
Şekil 4.2. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier modülün uygulanan akım ile zamanla ısınma grafiği.	114
Şekil 4.3. RC12-8-01LS kodlu Peltier modülünün uygulanan akımla zaman içindeki ısınma grafiği.....	115
Şekil 4.4. PCX7.5,13,F1,4023,TA,RT,W6 kodlu Peltier modülünün uygulanan akımla zaman içindeki ısınma grafiği.	115
Şekil 4.5. Sıcaklık Kontrol Sistemi Diyagramı.	116
Şekil 4.6. Peltier eleman sıcaklık ölçümü için TB6612FNG H-Köprü Modülü ile oluşturulan devre.....	117
Şekil 4.7. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın a) $K_p=0.45$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=$ 0.05 iken, b) $K_p=0.15$, $K_d= 0.05$ ve $K_i= 0.05$ iken sıcaklık grafiği – (Kutu içinde 7.1V - 1.8A güç kaynağı).....	118
Şekil 4.8. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.25$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=$ 0.05 iken sıcaklık grafiği – kutu dışında (3.7V iki adet Lityum Batarya).	119
Şekil 4.9. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=$ 0.05 iken sıcaklık grafiği – kutu dışında (3.7V iki adet Lityum Batarya).	119

Şekil 4.10. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.15$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği – kutu içinde (7.1V - 1.8A güç kaynağı).	120
Şekil 4.11. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.15$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği – kutu dışında (7.1V - 1.8A güç kaynağı).....	121
Şekil 4.12. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (7.1V - 1.8A güç kaynağı).	122
Şekil 4.13. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).	122
Şekil 4.14. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d= 0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).	123
Şekil 4.15. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d= 0.84$ ve $K_i=0.06$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).	124
Şekil 4.16. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=2.7$, $K_d= 5.06$ ve $K_i=0.36$ iken sıcaklık grafiği- metal kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).	124
Şekil 4.17. Peltier elemanların 90°C'ye ulaşma grafiği. a) Tek Peltier kullanıldığında 90 °C'ye ulaşma grafiği, b) İki Peltier birlikte kullanıldığında °C'ye ulaşma grafiği.	125
Şekil 4.18. İki adet Peltier elemanın 65°C'ye ulaşma grafiği (Maksimum aşma oranı $\pm 2^\circ\text{C}$).	126
Şekil 4.19. İki adet Peltier elemanın 65°C'ye farklı PID parametreleri ile ulaşma grafiği (Maksimum aşma oranı $\pm 2^\circ\text{C}$).	127
Şekil 4.20. İki adet Peltier elemanın 65°C'ye farklı besleme durumunda ulaşma grafiği (Maksimum aşma oranı $+1^\circ\text{C}$ ve -2°C).	127
Şekil 4.21. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın PCR döngüsü grafiği....	128
Şekil 4.22. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın PCR döngüsü grafiği (farklı akım ve voltajlar ile).	129
Şekil 4.23. İki adet Peltier eleman, 12V-3A batarya ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.	130
Şekil 4.24. İki adet Peltier elemanın farklı yüzeyleri temas halinde iken, 12V-3A batarya ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.	130
Şekil 4.25. İki adet Peltier elemanın farklı yüzeyleri temas halinde iken, 12V-3A güç kaynağı ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.	131
Şekil 4.26. İki adet Peltier elemanın farklı yüzeyleri temas halinde iken, 12V-3A güç kaynağı ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.	132
Şekil 4.27. Peltier eleman sıcaklık ölçümü için H-Köprü Modülü ile oluşturulan devre.	132

Şekil 4.28. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (5V 3A güç kaynağı ile).....	133
Şekil 4.29. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (12V 500mA güç kaynağı ile).....	133
Şekil 4.30. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (5V 3A güç kaynağı ile/Paralel bağlanmış çıkışlar).	134
Şekil 4.31. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (7V 1,10A güç kaynağı ile/Paralel bağlanmış çıkışlar).	135
Şekil 4.32. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (10V 1,5A güç kaynağı ile/PID kontrolör).	136
Şekil 4.33. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (10V 1,5A güç kaynağı ile/PID kontrolör).	136
Şekil 4.34. Ayarlanan PID kontrol parametreleri ile elde edilen PCR grafiği çıktısı.....	137
Şekil 4.35. Kartuş Isıtıcı ısınma grafiği.....	137
Şekil 4.36. Röle Modülü ile kartuş ısıtıcı kontrolü için oluşturulan devre diyagramı.	138
Şekil 4.37. Röle Modülü ile kartuş ısıtıcı kullanımı.....	139
Şekil 4.38. Röle Modülü ile kartuş ısıtıcı kullanımı.....	139
Şekil 4.39. Röle Modülü ile AI kartuş ısıtıcı kullanımı.....	140
Şekil 4.40. BTS7960B H-köprü modülü ile Peltier eleman kontrolü için oluşturulan devre diyagramı.	140
Şekil 4.41. PID kontrolör ve BTS7960 H - Köprüsü ile uzama sıcaklığı kontrolü.	141
Şekil 4.42. PID kontrolör ve BTS7960 H - Köprüsü ile 55°C bağlanma sıcaklığı kontrolü.	141
Şekil 4.43. PIDV1 kütüphanesi ve farklı PID parametreleri kullanılarak elde edilen grafik.	142
Şekil 4.44. PIDV1 kütüphanesi ve farklı PID parametreleri kullanılarak elde edilen grafikler. a) 67°C bağlanma sıcaklığı, b) 72°C uzama sıcaklığı, c) 95°C denatürasyon sıcaklığı.	143
Şekil 4.45. 2 adet peltier elemanın h-köprüleri aracılığı ile kontrol edilmesiyle oluşan PCR grafiği.....	144
Şekil 4.46. Peltier elemanlar mikroçip altında, kartuş ısıtıcı mikroçip üzerinde konumlandırıldığında oluşan PCR grafiği.	145
Şekil 4.47. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında oluşan PCR grafiği.	146

Şekil 4.48. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında ve soğutma elemanı olarak fan-heat sink kullanıldığında oluşan PCR grafiği.....	146
Şekil 4.49. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında ve soğutma elemanı olarak fan-heat sink kullanıldığında oluşan PCR grafiği (KP = 100; KI = 3.5; KD = 7.5).....	147
Şekil 4.50. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında ve soğutucu olarak fan ve heat sink kullanıldığında oluşan PCR grafiği (BTS7960 H-Köprüsü ile) (KP = 100; KI = 35; KD = 75).....	147
Şekil 4.51. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında ve soğutucu olarak fan ve heat sink kullanıldığında oluşan PCR grafiği (KP = 80; KI = 3.5; KD = 5.5).....	148
Şekil 4.52. Denatürasyon sıcaklığının PID kontrolör kullanımı sonucunda elde edilen grafiği.....	149
Şekil 4.53. Kapalı döngü sistemin G1(s) transfer fonksiyonunun adım tepkisi. (Yükselme Süresi: 3.2181, Geçiş Süresi: 204.7715, Yerleşme Süresi: 204.7715, +Aşma: 38.0403, -Aşma: 0, Pik: 1.3757, Pik Süresi: 15.1866).....	150
Şekil 4.54. Yeşil P kontrolör, Turkuaz PI kontrolör, Açık yeşil PD kontrolör ve kırmızı PID kontrolöre ait Adım tepkisi grafikleri.	151
Şekil 4.55. P kontrolör (Yeşil), PI kontrolör (kırmızı), PID kontrolör (kırmızı) ve Ziegler – Nichols formülleri kullanılarak elde edilen adım tepkisi grafikleri.....	151
Şekil 4.56. Kapalı Çevrim Sistemin (95°C) PID Kontrolör ile Simulink Modeli.	152
Şekil 4.57. MATLAB Simulink ve PID Tuner Toolbox kullanılarak elde edilen Adım tepkisi grafiği.....	152
Şekil 4.58. Farklı kontrolör parametreleri ile elde edilen adım tepkisi grafiği.	153
Şekil 4.59. Adım tepkisi grafiği (PID 1 Kp=1.43; Ki=6; Kd=2, PID 2 Kp=4; Ki=3; Kd=0.5, PID 3 Kp=6; Ki=3; Kd=0, PID 4 Kp=1.6; Ki=6; Kd=0).....	154
Şekil 4.60. PID2 ve PID5' e ait adım tepkisi grafikleri (PID2 Kp=4;Ki=3;Kd=0.5 ve PID5 Kp=4; Ki=3; Kd=4).	154
Şekil 4.61. Kapalı döngü sistemin G2(s) transfer fonksiyonunun adım tepkisi. (RiseTime: 2.3154 TransientTime: 74.1830 SettlingTime: 87.9423 Overshoot: 111.6647 PeakTime: 12.1347).....	156
Şekil 4.62. Adım tepkisi grafiği (PID 1 Kp=2; Ki=0; Kd=0, PID 2 Kp=0; Ki=2.5; Kd=1.5, PID 3 Kp=2; Ki=2.5; Kd=1.5, PID 4 Kp=4; Ki=3; Kd=0.5)(TF; Transfer Fonksiyonu).	156
Şekil 4.63. Kapalı Çevrim Sistemin (72°C) PID Kontrolör ile Simulink Modeli.	157

Şekil 4.64. Adım tepkisi grafiği (PID 1 $K_p=0$; $K_i=1$; $K_d=0$, PID 2 $K_p=0$; $K_i=2.5$; $K_d=1.5$, PID 3 $K_p=2$; $K_i=2.5$; $K_d=1.5$, PID 4 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=1.5$, PID 5 $K_p=4$; $K_i=6$; $K_d=1.5$, PID 6 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=6$;).....	158
Şekil 5.1. Mikroçip Kanalında Akışkan Akışını Modellemek için yapılan işlem adımları. a) Laminar Akış seçimi, b) Sabit, zamana bağlı olmayan çalışma seçimi.	162
Şekil 5.2. 26mmX4mm boyutunda, 0.65mm çaplı girişe sahip mikroçip kanalının COMSOL Multiphysics uygulamasında modellenmesi.	163
Şekil 5.3. a) Mikro kanala ait “mesh” yapısı gösterilmiştir b) Giriş/çıkış çevresindeki ağ yapısı daha ince olarak gözlenmiştir.	163
Şekil 5.4. Laminar Akış Hız Büyüklüğü grafiği.....	164
Şekil 5.5. Laminar Akış yönünün oklar ile gösterimi; a) giriş, b)çıkış.	164
Şekil 5.6. Laminar Akış Basınç Eğrileri Grafiği.	165
Şekil 5.7. Mikroçipin giriş ve çıkış deliklerinin bulunduğu PMMA katmanında ısı transferini modellemek için yapılan işlem adımları. a) Katılarda ısı transferi seçimi, b) Sabit, zamana bağlı olmayan çalışma seçimi.	166
Şekil 5.8. 51 mm x 25 mm boyutunda, 0.65 mm çaplı girişe sahip PMMA katmanının COMSOL Multiphysics uygulamasında modellenmesi.	167
Şekil 5.9. COMSOL’da tanımlı PMMA malzemesi özellikleri.	167
Şekil 5.10. Yüzey Sıcaklığı Grafiği.....	168
Şekil 5.11. Üç boyutlu çipe ait ısı transferi grafikleri a) Yanal eksenden görünüm, b) Üstten görünüm.	169
Şekil 5.12. Sıcaklık Döngüleyici Simülasyonu, 70°C’ye ulaşp, bu sıcaklıkta sabit kalması için PID kontrolör parametreleri düzenlenmiştir.	170
Şekil 5.13. Isıtma ve Soğutma süreçlerini gerçekleştiren Sıcaklık Döngüleyici simülasyonu.	171
Şekil 5.14. Hesaplanan K_p , K_i ve K_d değerleri sonucunda elde edilen PCR döngüsünün simülasyon çıktısı.....	171
Şekil 5.15. TB6612FNG Modül ile Isıtma ve Soğutma süreçlerini gerçekleştiren Sıcaklık Döngüleyici simülasyonu.....	172
Şekil 5.16. TB6612FNG ile PCR döngüsünün simülasyon çıktısı.....	172
Şekil 5.17. L298N Modül ile Isıtma ve Soğutma süreçlerini gerçekleştiren Sıcaklık Döngüleyici simülasyonu.....	173
Şekil 5.18. L298N ile PCR döngüsünün simülasyon çıktısı.....	173

Şekil 6.1. PID Kontrolör kullanılarak elde edilen PCR grafiği (PID parametreleri KP = 100; KI = 35; KD = 150). CPU Fan kullanılarak elde edilmiş grafik (mavi) ile CPU fan kullanılmadan elde edilmiş grafik (siyah).....	174
Şekil 6.2. Başlangıç denatürasyonu 92°C’de 95 saniye, bağlanma 55 °C’de 60 saniye, Uzatma 72 °C’de 60 saniye, Denatürasyon 92 °C’de 55 saniye ile 4 döngüden oluşan PCR grafiği.....	175
Şekil 6.3. Başlangıç denatürasyonu 90°C’de 97 saniye, bağlanma 55 °C’de 60 saniye, Uzatma 70 °C’de 60 saniye, Denatürasyon 90 °C’de 55 saniye ile 3 döngüden oluşan PCR grafiği.....	176
Şekil 6.4. Başlangıç denatürasyonu 92°C’de 97 saniye, bağlanma 55 °C’de 60 saniye, Uzatma 72 °C’de 60 saniye, Denatürasyon 92 °C’de 55 saniye ile 6 döngüden oluşan CPU fan kullanılarak elde edilen PCR grafiği.....	177
Şekil 6.5. Bir döngü süresi 180 sn olan PCR grafiği.....	178
Şekil 6.6. Peltier elemanı ve kartuş ısıtıcı kullanılarak elde edilmiş 6 döngüden oluşan PCR grafiği.....	179
Şekil 6.7. Peltier elemanı ve kartuş ısıtıcı ve farklı PID parametreleri kullanılarak elde edilmiş 6 döngüden oluşan PCR grafiği.....	179
Şekil 6.8. PCR Grafiği, 30 döngü ile ilk denatürasyon, bağlanma, uzama, denatürasyon ve son uzama adımlarından oluşmakta ve yaklaşık ~99 dakika sürmektedir.....	180
Şekil 6.9. Mikroçip kanalı, a) PCR işlemi öncesinde mürekkep ile boyanmış hali, b) PCR işlemi sonrası buharlaşma gerçekleşmiş hali.....	182
Şekil 6.10. Konvansiyonel PCR cihazına ait görsel.....	183
Şekil 6.11. PCR Grafiği, 45 döngü ile ilk denatürasyon, bağlanma, uzama, denatürasyon ve son uzama adımlarından oluşmaktadır ve yaklaşık ~145 dakika sürmüştür.....	183
Şekil 6.12. 45 döngüden oluşan PCR işlemine ait grafiğin başlangıç denatürasyonu ve 6 döngüsüne ait yakın çekim.....	184
Şekil 6.13. Tasarlanan Sistemin görseli.....	186
Şekil 6.14. PCR kutusunun blok diyagramı.....	186
Şekil 6.15. İnce cidarlı amplifikasyon tüpleri kullanıldığında elde edilen agaroz jel elektroforez sonucu.....	187
Şekil 6.16. İnce cidarlı amplifikasyon tüpleri kullanıldığında elde edilen agaroz jel elektroforez sonucu.....	188
Şekil 6.17. PCR mikro cihazı ile PCR protokolü sırasında sıcaklık takibi ve grafiği. a) tüm PCR protokolü için ince cidarlı amplifikasyon tüpünün sıcaklık profili. b) başlangıç denatürasyonu ve tek bir döngü için sıcaklık profili.....	189

Şekil 6.18. PCR mikro cihazı ile PCR protokolü sırasında sıcaklık takibi ve grafiği. a) tüm PCR protokolü için Peltier elemanların sıcaklık profili. b) başlangıç denatürasyonu ve tek bir döngü için Peltier elemanların sıcaklık profili.	190
Şekil 6.19. Güncellenmiş PCR cihazı ve PCR kutusuna ait görseller.	190
Şekil 6.20. PCR Kutusunun, Al blok, İnce cidarlı amplifikasyon tüp haznesinin üstten görünümü.	191
Şekil 6.21. Çift Cidarlı Amplifikasyon Tüpü ile Kullanılan PCR Kutusu Blok Diyagramı.	191



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler

cm	Santimetre
dB	Desibel
dk	Dakika
°F	Fahrenheit
g	Gram
GHz	Gigahertz
Hz	Hertz
I	Akım (Amper)
K	Kelvin
KB	Kilobayt
KHz	Kilohertz
mA	Miliamper
MHz	Megahertz
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µV	Mikrovolt
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ms	Milisaniye
mV	Milivolt
nm	Nanometre
Pa	Pascal
RPM	Devir/dakika
s	Saat
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
W	Watt

Kısaltmalar

3B	Üç Boyutlu
A	Adenin
Al	Alüminyum
bç	Baz Çifti
C	Sitozin
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım
C-C	Cohen – Coon
CCW	Saat Yönü Ters
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
CFD	Hesaplmalı Akışkanlar Dinamiği
CHR	Chien Hrones Nicholas
COP	Performans Katsayısı
CPA	Çapraz Primer Amplifikasyonu
CPU	Merkezi Bir İşlem Birimi

CRISPR	Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri
CT	Bilgisayarlı Tomografi
CU	Kontrol Birimi
CVS	Koryon Villus Örneklemesi
CW	Saat Yönü
DC	Doğru Akım
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotidler
d-PCR	Dijital PCR
DSA	Çift Taraflı Bant
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Testleri
EXPAR	Üstel Amplifikasyon Reaksiyonu
FDA	ABD Gıda Ve İlaç Dairesi
FEM	Sonlu Eleman Yöntemi
FOPDT	Gecikmeli Birinci Dereceden Süreç
FVM	Sonlu Hacim Yöntemi
G	Guanin
G/Ç	Giriş/Çıkış
HBV	Hepatit B Viral
HCR	Hibridizasyon Zincir Reaksiyonu
IC	Entegre Devre
INAA	İzotermal Nükleik Asit Amplifikasyon Cihazları
IoT	Nesnelerin İnterneti
IR	Kızılötesi
k	Termal İletkenlik
Kd	Türev Kazanç
Ki	İntegral Kazanç
KOD	Thermococcus Kodakaraensis
Kp	Oransal Kazanç
Ku	Nihai Kazanç
LAMP	Döngü Aracılı Amplifikasyon
LFA	Yanal Akış Analizleri
LOAD	Disk Üzerinde Laboratuvar
LOC	Çip Üzerinde Laboratuvar
LOD	Tespit Sınırı
LTCC	Düşük Sıcaklıkta Beraber Pişirilen Seramikler
MCU	Mikrodenetleyici Birimi
MEMS	Mikroelektromekanik Sistem Teknolojisi
MOSFET	Silikon Metal Oksit Yarı İletken Alan Etkili Transistör
μPAD	Mikroakışkan Kâğıt Tabanlı Analitik Cihazlar
mPCR	Multiplex PCR
NA	Nükleik Asit
NASBA	Nükleik Asit Dizi Bazlı Amplifikasyon
NP	Nazofaringeal

NTC	Negatif Termistör Katsayısı
P	Oransal Kontrolör
PC	Polikarbonat
PCB	Baskı Devre Kartı
PCR	Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu/Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD	Oransal Artı Türev Kontrolör
PDMS	Polidimetilsiloksan
PI	Oransal Artı İntegral Kontrolör
PID	Oransal İntegral Türev
PMMA	Polimetilmetakrilat
POC	Hasta Başında Teşhis
PS	Polistren
PTC	Pozitif Sıcaklık Katsayısı
PWM	Darbe Genişlik Modülasyonu
Qc	Üretilen Maksimum Isı
q-PCR	Gerçek-Zamanlı/Kantitatif PCR
RCA	Yuvarlanan Daire Amplifikasyonu
Re	Reynolds Sayısı
RNA	Ribonükleik Asit
RPA	Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu
rRNA	Ribozomal RNA
RT	Ters Transkripsiyon
RTD	Direnç Sıcaklık Dedektörleri
RT-LAMP	Ters Transkriptaz Döngü Aracılı Amplifikasyon
RT-PCR	Ters Transkriptaz PCR
SDA	İplik Yer Değiştirme Amplifikasyonu
SEA	İplik Değişimi Amplifikasyonu
T	Timin
T	Sıcaklık
Taq	Thermus Aquaticus
TC	Termokupldan
Td	Türev Zamanı
TEC	Termoelektrik Hücreler
Ti	İntegral Zamanı
Tm	Erime Sıcaklığı
TOPAS	Siklikolefin Kopolimer
Tu	Nihai Periyot (Tu)
U	urasil
VRC	Sanal Reaksiyon Odası
VTM	Viral Taşıma Ortamı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Z-N	Ziegler – Nicholas
ZT	Performans Katsayısı
α	Seebeck Katsayısı
ΔT	Sıcaklık Farkı

ΔV
 μ -TAS

Voltaj Farkı
Mikro Toplam Analiz Sistemleri



1. GİRİŞ

Nükleik asitlerden (NA) biri olan Deoksiribonükleik asit (DNA), vücudun en önemli moleküllerinden bir tanesidir. Genetik bilginin taşıyıcısı olarak da adlandırılmış, sağlıkla ilgili sorulara daha fazla cevap ve tıbbi teşhis için çözümler sağlamıştır. 1990'ların başında insan genom projesi başladığında DNA analizi dikkat çekmiştir. DNA analizinin önemi ile az bilinen hastalıkların teşhis ve tespiti mümkün hale gelmiştir. Ribonükleik asit (RNA) molekülleri ise tüm yaşam formlarında genetik bilgiyi proteinlere dönüştürmek için bulunmaktadır. Enzimatik ve düzenleyici aktiviteleri ile de bilinmektedir. Her türün DNA/RNA dizilerinin benzersiz olması, karmaşık örneklerde bakteri ve virüslerin ayırt edilmesini de sağlamaktadır [1], [2].

NA tespiti için geleneksel yöntemler birçok adım gerektirmektedir. Bu teknolojilerin bazıları yüksek hassasiyette olabilmektedir. Ancak, düşük algılama limitleri, zaman tüketimi ve gelişmiş enstrümantasyon gereksinimleri nedeniyle hasta başında teşhis (Point of Care - POC) cihazlarının geliştirilmesinde geleneksel yöntemler geride kalmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, örnek ön işleme, reaksiyonlar, ayırmalar ve teşhis dahil tüm analitik adımların küçük bir çip üzerindeki mikro kanallarda verimli ve otomatik olarak gerçekleştirilmesine izin veren mikroakışkan teknolojiler kullanılmaktadır. Standart laboratuvar tabanlı teşhis ile karşılaştırıldığında, POC teşhisi hızlı, basit ve ucuzdur. Sınırlı kaynaklara sahip bölgelerde de erişilebilirlik sunmaktadır. Son yıllarda akıllı telefonlar, nanoteknoloji ve mikroakışkan teknolojileri kullanılarak POC teşhisi üzerine yapılan çalışmalar artmıştır [2], [3].

Minyatür sistemler, nano - piko litre örnek hacmi gereksinimi ile saniyeler içinde yüksek hızlı işlemlere olanak sağlamaktadır. Bu minyatür sistemler, DNA, RNA ve proteinler gibi farklı biyomoleküllerin yanı sıra hücresel bileşenler ve gelişmiş terapötik analizler için de kullanılabilir. Küçük ölçekli işlemler, makro ölçekli tezgâh üstü laboratuvar tekniklerine göre daha hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Kısaca minyatürleştirme kavramı, biyolojik bir deneyin tüm aşamalarının tek bir çip üzerinde gerçekleştirilebileceği bir sistem olarak tanımlanmaktadır [4].

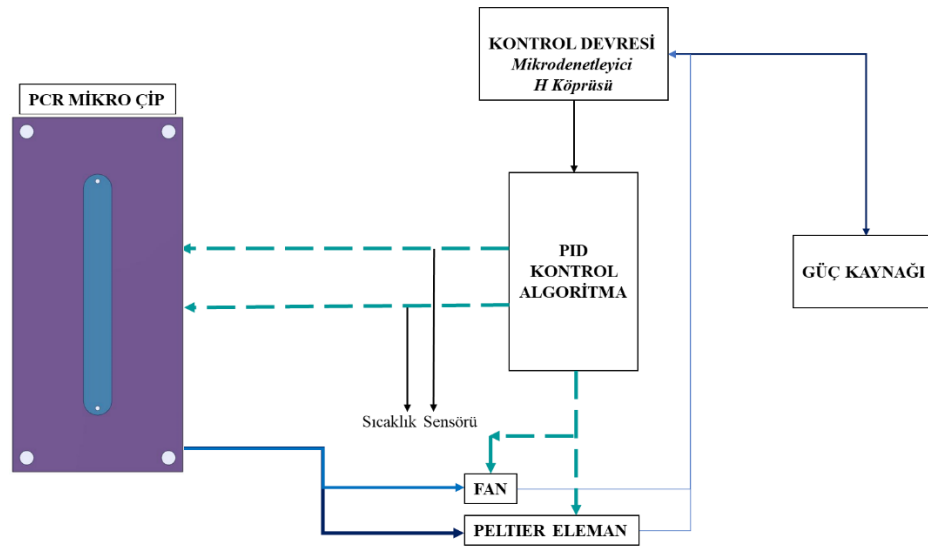
Zincirleme polimeraz reaksiyonu (PCR), insan genomu gibi belirli bir karmaşık DNA dizisini son derece küçük bir DNA çözeltisinden amplifiye etmek için kullanılan geleneksel bir tekniktir. Mikroakışkan teknolojisi ile minyatürleştirilmiş PCR cihazları son zamanlarda

çok önemli birer araç haline gelmiştir. PCR uygulamalarının farklı uygulama alanlarında minyatürize edilerek kullanılması birçok iyileştirmeye yol açmıştır. Bunlar azaltılmış üretim ve kullanım maliyetleri, DNA amplifikasyonunun süresinin kısalması, PCR için gerekli biyolojik örneklerin azaltılmış tüketimi, primer dimerlerinin ve diğer spesifik olmayan ürünlerin azaltılmış üretimi, PCR cihazının taşınabilirliği ve entegrasyonunun kolaylaşması, PCR reaksiyon kabının uygun şekilde atılması ve PCR'nin önlenabilir çapraz kontaminasyonudur. İlk PCR mikroçipinin kullanılmasıyla birlikte, daha küçük termal kapasite ve PCR örneğiyle daha hızlı ısı transferi nedeniyle DNA amplifikasyonu çok daha hızlı gerçekleştirilmiştir [5]–[7] .

1.1.Amaç

Bu çalışma ile PCR gerçekleştirebilmek için gerekli olan mikro sıcaklık döngüleyici tasarlamak ve üretmek amaçlanmıştır. Sıcaklık değişim kontrolü için ısıtıcı-soğutucu devrenin tasarımı, kontrol algoritmalarının ve yazılımının geliştirilmesi, PCR'nun gerçekleşeceği mikroçip tasarımının, ısı transferi ve akışkan akışı simülasyonlarının yapılması ve son olarak seçilecek bir DNA örneğinin amplifiye edilmesi amaçlanmıştır.

Geliştirilmesi hedeflenen mikro sıcaklık döngüleyici sistemi örnek bir mikroçip tasarımı ile Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. PCR Mikroçip ve Mikro Sıcaklık Döngüleyici Blok Diyagramı.

1.2.Kapsam

Tez PCR, POC teşhis yöntemleri, mikroakışkan çipler ve mikro PCR ile sıcaklık döngüleyicide sıcaklık kontrol yöntemleri olmak üzere 4 temel konuyu kapsamaktadır.

1.3.Yöntem

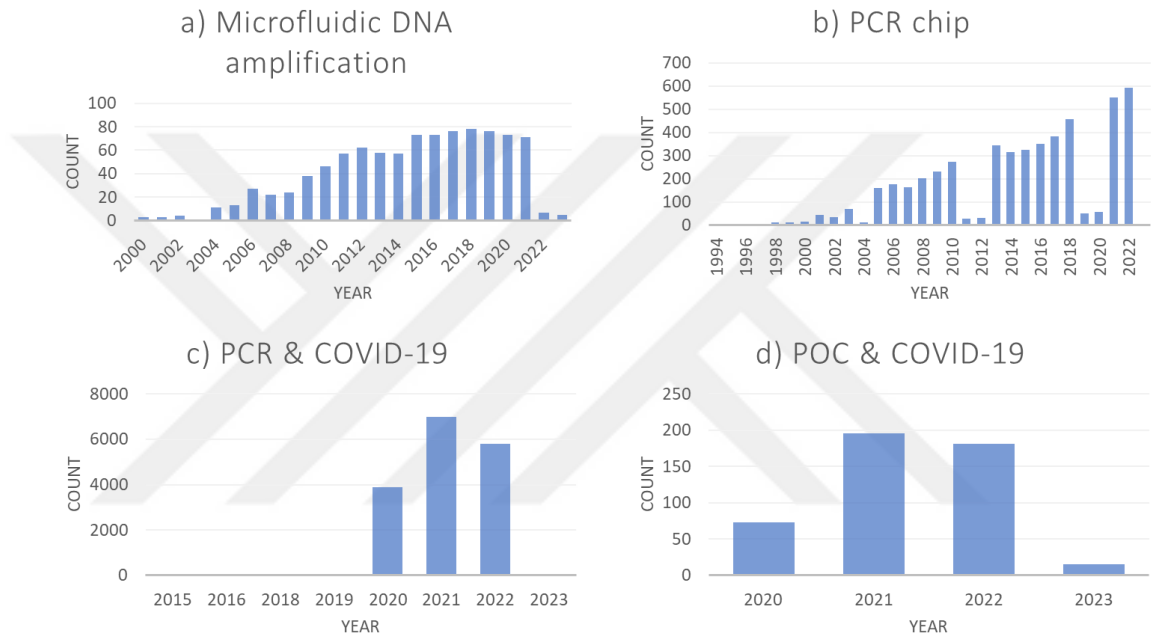
Bu çalışmada PCR için gerekli olan sıcaklık döngüleyici tasarımı gerekli elektronik elemanlar ve simülasyonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR'nun gerçekleşeceği mikroçip ve sıcaklık döngüleyici kutu tasarımı 3B tasarım programı kullanılarak yapılmıştır. Mikroçip tasarımı yapıldıktan sonra sayısal simülasyon ile akışkan akışı ve ısı transferi de simüle edilmiştir. Mikroçip üretiminde polimetilmetakrilat (PMMA), lamel ve çift taraflı bant (DSA) kullanılmıştır. Mikroçip lazer kesici kullanılarak elde edilmiştir. Sıcaklık döngüleyici cihazında sıcaklık kontrolü oransal integral türev (PID) kontrolör kullanılarak sağlanmıştır. Tüm tasarım gerçekleştirildikten sonra PCR kontrol amaçlı cihazda gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

1.4.Önceki Çalışmalar

Mikroakışkan teknolojisi tabanlı ilk PCR cihazının sunulmasından bu yana pek çok yaklaşım geliştirilmiştir. Bu mikroakışkan teknolojisi tabanlı cihazların amacı, verimliliği artırmak, cihaz karmaşıklığını en aza indirmek, üretim ve kullanım maliyetini azaltmak, DNA amplifikasyon süresini azaltmak, PCR için gerekli biyolojik numunelerin tüketimini azaltmak, spesifik olmayan ürünlerin üretimini azaltmak, taşınabilirlik ve entegrasyon sağlamaktır. Mikroakışkan tabanlı cihazlar, geleneksel tezgâh üstü cihazlara göre önemli avantajlar sağlarken, çoğu PCR kullanıcısının mikroakışkan yöntemlere erişimi sınırlıdır. Gelecekte araştırmacılar, mikroakışkan yaklaşımları tüketiciler için daha erişilebilir hale getirmeye odaklanmalıdır (Şekil 1.2.a,b).

7 Ocak 2020'de, daha önce insanlarda tespit edilmeyen yeni bir Koronavirüs (2019-nCoV) tespit edilmiş ve hastalığın adı COVID-19 olarak kabul edilmiştir. COVID-19'un tespiti genellikle ters transkriptaz PCR (RT-PCR) testi ve göğüs bilgisayarlı tomografi (CT) görüntülemesi ile yapılmaktadır. Bu yaklaşımlar pahalı tesisler, iyi eğitilmiş personel gerektirmekte ve bazen zaman kaybına yol açmaktadır. Dolayısıyla, uygun maliyetli, güvenilir sonuçlar veren, hızlı ve yerinde gerçekleştirilebilen POC testlerine olan ihtiyaç

artmaya başlamıştır POC testi son birkaç on yılda büyük gelişme yaşamıştır. Taşınabilir ve kullanıcı dostu cihazlarla küçük örnek miktarlarını kullanan mikroakışkan tabanlı POC test cihazları, hastalık tespitini ve teşhisini geliştirmek için hızlı yanıtlar sağlamayı amaçlamaktadır. Bununla birlikte, ticari ekipmanın operasyonel gereksinimleri, test bulgularını daha az doğru hale getirmektedir. POC test avantajları nedeniyle artan sayıda araştırma konusu haline gelmiştir (Şekil 1.2.c, d). Ancak POC testinin hastalık teşhisi için altın standart haline gelip gelmediği gelecekte görülecektir.



Şekil 1.2.a) “Microfluidic DNA amplification”, b) “PCR Chip”, c) “PCR ve COVID-19”, d) “POC ve COVID-19” anahtar kelimeleriyle aranan 2023 yılına kadar olan ilgili yayınlar, PubMed veri tabanından alınmıştır.

Yapılan bir çalışmada tasarlanan mikro PCR çip, baskı devre (printed circuit board – PCB) substrat üzerine yerleştirilmiş cam kapağın üzerinde bir odaya sahiptir. Sıcaklığı ölçen termistör, ısıtıcı yüzeyin basıldığı PCB alt tabakaya lehimlenmiştir. Bu nedenle, termistör tarafından ölçülen sıcaklığın, termistör ile oda arasındaki boşluk nedeniyle gerçek sıcaklıktan farklı olacağı düşünülmektedir. Odanın toplam yüksekliğinin 400µm olduğu düşünülerek, iç sıcaklığını ölçmek için bir sıcaklık ölçme cihazının yerleştirilmesinin zor olacağı belirtilmiştir. Bu nedenle çalışmada oda sıcaklığını başka bir cihazla ölçmek ve karşılaştırma yapmak için cam kapak ve PCR çip odasının arasına termokupl yerleştirilmiştir. Termokupl metal bir telden yapılmış ve çapı küçük olduğu için şeklini değiştirmek kolay olmuştur. Mikro PCR sistemi; PCR çip sürücüsü, kullanıcı arayüzü için

bilgisayardan oluşmaktadır. PCR çip sürücü sistemi ise üç bölüme ayrılmıştır; sıcaklığı ölçen termistör, ısıtıcılı PCR çip ve PCR'ı kontrol eden kart. Mikro PCR saniyede 10°C'lik sıcaklık değişimine sahiptir. PCR işlemi, termokupl yerleştirilmiş oda içerisinde su ile denenmiş ve termistör ile termokupl tarafından ölçülen sıcaklıklar karşılaştırılmıştır. Sıcaklık farkı önemsiz bulunmuştur. Bunun nedeni ise ısının her iki tarafa da hızlı bir şekilde iletildiği olarak belirtilmiştir [8].

Başka bir çalışmada, ince film polikarbonattan üretilen mikroakışkan temelli sürekli akışlı PCR kart için bakır blok kullanılan bir sistem modellenmiş, üretilmiş ve test edilmiştir. Sistemin yüzey alanı/hacim oranı hızlı ısı transferi sağlamıştır. Dört katmandan oluşan ince film (her biri 75 µm kalınlıkta) dört adet bakır blok arasına sıkıştırılmıştır. Böylece ısı cihazın iki tarafına da aktarılabilmiştir. Tasarımın, tek taraflı ısıtmaya kıyasla ısı akışını yaklaşık iki kat arttırdığı söylenmiştir. Çalışmada iki basamaklı PCR gerçekleştirilmiştir; ilk basamak denatürasyon, son basamak ise primer bağlanma ve uzatmadır. Bu adımlar ile 35 adet sıcaklık döngüsü gerçekleştirilmiş, 52 saniye harcanmıştır. Amplifikasyon sentetik DNA dizisinin 450 baz çifti (bp) kalıbındaki 69 bp hedefiyle gerçekleştirilebilmiştir. Bakır blok çiftleri denatürasyon ve bağlanma/uzatma sıcaklık bölgeleri için sırasıyla 90°C ve 65°C'ye ayarlanmıştır. Erime eğrileri DNA fragmanın amplifiye edildiğini göstermiştir. Sunulan sistemin 1 dk'dan daha kısa sürede amplifikasyona ulaşan ilk mikroakışkan kart olduğu söylenmiştir [9].

Buhar basıncı kullanarak hızlı, küçük hacimli DNA amplifikasyonu yapabilen sürekli akışlı PCR mikroakışkan sisteminin geliştirildiği bir çalışmada, 40 döngü 120 saniyede tamamlanmıştır. Çip basınca duyarlı poliolefin (PSP) filmi ve siklo-olefin polimer (COP) substrattan yapılmıştır. COP, çip için uygun yeni bir termoplastik malzemedir, düşük gözenekli yapıya, yüksek ısı direncine (T_g ;138°C), düşük safsızlığa, düşük su absorbansına sahip olduğu için kararlılık sağlamıştır. PCR çipi 80 mm uzunluğunda ve 50 mm genişliğindedir. Mikro kanallar ise 400 µm genişlik ve 300 µm derinlikte üretilmiştir. Isı transferi için alüminyum bloklar kullanılmıştır. Soğutma için Al bloklar peltier eleman ile temas halinde tutulmuştur. PCR karışımı şırınga pompası kullanılarak çip girişinden verilmiştir. Denatürasyon ve bağlanma adımları 7.5 mm'lik Al blok üzerinde, uzatma adımı ise 1.5 mm'lik Al blok üzerinde konumlandırılmıştır. Al blok sırasıyla 110 °C, 85 °C ve 20 °C'ye ayarlanmıştır. Mikroçip sıcaklığı ise sırasıyla 95 °C, 72 °C ve 55°C olarak ölçülmüştür. Antraks içeren PCR reaktifi (1 µl) PCR çip cihazına enjekte edilmiş ve en

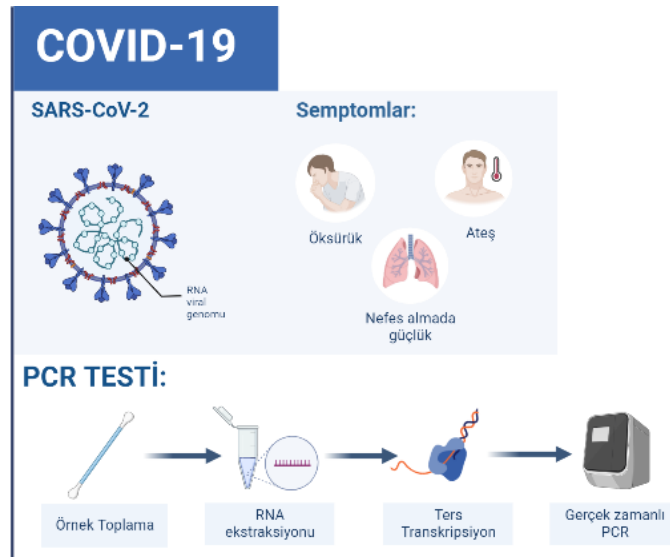
yüksek flüoresan yoğunluğu (%80 amplifikasyon verimliliği) 5dk'lık bir döngü süresi ile elde edilmiştir [10].

Bir diğer çalışma, PCR'nun yerinde teşhis sınırlamalarının üstesinden gelmek için ince cam çip ve ucuz bir çip direnci kullanarak örneklerin hızlı bir şekilde ısıtılmasını sağlayan hızlı, ucuz bir sıcaklık döngüleyici önermiştir. Sıcaklık döngüleyici, 2 µl PCR örneğini tutabilen 12,5 mm x 12,5 mm x 2 mm cam mikroçipten oluşturulmuştur. PCR odasının çapı 5 mm ve yüksekliği 0,1 mm'dir. Isıtıcıdan mikroçipteki PCR reaksiyon odasına ısı transferinin gerçekleştirilmesi, seçici lazerle indüklenen aşındırma kullanılarak 3B bir çip yapısının tasarımı ve üretimi yoluyla elde edilmiştir. Elde edilen PCR cihazı bir sıcaklık döngüleyici, bir kontrol devresi ve bir mikrodenetleyici birimden (MCU) oluşturulmuştur. Kontrol devresi iki adet metal oksit yarı iletken alan etkili transistör (MOSFET) ve bir voltaj bölücüden oluşturulmuştur. Sıcaklık döngüleyici ise bir mikroçip, bir çip dirençli ısıtıcı, bir fan ve bir termistör içermiştir. MOSFET'ler elektrik akımını çip dirençli ısıtıcıya ve fana çevirirken, termistörün sıcaklığını ölçmek için voltaj bölücü devre kullanılmıştır. Sıcaklık döngüleyici, örneği saniyede maksimum 28,8 °C/s hızında ısıtabilmiştir. Mikroçipin ısıtıcı tarafından ısıtıldığındaki sıcaklık profilini simüle etmek için sonlu elemanlar yöntemi (FEM) yazılımı kullanılmıştır. Simülasyon için ısıtıcı ile oda arasındaki üç mesafe (600 µm, 950 µm ve 1300 µm) kullanılmıştır. Ayrıca gerçek zamanlı PCR cihazına dönüşüm için sıcaklık döngüleyiciye optik teşhis bileşeninin eklenmesine izin veren bir delik eklenmiştir. Üretilen PCR cihazının DNA amplifikasyonunu doğrulamak için ticari bir PCR cihazı kullanılmıştır. Toplam 30 döngüden oluşan PCR sıcaklık döngü işlemi 3511 saniye sürmüştür. Tek bir döngü: 30 s denatürasyondan, 30 s bağlanmadan ve 30 s uzatmadan, ayrıca 95 °C'de 30 s ön denatürasyon adımından oluşmuştur. Uzatma adımından denatürasyon adımına kadar olan ısıtma hızı 28,8 °C/s; bağlanma adımından uzatma adımına kadar olan ısıtma hızı 15,0 °C/s ve soğutma hızı 1,4 °C/s olmuştur. Bu sonucun diğer çalışmalarda bildirilenlerden 4 ila 8 kat daha hızlı olduğu söylenmiştir [11].

1.4.1. COVID-19 ve Mikro PCR ile ilgili Çalışmalar

İlk SARS-CoV-2 virüsü vakaları Çin'in Wuhan kentinde keşfedilmiş ve daha sonra 31 Aralık 2019'da pandemi olarak ilan edilmiştir [12]. COVID-19, MERS ve SARS gibi büyük ölçekli salgınlar üreten geçmiş koronavirüslerden önemli ölçüde daha yüksek bir bulaşma oranına sahiptir. Koronavirüslerin ve influenza virüslerinin ayırt edici genomları, özellikle

RNA dizileri, bu virüsleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Nüfusun hızlı ve hassas bir şekilde taranması, enfekte olmuş bireyleri tespit etmek ve karantinaya almak, böylece virüsün yayılmasını sınırlamak veya potansiyel olarak ortadan kaldırmak için çok önemlidir [13]. COVID-19'u tespit etmek için çeşitli laboratuvar metodolojileri bulunmaktadır. Bunlar NA bazlı teşhis, protein bazlı teşhis ve POC teşhis yöntemleri olarak sınıflandırılmaktadır. RT-PCR genellikle viral RNA'yı tanımlamak için en etkili yöntem olarak görülse de alternatif teşhis araçları moleküler ve serolojik testlerin yanı sıra diğer ilgili yaklaşımlara dayanmaktadır. İzotermal amplifikasyon testleri, hibridizasyon mikro dizi testleri, ampikon bazlı metagenomik dizileme, Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats - CRISPR) teknolojileri, serolojik ve immünolojik testler ilgili çeşitli yaklaşımlar arasındadır [14]. Geleneksel yaklaşımlar ise pahalı tesisler ve iyi eğitilmiş personel gerektirmektedir. Ayrıca genellikle zaman alıcıdır, hızla artan sayıda potansiyel vakayı test edilmeden bırakmakta ve hastalık önleme çabalarında bir boşluk yaratmaktadır. Bu nedenle, POC kullanımı için alternatif, hızlı, ucuz, kullanımı kolay ve hassas tanı cihazlarının geliştirilmesine olan ilgi artmıştır. (Şekil 1.3.) Son zamanlarda SARS-CoV-2 moleküler teşhis için taşınabilir mikroakışkan tabanlı sistemlerin geliştirilmesinde bir artış yaşanmaktadır [12], [15].



Şekil 1.3. COVID-19 semptomları ve tespitinde kullanılan altın standart PCR adımları.

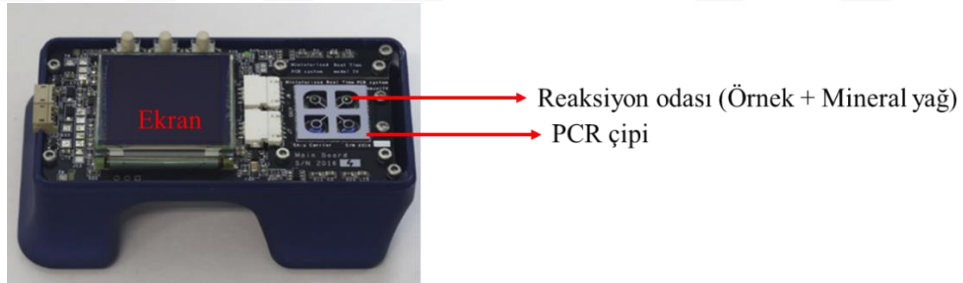
COVID-19 salgınına verilen finansal ve hükümet desteği, yanal akış analizleri (LFA), enzimle bağımlı immünosorbent testleri (ELISA) ve PCR dahil olmak üzere hayati önem taşıyan teşhis araçlarının tespit sınırını (LOD), hızını ve maliyetini arttırmasına yardımcı olmuştur. Bunlar arasında genel verimlilikteki en kayda değer gelişme PCR görülmüştür. İnsan sağlığı için önemi, virüsün tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım olarak ortaya çıktığı COVID-19 salgını sırasında artmıştır. Mikroakışkan platformlar ise daha küçük, daha uygun maliyetli ve daha hızlı PCR sistemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayarak umut verici çözümler sunmaya devam etmektedir [16].

Yapılan bir çalışmada, 3 boyutlu kartuş ve akıllı telefon tabanlı optik okuyucuya sahip taşınabilir bir teşhis sistemi ile POC teşhis yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon için ters transkriptaz döngü aracılı amplifikasyon (RT-LAMP) reaksiyonu kullanılmıştır. Hastalardan örnek nazofaringeal (NP) sürüntü ile alınmıştır. Çözünmüş örnek ve RT-LAMP reaktifleri sırasıyla 1-ml ve 5-ml'lik şırıngalara konmadan önce sürüntü viral taşıma ortamı (VTM) solüsyonuna yerleştirilmiştir. Şırıngalar mikroakışkan kartuşa bağlanmıştır. Çözünmüş örnek ve RT-LAMP reaktifleri kartuşa enjekte edilmiştir. Kartuş, taşınabilir akıllı telefon platformuna yerleştirilmiştir. İnterkalasyon yapan flüoresan boya ile NA amplifikasyonu 65 °C'de gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı amplifikasyon bir akıllı telefon kamerasıyla izlenmiştir. Mikroakışkan kanallar, 3B tasarımın hem önüne hem de arkasına yerleştirilmiştir. Her serpantin mikro kanal 0,7 mm genişliğinde, 0,4 mm derinliğinde ve 8 mm uzunluğundadır ve üst yüzünde yedi, alt yüzünde sekiz serpantin kanalı bulunmaktadır. Çipin ucundaki algılama rezervuarlarının, her odacığın 20 µl'lik bir kapasitesine sahip olması amaçlanmıştır. Kartuşun altında Pozitif Sıcaklık Katsayısı (Positive Temperature Coefficient - PTC) ısıtıcısı bulunmaktadır. POC sistemi 10 klinik örnekle test edilmiş ve 30 dk sonunda pozitif örnekleri negatif örneklerden ayırarak SARS-CoV-2'yi tanımlayabilmiştir [17].

Bir çalışmada, araştırmacılar POC için alternatif, hızlı, ucuz ve kullanımı kolay hassas bir COVID-19 teşhis aracı geliştirmiştir. Bu cihaz, hızlı, doğru ve erişilebilir bir COVID-19 teşhis aracı sağlamak için akıllı telefon uygulamasıyla entegre edilmiştir. Evde karantinaya alınan bir kişi, burun sürüntü örneğini kendi başına kolayca alabilmekte, döngü aracılı amplifikasyon (LAMP) analizi yapabilmektedir. Daha sonra kaydedilen ve internet üzerinden klinisyenler veya sağlık uzmanlarıyla paylaşılabilen görünür, kolorimetrik test sonuçlarını gözlemleyebilmektedir. Böyle bir cihazın sağlık sistemi üzerindeki yükü

hafiflettiğine hem bireyler hem de devlet için bakım maliyetlerini azalttığına ve hastalıklarla mücadeleyi geliştirdiği söylenmiştir [14].

Başka bir çalışmada, minyatürleştirilmiş PCR cihazına dayalı hızlı, kullanıcı dostu ve uygun fiyatlı bir IoT (Internet of Things – Nesnelerin İnterneti) sistemi gösterilmiştir. Dengue humması virüsünün tamamlayıcı deoksiribonükleik asidinin (cDNA) amplifikasyonu ile sistemin kapasitesi incelenmiştir. Elde edilen veriler daha sonra bir Bluetooth arayüzü aracılığıyla Android tabanlı bir akıllı telefona otomatik olarak yüklenmiş ve ardından küresel bir ağa gönderilerek test sonuçları anında dünyanın her yerinde kullanılabilir hale getirilmiştir. Burada sunulan IoT sisteminin, sağlık merkezlerinin DNA veya RNA tarafından tanımlanan bulaşıcı hastalık salgınlarıyla mücadele etmek için önemli bir araç olabileceği söylenmiştir. Sistem, hidrofobik olarak kaplanmış bir cam üzerinde dört sanal reaksiyon odası (VRC) ve tam entegre gerçek zamanlı bir PCR'den oluşmaktadır (Şekil 1.4.). PCR çip boyutu 18mm x 18mm olarak ayarlanmıştır. Dengue virüsünün cDNA'sını tespit etmek için 40 döngüden oluşan işlem, ≈ 34 dk gerektirmiştir. Cihazın, her tür influenza, sıtma ve insan immün yetmezlik virüsü gibi diğer hastalıklar için kullanılabileceği söylenmiştir [18].



Şekil 1.4. Üretilen minyatürize PCR Sistemi [17].

SARS-CoV-2 tespiti için Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 testi, Abbott ID Now COVID-19 testi, Renkli SARS-CoV- dahil olmak üzere farklı test sistemleri ve tespit kitleri de mevcuttur [17], [18]. Ticari olarak temin edilebilen yaklaşık 388 geleneksel RT-PCR COVID-19 test kiti vardır ve bunların 71'i Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (US-FDA) tarafından onaylanmıştır [19]. SARS-CoV-2 tespiti için piyasada bulunan RT-PCR POC cihazları, Visby Medical RT-PCR Taşınabilir Cihaz, Xpert Xpress SARS-CoV-2/Flu/RSV testi, Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 POC testi, Cue COVID-19 Testi, Abbott ID NOW COVID-19 testi, Roche cobas SARS-COV 2 testi, Accula SARS-CoV-2

yanal akış testi ve VitaPCR™ RT-PCR testi olarak örneklenebilir. Bu sistemlerden bazılarının özelliklerinin özeti Tablo 1.1.'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Ticarileştirilmiş COVID-19 Teşhis Testleri [15], [20], [21].

	Cepheid Xpert Xpress Sars CoV2 Test	Abbott ID Now COVID-19 Test	Color SARS-CoV-2 Test	BioFire COVID -19 Test
<i>Örnek Tipleri</i>	Nazofaringeal sürüntü	Boğaz, burun veya nazofaringeal sürüntü	Nazofaringeal, orofaringeal, anterior nazal sürüntüler, nazal aspiratlar ve bronkoalveolar lavaj örnekleri	Nazofarengeal, orofaringeal, orta konka nazal veya anterior nazal sürüntüler
<i>Sonuçlar</i>	Pozitifler için 30 dk, negatifler için ~ 45 dk	Pozitifler 5 ila 13 dk, negatifler 13 dk	72 saat	45 dk
<i>Ek Özellikler</i>	Örnek ekstraksiyonu otomatik ve entegre	Gerçek zamanlı RT-PCR İzotermal nükleik asit amplifikasyon teknolojisi	Döngü aracılı izotermal amplifikasyon teknolojisi (LAMP)	multiplex nested PCR
<i>Yayın Tarihi</i>	FDA 3/20/2020	FDA 3/27/2020	-	FDA 3/23/2020

1.4.2. Patentler

2015 tarihli US9044754B2 numaralı patent, düşük sıcaklıkta beraber pişirilen seramiklerden (LTCC) yapılmış çok sayıda katman içeren bir mikro PCR çipiyle ilgilidir. Ayrıca tek kullanımlık LTCC mikro PCR çipine sahip, taşınabilir, gerçek zamanlı PCR cihazı da sağlamaktadır. Cihazın amacı, daha hızlı PCR performansı gerçekleştirebilen mikroçip üretmek, mikroçip üretimi için yöntem geliştirmek ve mikro PCR cihazını kullanarak hastalık teşhis etmek için yöntem geliştirmektir. Mikroçip üretim yöntemi adımları aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir;

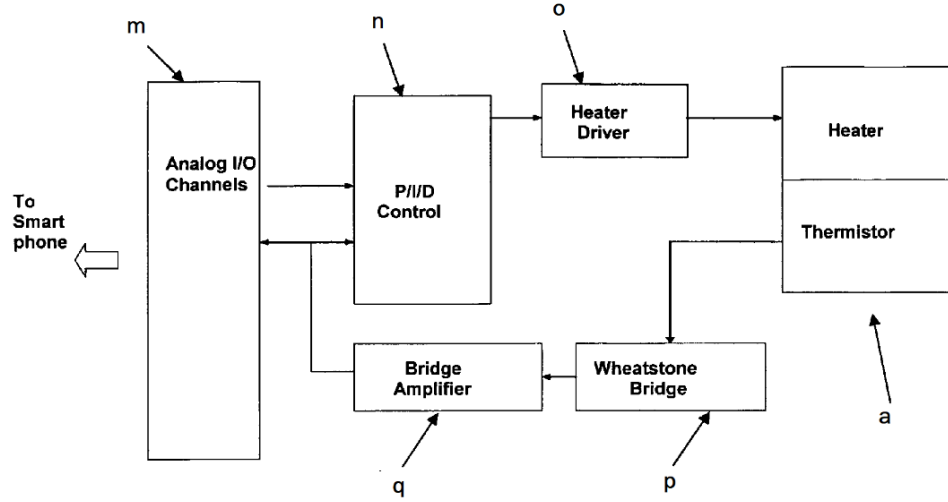
- I. LTCC'den yapılmış ve reaksiyon odası oluşturmak için kuyucuklara sahip çok sayıda katman düzenlenmiştir,
- II. Reaksiyon odasının altına ısıtıcı içeren en az bir adet LTCC katmanı koyulmuştur,

- III. Isıtıcı ile reaksiyon odası arasına bir veya birkaç iletken katman yerleştirilmiştir,
- IV. Mikroçipi oluşturmak için ise katmanlar birleştirilmiştir.

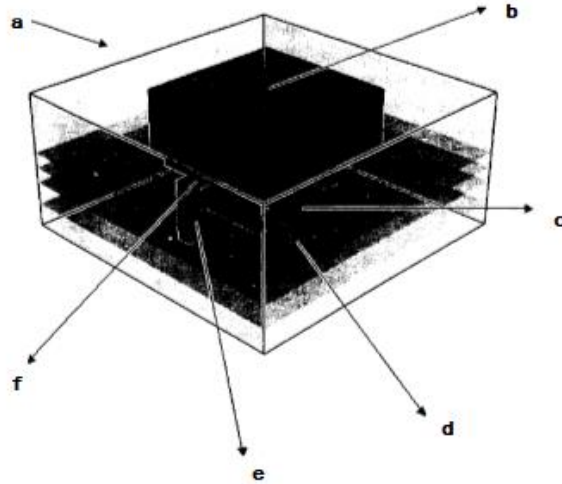
Mikroçip PCR cihazı ise aşağıdakilerden oluşmaktadır;

- I. Çok sayıda LTCC katman içeren bir mikroçip için, örnek yüklemeyi sağlamak amacıyla çoklu katmanlar halinde reaksiyon odası oluşturulmuştur. İletken reaksiyon odasının altına yerleştirilmiş bir katmana gömülmüştür. Isıtıcı ise iletken katmanlar altına yerleştirilmiş bir katmana gömülmüştür.
- II. Çip sıcaklığını ölçmek için mikroçip içine veya dışına sıcaklık sensörü yerleştirilmiştir.
- III. Sıcaklık sensör girişine ısıtıcıyı kontrol etmek için kontrol devresi bağlanmıştır.
- IV. Örnekten flüoresans sinyali tespit etmek için optik sistem kullanılmış ve herhangi bir örnekteki analiti tespit etme veya hastalık durumunu teşhis etme yöntemi kullanılmıştır.

Elde edilen cihaz el tipidir. Portatif bir bilgisayar platformu ile kontrol edilmektedir. Mikroçip, cihazdan ayrılabilir. Kontrol devresi, ısıtıcıyı kontrol eden açma/kapama veya PID kontrol devresinden oluşmaktadır. Ayrıca cihaz çoklu PCR gerçekleştirebilmek için düzenlenebilmektedir. Isıtıcıyı ve termistörü kontrol eden devrenin blok diyagramı Şekil 1.5.'te gösterilmiştir. PCR çipi ise 12 katmanlı LTCC'den oluşmaktadır ve çipin kuyucuk hacmi 1 µl'den 25 µl'ye kadar değişebilmektedir. Tek kullanımlık PCR mikroçipi, gömülü bir ısıtıcı tarafından ısıtılan ve gömülü bir termistör tarafından izlenen bir reaksiyon odasından oluşmaktadır. Reaksiyon odası katmanları ise altı katmandan oluşmaktadır. Şeffaf sızdırmaz kapak polimer bir malzemeden seçilmiştir, örneğin reaksiyon odasından buharlaşmasını önlemek için kullanılmıştır. Şekil 1.6. ise, reaksiyon odasını veya kuyucuğunu gösteren mikro PCR çipinin bir düzenlemesinin 3B görüntüsünü göstermektedir.



Şekil 1.5. US9044754B2 numaralı patent Isıtıcı ve termistörü kontrol eden devrenin bir düzenlemesinin blok diyagramı.



Şekil 1.6. US9044754B2 numaralı patent LTCC mikro PCR çipinin bir düzenlemesinin üç boyutlu görünümü.

Bu cihaz ile teşhis için kullanılan yöntem adımları aşağıdaki gibidir;

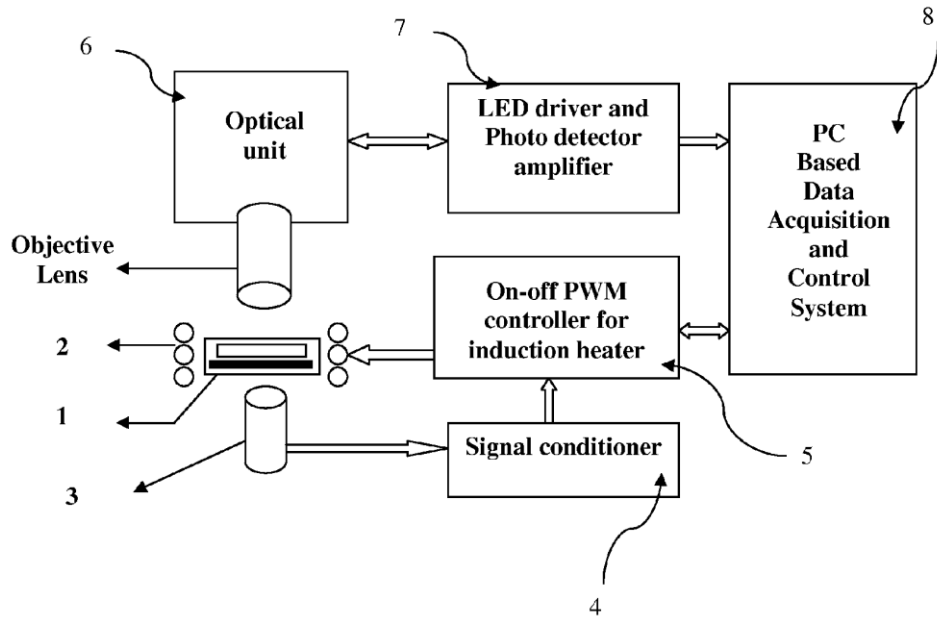
- I. Çok sayıda LTCC katmanına sahip mikroçip üzerine nükleik asit (DNA veya RNA) içeren bir örneği yüklemek,
- II. Mikro PCR cihazını çalıştırarak örneği amplifiye etmek,
- III. Amplifiye nükleik asidin flüoresans okuma sonuçlarına dayanarak analit varlığı veya yokluğunu belirlemek, hastalık durumunu teşhis etmek için ise

amplifiye nükleik asidin flüoresans okuma sonuçlarına dayanarak patojen varlığı veya yokluğunu belirlemek.

Kullanılan örnek yiyecek veya biyolojik bir örnek olmaktadır. Biyolojik örnek kan, serum, plazma, dokular, tükürük, balgam ve idrar içeren bir gruptan seçilmiştir. Patojen; virüs, bakteri, mantar, maya, protozoa içeren bir gruptan seçilmiştir. Sonuçta bu cihaz kullanılarak azaltılan termal kütle ve iyileştirilmiş ısıtma/soğutma hızı ile 30 – 40 döngülü reaksiyonların tamamlanması için 2 ila 3 saat arasında geçen süre, 5 – 25 µl örnek hacmi için bile, 30 dk'dan daha kısa süreye kısaltılabilmektedir. 45 döngülü PCR ile 45 dk amplifikasyon elde edilmiştir. Buna karşılık Hepatit B Viral (HBV) DNA amplifikasyonu için geleneksel PCR süresi 45 döngü ile 2 saat sürmüştür. Çip içerisindeki sıcaklık profilinin homojenliği belirlendikten sonra, mikroçip üzerinde PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş, λ DNA fragmanları ve salmonella DNA bu mikroçip kullanılarak başarıyla amplifiye edilmiştir.

2013 tarihli, US2013/0101983A1 numaralı patentin amacı, bir indüksiyon ısıtıcısı ve kızılötesi radyasyon sıcaklık sensörüne sahip temassız gerçek zamanlı mikro-PCR sistemi sağlamaktır. Diğer bir amacı ise bir reaksiyon bölmesi ve bir gömülü metal ısıtıcıya sahip çipte temassız gerçek zamanlı mikro PCR sistemi gerçekleştirmektir. Sistem, örneği tutmak için bir reaksiyon bölmesine ve ısıtmak için ise reaksiyon bölmesinin altında gömülü bir metal ısıtıcıya sahip çip içermektedir. Ayrıca flüoresans tespit etmek için çipin üzerine yerleştirilmiş LED sürücüsü ve fotodetektör amplifikatör içeren optik birime sahiptir. Temassız gerçek zamanlı mikro-PCR sistemini çalıştırma yöntemi, örneğin çipin reaksiyon odasına doldurulması işlemlerini içermektedir. Örnek, gömülü bir metal ısıtıcı kullanılarak ısıtılmaktadır. Daha sonra metal ısıtıcının sıcaklığı bir kızılötesi sıcaklık sensörü kullanılarak ölçülmektedir. İndüksiyon ısıtıcıya giden güç, kızılötesi sıcaklık sensöründen alınan geri beslemeye dayanarak kontrol cihazı tarafından düzenlenmektedir. Hapsolmuş hava, örneği doldurmadan önce çipin bir ucunda bulunan delik aracılığıyla reaksiyon odasından dışarı akmaktadır. Şekil 1.7., temassız mikro-PCR sistemini gösteren örnek bir düzenlemedir. Şekil 1.7.'de görüldüğü gibi sistem, bir indüksiyon ısıtıcısına (2) endüktif olarak bağlanmış gömülü bir metal ısıtıcıya sahip polidimetilsiloksan (PDMS) çipini (1) içermektedir. Kızılötesi radyasyon sıcaklık sensörü (3), ısıtıcı sıcaklığını çipin altından (1) ölçmektedir. Sıcaklık sinyali ayar noktası ile karşılaştırılmakta ve endüksiyon ısıtıcıya (2) gidecek güç, bir darbe genişlik modülasyonu (PWM) açma-kapama kontrol devresi (5) aracılığıyla düzenlenmektedir. Flüoresansı tespit etmek için, LED sürücüsüne ve fotodetektör

amplifikatörüne (7) sahip bir optik toplama birimi (6) çipin üzerine yerleştirilmiştir. Fotodedektör amplifikatörü (7) ve PWM açma-kapama kontrol devresi (5), bir veri toplama ve kontrol sistemi (8) ile arayüzlenmiştir. Bahsedilen veri toplama ve kontrol sistemi (8), polimeraz zincir reaksiyonu parametrelerini izleyen bir programa sahiptir. Çipin (1) üst yarısı, kopyalama kalıplama tekniği kullanılarak üretilmiş reaksiyon odasından oluşmaktadır. Sybr Green boya için optimize edilmiş flüoresans tespit sistemi, bir dikroik ayna kullanılarak yansıtılan ve 20X mikroskop lensi kullanılarak PDMS çipine (1) odaklanan 470 nm mavi LED uyarma kaynağından oluşmaktadır. PCR reaksiyonu gerçekleştirilirken ilk olarak PCR örneği hazırlanmaktadır. Örnek; 2xDyNAmo Sybr green Master karışımı, Taq polimeraz, Lambda DNA, PCR suyu ve primerler kullanılarak yapılmaktadır. Yaklaşık 5 ila 10 µl arasında olan örnek hacmi, üst kapak delinerek PDMS çipinin (1) reaksiyon odasına enjekte edilmektedir. Bu işlem sırasında sıkışan hava ise deliğe doğru itilmektedir. PCR örneğine sahip PDMS çipi (1), indüksiyon ısıtıcısının (2) bobininin içindeki küçük bir tutucuya yerleştirilmektedir. PDMS çipi (1) ve optik kafa (6) yerine yerleştirildikten sonra, mikrodenetleyiciye yazılım kontrolcüsünü çalıştırmak için komut verilmektedir. Reaksiyonun parametreleri, yani ilk inkübasyon sıcaklığı ve zamanı, denatürasyon, bağlanma ve uzatma aşamaları için ilgili sıcaklık ve süreye sahip döngü sayısı, son uzama sıcaklığı ve zamanı da yazılıma girilmektedir. Yazılım daha sonra her adım için sıcaklığı ve zamanı kontrol eden donanıma komutlar göndermektedir. Flüoresans, her döngü sırasında sürekli olarak veya kullanıcı tarafından belirlenen zamanlarda kaydedilmektedir. Reaksiyondan sonra, örnek oda sıcaklığına soğutulmaktadır. PDMS çip (1) soğuduktan sonra tutucudan çıkarılabilmektedir. Flüoresans ve sıcaklık verileri yazılımdan alınabilmekte ve analiz edilebilmektedir.



Şekil 1.7. US2013/0101983A1 numaralı patent, Temassız mikro PCR sisteminin blok diyagramı (1; PDMS chip, 2; ısıtıcı, 3; kızılötesi sıcaklık sensörü).

2. TEMEL BİLGİLER

2.1.Nükleik Asitler

Nükleik asitler (NA) polinükleotidlerdir, yani nükleotidler adı verilen bir dizi neredeyse aynı olan yapı taşlarından oluşan uzun zincirli moleküllerdir. Her nükleotid, bir fosfat grubuna bağlı olan pentoz (beş karbonlu) şekere bağlı nitrojen içeren aromatik bir bazdan oluşmaktadır. Her nükleik asit, nitrojen içeren beş olası bazdan dördünü içermektedir: adenin (A), guanin (G), sitozin (C), timin (T) ve urasil (U). A ve G pürinler olarak, C, T ve U ise pirimidinler olarak adlandırılmaktadır. Tüm nükleik asitler A, C ve G bazlarını içermektedir. Ancak T sadece DNA'da bulunurken U RNA'da bulunmaktadır. DNA'daki pentoz şekeri (2'-deoksiriboz), şeker halkasının 2' karbonunda bir hidroksil grubunun (—OH) olmamasıyla RNA'daki (riboz) şekerden ayrılmaktadır [22].

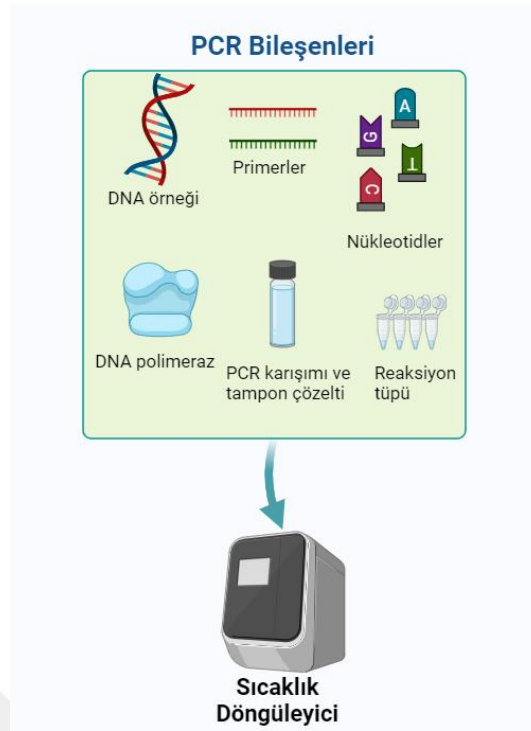
DNA, değişen fosfat ve deoksiriboz şeker kalıntılarının bir omurgası aracılığıyla birleştirilen dört nükleotit A, C, G ve T'nin bir polimeridir. Azot içeren bu bazlar, aralarında hidrojen bağı oluşturma yetenekleri sayesinde tamamlayıcı çiftler oluşturmaktadır. Dolayısıyla DNA çift sarmal yapıdadır. A her zaman iki hidrojen bağı yoluyla T ile ve G her zaman üç hidrojen bağı yoluyla C ile eşleşmektedir. Doğal yol ile oluşan DNA'da T miktarı A miktarına ve G miktarı C miktarına eşittir. Bu yapı, molekülün kimyasal kararlılığı ile DNA'yı ideal genetik materyal yapmaktadır. Tamamlayıcı bazlar arasındaki bağ aynı zamanda DNA'nın replikasyonu ve genetik bilginin iletilmesi için bir mekanizma sağlamaktadır. Ayrıca, doğal yol ile oluşan DNA molekülleri dairesel veya doğrusal olabilmektedir [22].

RNA, fosfat ve riboz şekerlerinin bir omurgası aracılığıyla birleştirilen dört nükleotit A, C, G ve U'nun tek sarmallı bir nükleik asit polimeridir. DNA'dan alınan bilgiyi bir hücrenin anlayabilmesi için gerekli olan proteinlere dönüştüren ilk ara maddedir. Bazı RNA'lar hücrel metabolizmada bazı görevleri gerçekleştirmektedir. RNA, gen adı verilen çift sarmallı DNA'nın bir bölümündeki baz dizisinin tek sarmallı nükleik asit parçasına kopyalanmasıyla yapılmaktadır. Transkripsiyon adı verilen bu süreç RNA polimeraz adı verilen bir enzim tarafından katalize edilmektedir [1], [22].

2.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu

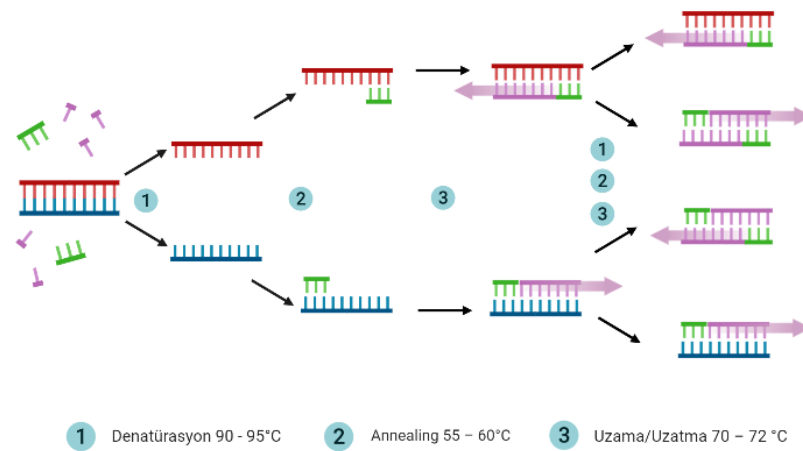
PCR, 1984 yılında Kary Mullis tarafından DNA'nın amplifikasyonu için geliştirilmiş bir tekniktir. PCR hücre dışı ortamda DNA'nın enzimatik replikasyonunu sağlayarak DNA dizisinin, genlerin ve RNA transkriptlerinin milyonlarca kopyasını hızla üretebilmektedir. PCR teknolojisi ise 1955 yılında ilk DNA polimerazın keşfiyle başlamıştır. O zamandan beri araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR, klinik teşhis, tıbbi, biyolojik ve adli analiz dâhil olmak üzere birçok yaşam bilimi uygulamasında devrim yaratmaya devam etmektedir [6], [23], [24].

PCR, her adımın farklı sıcaklıkta gerçekleştiği üç aşamalı bir işlemdir. Bu işlemler; denatürasyon (90- 95°C), bağlanma (55 – 60 °C) ve uzatmadır (70 – 72 °C). Her PCR testi, DNA polimeraz enziminin, ekstrakt edilmiş DNA örneğinin, primerlerin ve nükleotitlerin varlığına ihtiyaç duymaktadır (Şekil 2.1.). Ekstrakt edilmiş kalıp DNA, amplifiye edilmesi gereken tanımlanmış hedef dizidir. DNA polimeraz ise, PCR ürününü oluşturmak için ayrı ayrı nükleotitleri birbirine bağlayan DNA'nın hedef dizilerini çoğaltmak için anahtar bir enzimdir. PCR gerçekleştirilirken kullanılan biyokimyasal bileşenlerden biri olan DNA polimerazların birçok çeşidi bulunmaktadır. *Thermus Aquaticus*'tan klonlanmış, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz (Taq DNA polimeraz) yaygın olarak kullanılmaktadır. *Thermus Aquaticus* (Taq) polimeraz en yaygın olarak kullanılan insana özgü polimerazdır. Taq'ın uzama hızı sıcaklığa duyarlıdır ve 72 °C'lik optimal sıcaklıkta, uzama hızı saniyede 60 ila 100 nükleotid arasında değişmektedir. *Thermococcus Kodakaraensis* (KOD), 75 °C optimum sıcaklıkta saniyede 100-130 nükleotid uzatma oranına sahip başka bir polimerazdır. Diğer enzimler *Pyrococcus furiosus*'tan (Pfu DNA polimeraz) veya *Thermococcus litoralis*'ten (Vent™ DNA polimeraz) elde edilen DNA polimerazın Taq polimerazdan daha düşük hata oranına sahip olduğu rapor edilmiş ve bazı uygulamalar için avantajlı olabileceği söylenmiştir. Tipik olarak 50 µl reaksiyon başına 0,5-2,5 birim enzim kullanılmaktadır. Reaktanların daha yüksek konsantrasyonlarında amplifikasyon daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu duruma bir örnek olarak Wittwer ve ark. tipik bir PCR karışımında bulunanlardan 15 ila 20 kat daha yüksek seviyelerde DNA polimeraz ve primer konsantrasyonlarıyla 1 dakikalık (35 döngü) PCR döngü süresine ulaştığını göstermiştir. Malzemelerle ilgili masraflar göz önüne alındığında, bu durumun ticari cihazlar için uygun olmadığı düşünülmektedir [16], [25], [26].



Şekil 2.1. DNA örneği, primerler, nükleotidler, DNA polimerazdan oluşan PCR bileşenleri.

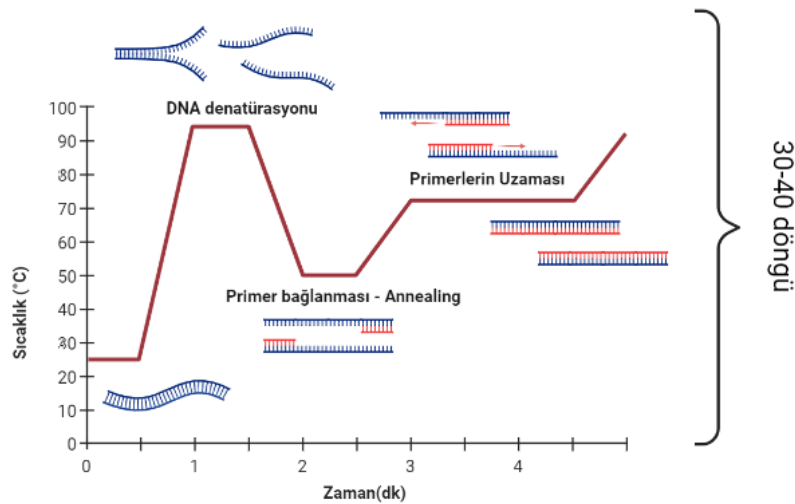
Primer molekülleri, istenen bir hedef nükleik aside bağlanma için tasarlanan uygun kısa ve tek iplikli DNA veya RNA dizileridir. İleri ve ters/geri primer çiftleri 16–28 bp uzunluğundadır. PCR amplifikasyonu için, istenen bir örnekten DNA ekstrakt edilmekte ve primerler, PCR tamponu, deoksinükleotidler (dNTP), magnezyum klorür ($MgCl_2$) ve DNA polimeraz enzimi reaksiyon karışımı tüpüne eklenmektedir. PCR genellikle 25 - 100 μL 'lık bir hacimde gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.2.) [27]–[29].



Şekil 2.2. PCR adımları; 1 denatürasyon; 2 bağlanma veya primer bağlanması; 3 uzama veya uzatma.

Reaksiyon tüpü, aşağıdaki adımlarla gerçekleşecek şekilde tekrarlanan DNA replikasyonu döngüsünü gerçekleştiren bir sıcaklık döngüleyiciye yerleştirilmektedir [30]:

- I. DNA'nın denatürasyonu (reaksiyon tüpü 90 - 95°C'ye ısıtılmaktadır) çift iplikli DNA'nın ayrılması ve iki tekli DNA molekülü ipliği elde edilmesi içindir. Denatürasyon en yaygın olarak 94°C'de gerçekleştirilmektedir, ancak yüksek guanin-sitozin (GC) içeriğine sahip kalıplar için 97-99°C sıcaklıklar gerekli olabilmektedir. İlk birkaç döngüden sonra, PCR sırasında ısı denatürasyonu yoluyla polimeraz aktivitesi kaybını azaltmak için denatürasyon sıcaklığı 90-92°C'ye düşürülebilmektedir [25].
- II. Bağlanma; 55- 60°C'de, ileri ve geri primerler, tek iplikli DNA kalıplarının her birinde belirli bir bölgeye bağlanmaktadır. Primer çiftlerinin erime sıcaklığı (T_m) bağlanma sıcaklığını belirlemektedir, genellikle 50–60°C aralığındadır. Primerler 60-68°C'de etkili bağlanmaya izin verecek şekilde tasarlanmışsa bağlanma ve uzatma adımları tek adımda birleştirilebilmektedir.
- III. Uzatma veya uzama; 70 - 72°C'de, yeni tamamlayıcı DNA zincirleri, DNA polimeraz enzimi kullanılarak primerlerin uzaması ile sentezlenmektedir. (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Tipik Bir Polimeraz Zincir Tepkimesi Sıcaklık Döngüsü. Önce çift sarmallı DNA'yı denatüre etmek için sıcaklık yaklaşık 95°C'ye yükseltilmekte, ardından primerlerin bağlanmasını sağlamak için sıcaklık düşürülmekte (yaklaşık 55°C) ve son olarak polimerazın primerleri uzatması için sıcaklık 70-72°C'ye ayarlanmaktadır. Bir adımdan diğerine geçiş çok hızlı, yaklaşık 1 ila 2 saniye içinde gerçekleşmelidir.

Tipik PCR amplifikasyonu 20-30 döngü boyunca gerçekleştirilmektedir. Çok düşük başlangıç konsantrasyonundaki kalıp DNA ile veya örneğin dejenere primerler veya düşük kaliteli kalıp DNA içeren marjinal amplifikasyonlarla 40 veya daha fazla döngü kullanılabilir [25]. PCR sırasındaki çift sarmallı DNA sayısı her termal döngüden sonra iki katına çıkmaktadır. Sürecin başlangıcında 1 DNA çift sarmallı göz önüne alındığında, 30 termal döngüden sonra reaksiyon odasındaki çift sarmallı DNA konsantrasyonu 2^{30} olmaktadır. Çoğu zaman daha fazla termal döngü daha fazla amplifikasyona yol açmamaktadır. Buna çeşitli faktörler katkıda bulunmaktadır; PCR bileşenlerinin, özellikle de polimerazın bozulması en önemlileri arasındadır. Ek olarak, hedefe uymayan ürünlerdeki artış veya primer bağlanmasındaki azalmanın her ikisi de amplifikasyon saturasyonuna katkıda bulunmaktadır. Sonuç olarak genellikle 30 termal çevrim ideal çevrim sayısı olarak kabul edilmektedir [16].

Kesinlik ve doğruluk, PCR performansını değerlendirmek için kullanılan ana ölçütlerdir. Kesinlik, doğruluktan bağımsız olarak birden fazla testte sonuçların tutarlılığı ile ilgilendirken, doğruluk sonuçların doğruluğu ile ilgilidir. Bir diğer önemli özellik ise özgüllüktür; bir PCR prosedürü ile sadece istenen hedef dizi çoğaltıldığında, bunun özgül olduğu söylenmektedir. Bir PCR işleminin ölçülebilir bir başka özelliği de verimliliğidir. Daha yüksek verimliliğe sahip bir PCR tekniği, daha az ısı döngüsü ile daha fazla amplifiye edilmiş hedef üretme potansiyeline sahiptir. PCR'da, teknolojinin tam olarak tanımlayabildiği ve çoğaltabildiği en düşük başlangıç DNA hedefi seviyesi, tespit limiti (LOD) olarak adlandırılmaktadır. Daha düşük LOD'ye sahip bir PCR yöntemi, yanlış negatif sonuçların daha az ortaya çıkması anlamına gelmektedir [16].

2.3.Tarihçe ve Genel Bilgiler: Geleneksel PCR Cihazları

1994'te Nobel Ödülü'nü kazanan Kary Mullis, 1980'lerde PCR'ni keşfetmiştir. Bu teknoloji, keşfinden günümüze biyolojik araştırmalarda dikkate değer bir devrim yaratmış, teşhis ve genetik modifikasyonları içeren özel alanlarda temel biyolojik süreçlerin anlaşılmasını sağlamıştır [31]. PCR tabanlı teknikler, İnsan Genom Projesi gibi büyük bilimsel başarıları imza atmıştır. Araştırmacılar şu anda bu tekniği hastalıkları teşhis etmek, genleri klonlamak ve sıralamak için kullanmakta ve hızlı ve hassas bir şekilde ileri nicel ve genomik araştırmalar yürütmektedir [32].

Modern PCR'nin kökenleri, Taq DNA polimerazın termofilik bakteri *Thermus aquaticus*'tan izole edildiği 1976 yılına kadar gitmektedir. 1986'da Henry Erlich, Taq polimerazın geniş bir yüksek sıcaklık aralığında aktivitesini sürdürebildiği için PCR'de kullanılabileceğini duyurmuştur. Bu enzim, her döngüde *Escherichia coli* den (E.coli) elde edilen taze DNA polimeraz ihtiyacını ortadan kaldırarak araştırmacılara yardımcı olmuş ve tüm PCR sürecini kısaltmıştır. Kary Mullis ve Cetus Corporation, enzimi 1988'de genel kullanım için ticari olarak üretmiştir. İlk PCR döngüleyicilerin piyasaya sürülmesinden bu yana su banyoları aşamalı olarak kaldırılmış ve DNA'lar otomatik sistemler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu önemli gelişmelere rağmen, Taq DNA polimeraz, yüksek sıcaklıklarda kararsızdır ve DNA'yı amplifiye etmekte güçlük yaratmaktadır. 1980'lerde Taq DNA polimerazın yüksek sıcaklıklardaki verimsizliği ve düşük duyarlılığının üstesinden gelmek için sıcak başlatmaya dayalı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Sıcak başlatma yöntemleri zaman alıcı olmuş ve verimliliklerine rağmen sıklıkla örneklerin çapraz kontaminasyonuna neden olmuştur. Yeni nesil polimerazların yanı sıra gerçek zamanlı ve dijital PCR teknolojilerinin geliştirilmesinden sonra, araştırmacılar PCR'nin uzun vadede biyomedikal alanda ve insan sağlığında önemli bir rol oynamaya devam edeceğini söylemiştir [33], [34].

1980'lerin başında PCR teknolojisinin başlangıcında, PCR ile DNA amplifikasyonu zaman alıcı ve zahmetli bir süreç olmuştur. Termal döngü adımları, denatürasyon, bağlanma ve uzatma için farklı sıcaklıklarda ayarlanmış üç büyük su banyosu arasında DNA örneklerinin tekrar tekrar transferini içeren manuel olarak gerçekleştirilmiştir. O zamanlar ısıya dayanıklı DNA polimerazlar yaygın olarak bulunmadığından, enzimin her turdan sonra yenilenmesi gerekmiştir. "Mr. Cycle" adı verilen geliştirilen ilk otomatik makine ile, sıvı işleyiciler ve su banyoları kullanılmış ve her döngüden sonra enzimin manuel olarak eklenmesi ihtiyacını ortadan kaldırılmıştır. 1987 yılında, ilk ticari termal döngüleyici olan Perkin Elmer Cetus'un TC1 DNA Sıcaklık Döngüleyicisi, metal bir blok kullanarak örneklerin ısıtılmasını ve soğutulmasını programlama yeteneğine sahip olarak piyasaya sunulmuştur. 1988'de, TC1 sıcaklık döngüleyici kullanılarak PCR'de termostabil bir enzimin (Taq DNA polimeraz) ilk kullanımı rapor edilmiştir. TC1 DNA Sıcaklık Döngüleyicinin piyasaya sürülmesinden bu yana, PCR teknolojisinde, PCR deneylerini geliştirmek için çeşitli özellikler sağlayan önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu özellikler arasında daha hassas PCR sıcaklık kontrolü, geliştirilmiş optimizasyon özellikleri, daha hızlı rampa oranları ve daha kolay program kurulumu yer almaktadır [29].

Geleneksel PCR cihazındaki tepkime, uzun reaksiyon süresi, büyük sistem hacmi ve enerji tüketimi, entegre edilme ve taşınma zorluğu, yan ürünler üretmede yüksek risk gibi birçok eksikliği olan kaplar, tüpler ve örnekler arasındaki ısı transferi ile gerçekleştirilmektedir. Geleneksel PCR cihazlarının sadece PCR karışımını değil aynı zamanda tüm odalarını ısıtması ve soğutması gerekmektedir. Bu nedenle geleneksel PCR cihazlarında termal kütle büyüktür. Bu durum genel olarak 1-2 saat süren PCR reaksiyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca geleneksel PCR, analiz maliyetinde payı olan nispeten büyük örnek hacimlerine sahip polipropilen tüpleri kullanmaktadır. Geleneksel PCR, normal bir PCR cihazında 200 µl'lik tüplerle 25 ila 50 µl'lik bir hacimde gerçekleştirilmektedir. 0,2 mL'lik tüplerin kullanıldığı geleneksel PCR cihazları için örnek hacmi 50 µL'den azdır ve 0,5 mL'lik tüpler için ise 100 µL'den düşüktür. PCR reaksiyonlarında düşük hacimli örneklerin kullanılması, PCR testinin duyarlılığı açısından bazı olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Ek olarak, geleneksel PCR kısa parçaları amplifiye etmek için tercih edildiğinde yüksek maliyetli reaktif tüketimine neden olmaktadır. Bunların yanı sıra PCR'nin ana avantajlarından biri, otomatikleştirilebilir olmasıdır. Farklı üreticilerden bir dizi sıcaklık döngüleyici bulunmaktadır. Bu sıcaklık döngüleyiciler, soğutma sistemlerinin tasarımı, tüp kapasitesi, ısıtma bloklarının sayısı, program belleği ve termal homojenite bakımından farklılık göstermektedir. Sıcaklık döngüleyicilerin ilk örneklerinde, soğutma sistemi büyük bir tesisat kompresörüne dayanmaktadır, bu da küçük bir cihaza sahip olmayı imkânsız hale getirmektedir. Günümüzde katı hal Peltier blokları, sıcaklık döngüleyicilerde elektrik akımının yönünü kontrol ederek hem ısıtma hem de soğutma için kullanılmaktadır. Gelişmiş Peltier sistemleri bloğu hızlı bir şekilde ısıtıp soğutabilmektedir [5], [16], [20], [30], [33], [35], [36].

Zaman içerisinde çok daha kısa döngü sürelerine doğru çok fazla ilerleme kaydedilmiştir (Tablo 2.1.). Hızlı PCR yöntemi 1991 yılında ortaya çıkmıştır. 200 µl'lik polipropilen tüp, sınırlı bir ısı kapasitesine sahip ince bir kapiler tüp ile değiştirilmiştir. Bu yenilik, son derece hızlı sıcaklık değişimlerine olanak sağlamıştır. Sonuç olarak, bu PCR cihazları yarım saatlik bir süre içinde 30 termal döngüyü tamamlayabilmektedir. 2000'li yıllarda, tescilli kimyasallara dayanan çabuk PCR protokolleri geliştirilmiştir, ancak bunlar pratikte hızlı PCR teknolojilerinden daha yavaştır (30-60 dk) çünkü geleneksel hacimli ve yavaş rampa hızına sahip cihazları kullanmaktadır. 2010'lardaki ultra hızlı yaklaşımlar ile PCR süreleri 2-10 dk içerisinde gerçekleştirilmiştir. PCR karışımına belirli bir ısı akışı sağlayarak, geleneksel laboratuvar cihazlarıyla karşılaştırıldığında çok daha yüksek sıcaklık

değişim oranları elde edilmiştir. Bunun nedeni mikro fabrikasyon yöntemiyle üretilen cihazların artan yüzey-hacim oranıdır. Aşırı hızlı PCR, primerlerin miktarını artırarak, daha hızlı polimerazlar kullanarak ve döngü başına 0,5-2 saniyelik daha kısa termal döngüler kullanarak hassasiyeti, özgüllüğü, verimliliği veya verimi kaybetmeden bir dakikanın altındaki toplam döngü sürelerine ulaşmaktadır. Aşırı hızlı PCR'ın ilk cihazlarında, bu hızlara örneklerin topluca su banyoları boyunca aktarılmasıyla ulaşılmıştır. Aşırı hızlı PCR'da hız sınırlayıcı adım PCR reaksiyonunun kendisi olmaktadır (uzama adımı); rampa hızları, reaktör duvarından ısı difüzyonu bu durumda daha hızlıdır. Ayrıca çok kısa PCR döngü sürelerine, yalnızca çok temiz DNA örnekleriyle elde edildiklerinden nadiren ulaşılmaktadır; kalan inhibitörler PCR reaksiyon hızının yavaşlamasına neden olmaktadır [7], [9], [16].

Tablo 2.1. Her bir PCR yönteminin yıllar içinde değişimi.

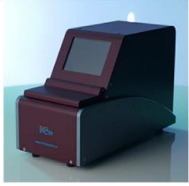
PCR Adı	Yıl	Döngü Başına Zaman	Toplam Zaman (30 Döngü için)
<i>Geleneksel – Slow - Yavaş</i>	1998	2- 4 dk	1-2 s
<i>Rapid - Çabuk</i>	1991	20 - 60 sn	10-30 dk
<i>Fast - Hızlı</i>	2000ler	1-2 dk	30-60 dk
<i>Ultrafast – Ultra Hızlı</i>	2010lar	4 - 20 sn	2-10 dk
<i>Extreme – Aşırı Hızlı</i>	2015	0.5 – 2sn	15-60 sn

Ticari cihazlar dikkate alındığında PCR cihazlarının bir kriteri vardır: örnek hacimleri 20 µl'nin üzerinde olmaktadır. 20 µl'nin üzerinde PCR hacimleri ve 8 dakikanın altında döngü süreleri elde etmek için ısıtma/soğutma kinetiği, akışkan dinamiği, reaktör morfolojisi, malzeme özellikleri ve termal özellik yapısı için hassas spesifikasyonlara ihtiyaç bulunmaktadır [16].

Ticari hızlı PCR cihazlarının bir listesi Tablo 2.2'de verilmiştir. Listedeki yapılabilecek önemli gözlemlerden bir tanesi hemen hemen tüm cihazlarda sabit PCR odaları bulunmasıdır. En hızlı cihazda örnek hazırlığı olmadan işlem süresi 2 dakikadır. En hızlı makine olan MBS Molecular Biology Systems NextGen PCR bir çalışmada RNA ekstraksiyonu ve floresans bazlı ölçüm için kullanılarak COVID-19 tespitini 30 dakikadan daha kısa sürede tamamlamıştır. Bu durum, cihaz tarafından bildirilen sıcaklık döngü süresinin 2 dakika olmasına rağmen genel bir deneyin 30 dakika, yani ~15 kat daha fazla sürdüğü gerçeğini göstermiştir [16], [37]. Ayrıca mevcut sıcaklık döngüleyicilerin sorunları

boyut ve maliyettir. Ticari sistemler tek bir ünite için ~10000 dolara kadar mal olabilmekte ve büyük olması nedeniyle taşınabilir olmamaktadır. Bu durum, gelişmekte olan veya kırsal alanlar için teşhis kolaylığını sınırlamaktadır. Günümüzde sıcaklık döngüleyiciler PCR protokollerinin kolay programlanması için tasarlanmıştır. PCR protokolleri genellikle DNA hedeflerine, primer dizilerine, kullanılan DNA polimerazlara ve deneysel hedeflere göre değişmektedir. Bu nedenle, dokunmatik ekranlar ve kolay programlama özellikleri gibi kullanıcı arayüzleriyle donatılmış sıcaklık döngüleyiciler, protokol kurulumunun daha hızlı ve daha verimli olmasına yardımcı olmaktadır. Son gelişmeler ile aynı zamanda bir mobil cihaz veya masaüstü bilgisayar kullanarak sıcaklık döngüleyicilere her zaman ve her yerden kolay erişime olanak tanınmaktadır. Bulut bağlantısı, gelişmiş erişilebilirlik ve protokol oluşturma ve paylaşmanın yanı sıra PCR işlemlerini planlama, başlatma/durdurma ve izleme özgürlüğü sunmaktadır [29].

Tablo 2.2. Piyasada bulunan hızlı PCR cihazlarının karşılaştırılması.

Sıra	Şirket	Sonuç Alma Süresi	Özellikler	Lansman Tarihi	Fiyat
1	MBS Molecular Biology Systems 	Örnek hazırlığı olmadan 2 dk	Sıcaklık döngüleyici, her biri iki blok içeren üç sıcaklık bölgesine sahiptir. Blokların sıcaklığını değiştirmeye gerek yoktur, bu nedenle süreç son derece hızlıdır	2020	\$14,569
2	Lex Diagnostics 	Örnek hazırlığı ile 5 dk	POC kullanımına yönelik PCR teşhis cihazı. Şu anda İnfluenza A, İnfluenza B ve COVID-19'u tespit edebilmektedir.	2022	-
3	mi Diagnostics 	Örnek hazırlığı ile 12 dk	Si çip, minyatürleştirilmiş bir nano-akışkan kanallar ağı aracılığıyla küçük bir örneği işleyerek hızlı PCR gerçekleştirmektedir.	2022	-

Tablo 2.2. Devam ediyor.

Sıra	Şirket	Sonuç Alma Süresi	Özellikler	Lansman Tarihi	Fiyat
4	AlphaHelix Technologies 	Örnek hazırlığı olmadan 20 dk	Örnek hacmi aralığı 20–100 µL olacak şekilde çalışma başına 24 adede kadar numune işleyebilmektedir. Doğrudan IR ısıtma ve hava soğutmayı kullanır. 6 °C/s'lik ortalama artış.	-	-
5	Bio TEKE 	Örnek hazırlığı olmadan 30 dk	Örnekler ve çoklu hedef gen aynı anda tespit edilebilmektedir. Ultra hızlı sıcaklık artışı ve düşme hızı 8–12°C/s'dir. Yalnızca 10 µL reaksiyon sistemine ihtiyaç duyar, reaktif maliyeti azalır. Hafiftir (8 kg) ve araç aküsü ile çalıştırılabilir.	2021	\$14,800
6	Eppendorf 	Örnek hazırlığı olmadan 40 dk	Mastercycler X50, hızlı PCR çalışmalarını gerçekleştirmek için 10 °C/s'ye kadar hızlı rampa hızına sahiptir.	2018	\$8000
7	Fluidigm 	Örnek hazırlığı olmadan 60 dk	Termal döngü: Peltier bazlı. Isıtma rampa hızı ve Soğutma rampa hızı 5,5 °C/s. Güç gereksinimleri: 100–240 VAC, 50/60 Hz, 8,0 A	2021	\$25,000

2.4. PCR Çeşitleri

Patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar, tüm dünyada hastalıkların ana kaynağı olmaya devam etmektedir. Patojen tespiti ve tedavisi, hastalık etkisini önlemek için kritik

öneme sahiptir. Geleneksel patojen tespit yöntemleri, zaman tüketimi, sınırlı ve düşük hassasiyet gibi bazı sınırlamaları içermektedir.

Son birkaç on yılda yüksek doğruluk, duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirlik sağlayan test için PCR yöntemleri geliştirilmiş, yöntem, faydasını ve çok yönlülüğünü arttırmak için modifiye edilmiştir. Aşağıda PCR çeşitleri verilmiştir [38].

- Multiplex PCR (mPCR), iki veya daha fazla hedef dizinin aynı reaksiyona birden fazla çift primer dahil edilerek amplifiye edilebildiği bir PCR varyantıdır. Hedef dizilerin eşzamanlı olarak tespit edilmesini sağlamaktadır. Laboratuvarda önemli ölçüde zaman ve emek tasarrufu sağlama potansiyeline sahiptir. Bulaşıcı hastalıklar alanında mPCR'nin virüslerin, bakterilerin ve parazitlerin tanımlanması için değerli bir araç olduğu gösterilmiştir. Bugün piyasada solunum yolu enfeksiyonlarını tanımlamak için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış çeşitli mPCR'ler vardır [38]–[40].
- Nested PCR, her biri farklı bir çift primere sahip iki ardışık amplifikasyon işleminden oluşmaktadır. Birinci amplifikasyon reaksiyonunun sonucu, ikinci PCR için kalıp olarak kullanılmaktadır. Kalıp, birinci ve ikinci primer çiftleri arasına yerleştirilen nükleotid dizileri tarafından hazırlanmaktadır. İki çift nükleotid dizisinin kullanılması, daha fazla sayıda döngünün yürütülmesini sağlayarak PCR'nin duyarlılığını artırmaktadır. Bu özelliği sebebiyle özellikle viral DNA'ların çoğaltılması için tercih edilmektedir. İki farklı primer setinin aynı hedef kalıba bağlanması, reaksiyonun özgüllüğünü artırmaktadır. Nested PCR, uzun kalıp bölgelerinin amplifikasyonu için etkili bir tekniktir, ancak hedef dizi hakkında bilgi gerektirmektedir. Özetle, nested PCR, artan duyarlılık ve özgüllüğe sahip uygun şekilde tasarlanmış primerler ile ikili bir amplifikasyon aşamasıdır [41], [42].
- Ters transkriptaz PCR (RT-PCR), tamamlayıcı bir DNA kopyasına (cDNA) dönüştürülen ve amplifiye edilen RNA'nın tespitini sağlamaktadır. Ek olarak, RT-PCR, belirtilen RNA dizilerini enzimatik olarak amplifiye etmek için bir *in vitro* tekniktir. RNA, PCR için bir kalıp olarak kullanılamadığından, bir RT-PCR testindeki ilk adım, RNA kalıbının cDNA'ya ters transkripsiyonudur. Daha sonra cDNA, bir PCR reaksiyonunda üssel olarak amplifiye edilmektedir. Teorik olarak, RT-PCR, PCR'den yalnızca bir ön adım eklenmesiyle, RNA'nın bir RNA'ya bağımlı DNA polimeraz (ters transkriptaz) tarafından bir DNA kalıbına ön-dönüştürülmesi

yönüyle farklılık göstermektedir. RT-PCR, genetik hastalıkları taramak ve çeşitli doku ve hücre tiplerinde gen ekspresyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli örnek popülasyonlarındaki mRNA seviyelerini karşılaştırmak, mRNA ekspresyon modellerini karakterize etmek, yakından ilişkili mRNA'ları ayırt etmek ve RNA yapısını incelemek için de kullanılabilir. Düşük miktarda mRNA'yı tespit etmek için en doğru yaklaşım da RT-PCR'dir. Gerçek zamanlı RT-PCR tekniği, COVID-19 tespiti için yaygın olarak önerilmiş ve kullanılmıştır [38], [43]–[45].

- Gerçek-Zamanlı/Kantitatif PCR (q-PCR), ek bir PCR sonrası işleme gerek duyulmadan eşzamanlı amplifikasyon ve ürün tespitine izin vermektedir. q-PCR çalışmaları, her bir PCR amplifikasyon döngüsü boyunca ampikon birikimini gerçek zamanlı olarak izlemek için floresan algılama teknolojilerini kullanmaktadır. Kantitatif PCR veya q-PCR (genellikle gerçek zamanlı PCR olarak adlandırılmaktadır) çevresel örneklerde bulunan gen veya transkript sayılarını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. q-PCR'nin değişen çevresel veya deneysel koşullar altında yüksek oranda tekrarlanabilir ve hassas bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Gerçek zamanlı PCR, farklı viral enfeksiyonları tespit etmek için hala altın standart olarak kullanılmaktadır. COVID-19 pandemisi sırasında viral enfeksiyonu kontrol etmek için çoklu q-PCR tabanlı testler geliştirilmiştir. Ayrıca ters transkripsiyon (RT) analizleri sıklıkla q-PCR teknikleriyle birleştirilmekte ve bu da genlerin ekspresyonunu ölçmek için güçlü bir araç sağlamaktadır [46], [47].
- Dijital PCR (d-PCR), nükleik asitlerin paralel tek moleküllü amplifikasyon yoluyla doğrudan miktarının belirlenmesini sağlamaktadır. İlk olarak 1990'larda çalışılmıştır. d-PCR, bir PCR örneğini orijinalden binlerce veya milyonlarca alt örneğe bölerek, her bir alt örnekte tek bir kopyası olan veya olmayan DNA molekülleri havuzunu sayısallaştırma amacına göre çalışmaktadır. Bu PCR çeşidi mikroakışkan teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilmektedir ve damlacık tabanlı veya çip tabanlıdır. Ayrıca, standart eğrilere dayalı q-PCR ile zaman alıcı miktar belirlemeden kaçınarak, DNA/RNA kopya sayısının mutlak niceliğini belirleyebilmektedir. d-PCR gibi bir yöntemin, doğru SARS-CoV-2 teşhisi için gerekli olan yüksek hassasiyet, daha yüksek kesinlik ve inhibitörlere karşı direnç sunacağı söylenmiştir. Çalışmalar, boğaz sürüntü örneklerinde SARS-CoV-2 varlığı açısından RT-PCR ile RT-d-PCR'yi karşılaştırmış ve RT-d-PCR'nin RT-PCR'den daha hassas ve doğru olduğunu

göstermiştir. Yapılan bir çalışmada RT-d-PCR'nin, RT-PCR'den on kat daha düşük bir LOD sahip olduğu söylenmiştir. Şu anda, FDA tarafından acil kullanım için yetkilendirilmiş üç adet ticari d-PCR testi bulunmaktadır (Tablo 2.3.) [30], [48], [49].

Tablo 2.3. Ticari olarak kullanılmakta olan FDA onaylı d-PCR testleri [49]–[51].

Kitin Adı	Hedef Genler	Tip	Örnek hazırlama	Test Sayısı	Zaman	LOD	Duyarlılık	Özgüllük	Maliyet (Test Başına)
<i>FastPlex Triplex SARS-CoV-2 Detection Kit</i>	ORF1ab, N, RPP30	RT-d-PCR	Manuel	Kit başına 96 test	90 dk	285.7 kopya/ ml	%>95	%95,7	USD 1152
<i>Gnomegen COVID-19 RT-Digital PCR Detection Kit</i>	N1, N2	RT-d-PCR	Manuel	Günlük 48 örnek	180 dk	Reaksiyon başına 2.5 kopya	%>95	%99	-
<i>Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Test</i>	N1, N2	RT-d-PCR	Manuel	96 örnek	-	400 Kopya/ ml	-	-	-

2.5. İzotermal Amplifikasyon

PCR reaksiyonunu gerçekleştirmenin birkaç yolu bulunmaktadır. Geleneksel yol üç adımlı PCR'dir. Bu üç ana adım, optimum sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Alternatif olarak üç adım bir izotermal reaksiyon halinde birleştirilmekte veya iki sıcaklık adımına bölünmektedir. Sıcaklık adımlarının sınırlandırılması, daha az termal döngüye ihtiyaç duyulduğundan PCR çiplerinin kullanımını kolaylaştırmaktadır. Ancak adımların optimum olmayan sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi ürün veriminin, hızının veya özgüllüğünün düşmesine neden olmaktadır [52].

PCR, tezgâh üstü düzenlemelerde en yaygın olarak uygulanan NA amplifikasyon yöntemi olsa da sabit bir sıcaklıkta gerçekleşen izotermal amplifikasyon yaklaşımları, mikroakışkan uygulamalar ile büyük popülerlik kazanmaya başlamıştır. Gerçek zamanlı PCR'nin termal karmaşıklığını azaltmak amacıyla, nükleik asit amplifikasyonu için tek bir

sıcaklık kullanan yeni bir yöntem olarak geliştirilmiştir. İzotermal amplifikasyon yöntemleri sıcaklık döngüsü gerektirmemektedir. Bunun yerine *in vivo* DNA/RNA sentez mekanizmaları kullanan proteinler gerekmektedir. İzotermal amplifikasyonda sıcaklık döngüsü hızından ziyade enzim aktivitesi oranları sınırlayıcı faktörlerdir. Her deneyde kullanılan enzimlere bağlı olarak, DNA veya RNA'nın izotermal amplifikasyonu, oda sıcaklığından 65°C'ye kadar değişen sıcaklıklarda gerçekleşebilmektedir. Bu yöntemin minyatürleştirilmesinde genellikle reaksiyon sırasında akışkan hareketinin olmadığı mikro odacıklar kullanılmaktadır. Bu durum daha az enerji gerektiren basit bir tasarım avantajı sağlamaktadır. Ayrıca, basit termal profilleri nedeniyle bu yaklaşımlar, POC yöntemleriyle mükemmel uyum sağlamakta, minyatürize POC sistemlerine entegrasyon için çok uygun olmaktadır. Ayrıca izotermal PCR en genç PCR yöntemi olmasına rağmen, ticari ürünleri de piyasada bulunmaktadır [53]–[57].

İzotermal amplifikasyon yöntemleri, PCR'ne umut verici alternatifler haline gelmiştir. Hızlı bir soğutma-ısıtma-soğutma işlemine olan bağımlılığı ortadan kaldıran 30'dan fazla izotermal amplifikasyon tekniği ortaya çıkmıştır. Bu yöntemler, döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA), iplik yer değiştirme amplifikasyonu (SDA), üstel amplifikasyon reaksiyonu (EXPAR), rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA), nükleik asit dizi bazlı amplifikasyon (NASBA), hibridizasyon zincir reaksiyonu (HCR), çapraz primer amplifikasyonu (CPA) ve iplik değişimi amplifikasyonu (SEA) olarak ayrılmıştır. Bu tekniklerin çoğu, enzimlere bağlıdır, böylece amplikonu denatüre etmek için yüksek sıcaklık gereksinimini ortadan kaldırabilmektedir [58]. LAMP özellikleri nedeniyle birçok POC cihazının temelini oluşturmıştır.

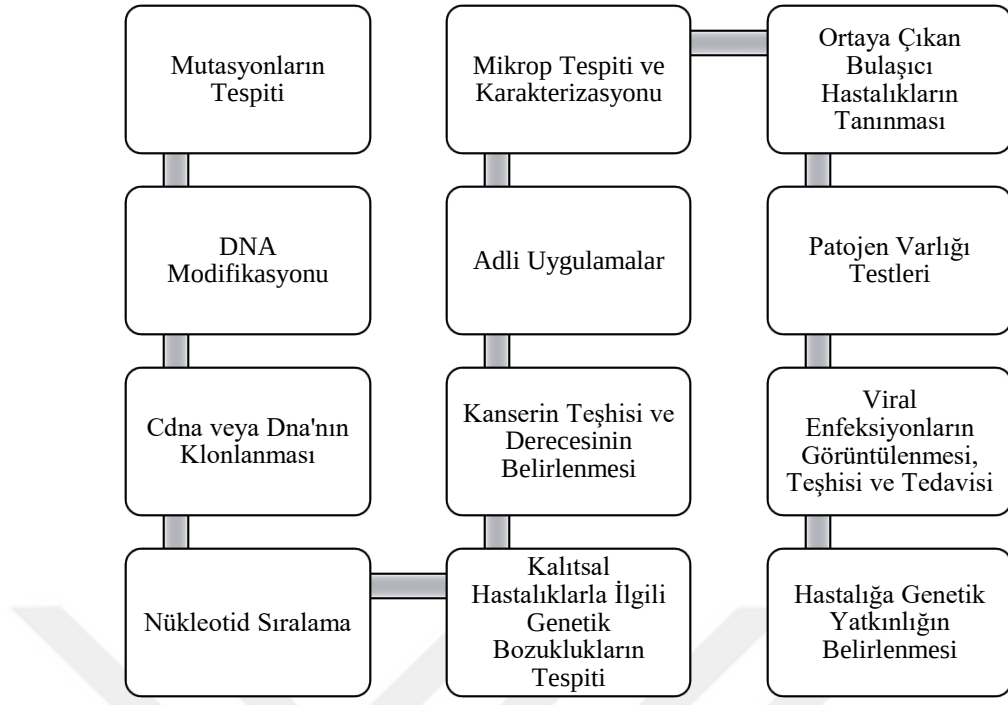
En yaygın olarak kullanılan izotermal amplifikasyon yöntemlerinden biri, diğer yöntemlere kıyasla mükemmel özgüllük sağlayan ve reaksiyon süresini büyük ölçüde azaltan LAMP'dir. LAMP, yoğunluk tespiti, gerçek zamanlı floresan tespiti, kolorimetrik tespit ve yanal akış testi dahil olmak üzere çoklu sinyal tespit yöntemleriyle uyumludur. Yüksek hassasiyet, kısa algılama süresi ve basit kullanım avantajları, POC yöntemleri kadar hızlı teşhis alanlarında da kullanılmasını mümkün kılmaktadır. LAMP, DNA'yı sabit sıcaklıkta (60–65°C) hızla on milyar kopyaya yükseltmek için Bst enzimi (Bst DNA polimeraz) ve 4-6 primer kullanmaktadır. Son yıllarda klinik tanı ve gıda güvenliğinde LAMP teknolojisi kullanılmıştır. Gıda güvenliği alanı, gıda kaynaklı patojenlerin tespiti ve gıda orijinalliğinin tespitini içermektedir. Gıda orijinalliği ise, kolajenlerin ve jelatinlerin tanımlanması gibi gıda bileşenlerindeki genetik belirteçler analiz edilerek LAMP

kullanılarak test edilebilmektedir. LAMP reaksiyon işlemi, karmaşık bir sıcaklık kontrol cihazına ihtiyaç duymamaktadır. Basit bir ısıtma levhası veya fırın genellikle yeterli olmaktadır. LAMP tespiti için DNA ekstraksiyonu gerekmektedir. Ancak, LAMP reaksiyonuna dayalı geleneksel santrifüj mikroadışkan çipleri, DNA ekstraksiyon işlemini içermemektedir [59].

2.6. PCR Uygulama Alanları

DNA'nın PCR ile amplifikasyonu, hücresel DNA veya RNA dizilerinin saptanması için Southern veya Northern blotlamaya göre çok daha hassas bir teknik olarak bilinmektedir. Blot hibridizasyonu ile tespit için bir DNA veya RNA dizisinin yaklaşık 100.000 kopyasına ihtiyaç bulunmaktadır. Buna karşılık, PCR, DNA'nın tek kopyalarını (veya ters transkripsiyondan sonra RNA'yı) kolayca tespit edilebilir seviyelere yükseltebilmektedir. PCR'de amplifikasyonun özgülüğü, kalıp molekül üzerindeki tamamlayıcı dizilere hibridize olan oligonükleotid primerlerinin kullanılmasıyla sağlanmaktadır. Bu nedenle PCR, toplam hücre DNA'sı veya RNA gibi karmaşık karışımlardan belirli bir DNA molekülünü seçici olarak çoğaltabilmektedir. Sonuç olarak PCR amplifikasyonu, tek hücre ekstraktları gibi başlangıç materyalinin çok küçük miktarlarındaki spesifik DNA veya RNA moleküllerini tespit etmek için kullanılabilir. Bu olağanüstü hassasiyet, PCR'yi yalnızca sınırlı miktarlarda mevcut olan hücrelerdeki gen ifadesinin analizi de dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için önemli bir yöntem haline getirmiştir [60].

PCR, artan sayıda hastalığın araştırılması ve teşhisine yardımcı olmaktadır. Nükleik asitler üzerinde veya nükleik asitlerle araştırma yapan tüm laboratuvarlarda standart bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca PCR, DNA dizilimi, kopyalama, gen izolasyonu ve gen ekspresyon analizi için kullanılmaktadır. PCR uygulamaları genel olarak genetik alanda uygulamalar ve bulaşıcı hastalıklarda uygulamalar olarak ikiye ayrılabilir (Şekil 2.4.) [6], [38].



Şekil 2.4. PCR uygulamalarına örnekler.

PCR'nun bulaşıcı hastalıklar ile ilgili uygulamaları;

- Yavaş büyüyen veya zor gelişen mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları teşhis edilmesi,
- Kültüre edilemeyen enfeksiyöz ajanların veya henüz tanımlanmamış organizmaların saptanması,
- Viral enfeksiyonların (hepatit virüsleri, insan Herpes virüsü 8, HIV) görüntülenmesi, tanısı ve tedavisi,
- Yeni ortaya çıkan bulaşıcı hastalıkların tanınması,
- RNA virüslerinin (örneğin, Hepatit C virüsü) veya bir mikroorganizma tarafından kopyalanan spesifik mRNA'nın saptanması,
- İmmün sistem baskılayıcı ilaçlar ile tedavi edilen otoimmün hastalıklarda enfeksiyonların saptanması,
- Antimikrobiyal direncin hızlı tanımlanması olarak örneklendirilebilir [34].

PCR tekniği, milyonlarca kişi arasından bir kişinin kimliğinin tespit edilmesini sağlamaktadır. Adli uygulamalarda olay mahallinden alınan DNA örnekleri, şüpheli DNA'sı veya DNA veri tabanı ile karşılaştırılabilmektedir [30], [61], [62].

Anne baba adayları, genetik hastalıkların varlığı için gen testine tabi tutulabilmekte ve böylece çocukların aynı hastalığı taşıyıcı olma olasılığı PCR sayesinde tespit edilebilmektedir [7], [34]. Genetik hastalığın doğum öncesi tanısı normalde amniyosentez veya koryon villus örnekleme (CVS) yoluyla elde edilen amniyotik sıvı örneği üzerinde gerçekleştirilmektedir. Kistik fibroz gibi hastalıklara yönelik geleneksel tanı testleri 2 hafta kadar sürebilmektedir. PCR testinin sonuçları ise 1 gün içinde alınmaktadır. Hamileliği sonlandırma seçeneği tercih edilirse bu zamandan tasarruf çok büyük fayda sağlayabilmektedir. Ayrıca amniyosentez ve CVS belli miktarda risk taşıdığından daha az invazif örnekleme prosedürleri tercih edilmektedir [25].

Donör ve alıcı arasındaki uyumluluğu kontrol etmek için PCR kullanılarak organ nakli yapılmadan önce doku tiplmesi yapılabilmektedir. Bu yöntem, vücut hücreleri ve dokularının yüzeyindeki antijenleri tanımlamak için geleneksel antikor bazlı kan grubu testinin yerini almıştır [63].

Gıdaların patojenlere karşı izlenmesi PCR kullanılarak yapılmaktadır. Mikrobiyal DNA veya RNA'nın doğrudan tespiti, görünür işaretler ortaya çıkmadan önce kontaminasyonun tespit edilmesini sağlamaktadır. *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ve diğer patojenlere yönelik testler gıda güvenliği testlerinin bir bileşeni haline gelmektedir. Gıda ürünleri ve içerik maddeleri, eklenen gen dizisine özel PCR primerleri kullanılarak genetiği değiştirilmiş organizmaların varlığı açısından da test edilebilmektedir [25].

PCR filogenetik ve evrimsel çalışmalarda da kullanılmaktadır. Türler ve alt türler arasındaki ilişkileri tahmin etmek için ribozomal RNA (rRNA) genleri ve mitokondriyal DNA'nın PCR amplifikasyonu ve taranması kullanılmıştır. PCR, çağdaş türlerin ilişkileri üzerine yapılan çalışmaların yanı sıra, müze koleksiyonlarındaki materyaller üzerinde de yapılabildiğinden soyu tükenmiş türler üzerinde çalışmalara olanak sağlamaktadır. Mitokondriyal DNA'nın amplifikasyonu ve dizilenmesi de evrimsel çalışmalarda kullanılmaktadır [25].

Sonuç olarak PCR ile genetik materyalin (DNA veya RNA) türüne bağlı olarak, uygun modifikasyonlar kolayca yapılabilmektedir. Ayrıca teknik, mikroorganizmalardan bitki ve hayvanlar alemine kadar hemen hemen her tür organizmada geniş bir uygulama yelpazesinde kolayca kullanılabilmektedir [34].

2.7. PCR Sonrası Analiz

Enfeksiyon hastalıklarının klinik yönetimi için patojenik mikroorganizmaların ve bakterilerin tanımlanmasının hızlandırılması gerekmektedir. Bu bağlamda, nükleik asitleri saptamaya yönelik moleküler testler, mikrobiyoloji ve klinik teşhiste devrim yaratmaya devam etmektedir. PCR, üstel bir nükleik asit amplifikasyon tekniği olarak geniş kabul görmüştür ve araştırma alanlarında ve klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ek olarak, klinik örneklerin incelenmesinden elde edilen verilerin yorumlanması, bulaşıcı hastalıkların klinik yönetiminde kritik bir bileşendir [64]. Anlamlı ve güvenilir bilgiler elde etmek için örnek hazırlama, ayırma ve tespit için metodik bir yaklaşım gerekmektedir. Geleneksel olarak, bu aşamalar ayrı ayrı ve sırayla gerçekleştirilmektedir [28]. Geleneksel standart yöntemler (örneğin kültür ortamı ve biyokimyasal testler) zaman alıcıdır ve harcanan emek yoğun olmaktadır. Mevcut analizler moleküler, mikroskopi ve elektromigrasyon teknikleri, DNA parmak izi vb. metodolojilerin kullanımını içeren kapsamlı patojen tespitini gerektirmektedir [65].

Yaygın olarak kullanılan PCR sonrası ürün tespit yöntemleri ise; elektroforez, floresans tabanlı gerçek zamanlı tespit, DNA hibridizasyon mikrodizileri, elektrokimyasal yöntemler olarak ayrılmaktadır [64].

Elektroforetik ayırma yöntemlerinde PCR amplikonları mikroakışkan bir kanala yüklenmeden önce interkalasyon boya ile işaretlenmekte, elektrik alan uygulanmaktadır. Amplikonlar jel matris ile doldurulmuş mikroakışkan kanal boyunca göç etmektedir. Farklı boyutlardaki DNA molekülleri farklı hızlarda göç ederek ayrılmaktadır. PCR sonrası işleme gerek olmadan tespit ile amplifikasyonu birleştiren gerçek zamanlı yöntem floresans teşhisidir [66], [67].

Floresans etiketli veya interkalasyon boya kullanılarak PCR amplifikasyonundan elde edilen sinyallerin güçlendirilmesi ile genel test süresi azaltılmakta ve test sırasında ölçüm alınabilmektedir [68].

Mikrodiziler, katı bir substrat üzerinde sabitlenmiş (veya immobilize) bir dizi hedef nükleik asit olarak bilinmektedir. Çoklu amplikon dizilerinin yüksek verimli analizini, hasta ve sağlıklı hücrelerdeki genlerin aktivitelerinin karşılaştırılmasını sağlamaktadır. PCR ile DNA mikrodizileri entegre eden çalışmalar bulunmaktadır [69].

Elektrokimyasal yöntemler, yüksek hassasiyet, ayarlanabilir seçicilik, düşük güç, düşük maliyet, harici optik bileşenlerden bağımsızlık ve mikrofabrikasyon teknolojisi ile uyumluluk gibi özelliklere sahiptir. Hedef amplikonların konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilecek elektrik sinyalleri üretmek için problemlere veya kimyasallarla işlevselleştirilmiş sensör elektrotlarına gereksinim duymaktadır [68].

2.8. Hasta Başında Teşhis Yöntemleri

POC teşhisi, hastanın yakınında yapılan teşhisi ifade etmektedir. POC, hastanın ihtiyaçları için gerçek zamanlı, hızlı, doğru ve yerinde teşhis için yeni ve akıllı bir stratejidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), kaynakların sınırlı olduğu ortamlarda POC teşhisi için bir dizi kriter şart koşturmaktadır. Bu yöntemde temel kriterler veya POC'nin sunacağı avantajlar, uygun fiyatlı, hassas, spesifik, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipman gerektirmeyen ve son kullanıcıya teslim edilebilir olmasıdır (affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid - robust, equipment-free, deliverable, “ASSURED” kriterleri - WHO). POC teşhis yöntemleri, merkezi laboratuvarların ihtiyaç duyduğu hacimlere kıyasla örnek hacmi gereksinimlerini azaltmaktadır. Diğer POC teşhis yöntemi avantajları, hastanede kalış süresinin azalması ve hasta memnuniyetinin artmasıdır. POC yöntemleri, az veya ön işlem görmemiş örneklerle çalışabilmekte ve saniyeler içinde yanıt oluşturabilmektedir. Bazı testler çok sayıda analit tespit edebilmekte ve çalışması için yalnızca temel eğitim gerektirmektedir. POC kullanımı için üretilen çipler ucuz ve tek kullanımlık olmalıdır. POC teşhisinin maliyet özellikleri, geleneksel laboratuvar analizlerinden farklıdır. Cihazlar, laboratuvar ekipmanlarından daha küçük ve daha özeldir, dolayısıyla daha azdır. Gelişmekte olan ülkelerdeki birçok insan teşhis ve tedavi için ödeme yapamamaktadır. Bu durumda, düşük maliyetli bir teşhisin geliştirilmesi kritik öneme sahip olmaktadır. Hastanın klinik durumunun sürekli izlenmesi, özellikle hastanın evinde tedavisi için çok yardımcı olabilecektir (Şekil 2.5.) [56], [70]–[74].



Şekil 2.5. POC Testinin ve POC Test Cihazlarının Çeşitli Avantajları.

POC teşhisinin yapılabilmesi için POC teşhis yöntemlerinin ve POC cihazlarının geliştirilmesine öncelik verilmelidir. Mikroakışkanlar, mikroeletromekanik sistem teknolojisi (MEMS), nanoteknoloji ve malzeme bilimindeki hızlı gelişmeler, çeşitli bulaşıcı hastalıkların POC teşhisi için temel kriterleri karşılayan entegre POC cihazlarının üretilmesine yardımcı olmuştur. Çip üzerinde laboratuvar (LOC) cihazları, disk üzerinde laboratuvar (LOAD) cihazları, mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihazlar (µPAD'ler), yanal akış cihazları, minyatürleştirilmiş PCR cihazları ve izotermal nükleik asit amplifikasyon cihazları (INAA) POC teşhisinin ilerlemesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur [75].

Klinik teşhis için kullanılan POC cihazları, biyomedikal ve mühendislik disiplinlerinin bulunduğu bir arayüz örneğidir. Son zamanlarda nükleik asit bazlı moleküler testler patojenleri tespit etmek için önemli bir araç haline gelmiş ve POC cihazlarına entegre edilmeye başlanmıştır. Bu tür POC cihazlarının geliştirilmesi için moleküler biyoloji, biyokimya, elektronik, fotonik, mikroakışkanlar ve yazılım mühendisliği gibi alanlarda multidisipliner çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Teknolojinin gelişmesi POC cihazları kavramını sadece sağlık kurumları ile sınırlamamış, yaygınlaştırmıştır. Böylece POC kavramı sadece klinik tanı alanında değil, aynı zamanda biyoalgılama, gıda güvenliği, çevresel algılama vb. alanlarda da uygulanmaya başlamıştır [75].

POC cihazlarının sayısız avantajlarına rağmen, aşağıdaki gibi özetlenebilecek birkaç sınırlaması bulunmaktadır:

- Örneğin yanlış toplanması ve saklanması yanlış negatif sonuca yol açabilmekte,
- Cihaz, farklı genetik hedefleri tespit edecek şekilde ayarlandığında bol bulunan hedef genleri ayırt edememekte,
- Primerlerin yanlış seçilmesi veya hedef genlerdeki mutasyonlar yanlış negatif sonuçlara yol açabilmekte.

- Test örneğinde inhibitörler varsa veya virüs konsantrasyonları yetersizse de yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilmekte.
- Cihazın performansı, popülasyonda bulunan viral varyantlara göre değişiklik gösterebilmektedir [76].

2.9. Mikroakışkanlar Teknolojisinin Hasta Başında Teşhis Yöntemleriyle Entegrasyonu

Mikroakışkanlar genellikle küçük miktarlarda sıvıyı işlemek veya yönlendirmek için mikrometre ölçekli kanallar kullanan teknoloji olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda mikroakışkan teknolojiler kimyasal sentez, biyofabrikasyon, ilaç taraması, organ/doku modelleme alanlarında önemli gelişmelerin yanı sıra biyoloji ve biyomedikal araştırma yolunda da büyük gelişmeler göstermiştir. Mikroakışkanları POC testleri ile entegre ederek, taşınabilirlik, yüksek hassasiyet ve özgüllük gibi gereksinimler kolaylıkla karşılanabilmektedir. Bu özellikler sayesinde akademik araştırmalardan klinik uygulamalara kadar bir dizi mikroakışkan platform ortaya çıkartılmıştır (Tablo 2.4.). Tabloda görüldüğü gibi mikroakışkan teknolojiler kanser ve diğer hastalık türlerinin teşhisi için çeşitli proteinlerin, nükleik asitlerin, tek hücrelerin ve küçük moleküllerin analizinde avantajlara sahiptir. Örneğin Roche COBAS B 101 sistemi, yalnızca 2 µl örnek gerektirmekte ve sonuçlar dakikalar içerisinde alınabilmektedir [77].

Mikroakışkan teknolojisi, geleneksel analitik tekniklere göre önemli avantajlara sahiptir. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilir;

- a. Mikroakışkanlar çok az miktarda örnek ve reaktif kullanmaktadır.
- b. Reaktör ve kanal boyutları mikro ölçekte olup kullanıcıya/araştırmacıya göre ayarlanabilmektedir.
- c. Mikroakışkanlar, test maliyetlerini önemli ölçüde düşürme potansiyeline sahiptir.
- d. Mikroakışkanlar, başka cihazlar kullanmadan örnek alma, ekstraksiyon, kimyasal reaksiyon, ayırma, seyreltme ve tespit tekniklerini birleştirebilmektedir.
- e. Mikroakışkanlar, yüksek verimli analizlere izin vererek birçok işlemi aynı anda gerçekleştirebilmektedir [77].

Tablo 2.4. Biyomedikal analiz için ticari olarak temin edilebilen mikroakışkan sistem örnekleri[77].

Hedef	Şirket	Ürünler	Hastalıklar	Teknolojiler	Zaman
Protein	NanoAce	NanoAce 1024A	Bulaşıcı hastalıklar	İmmünolojik test	<0,5 saat
Nükleik asit	BioFire	FilmArray	Bulaşıcı hastalıklar (RTI, BI, GI, menenjit)	PCR	<45dk (RTI), <1 saat (BI) 1saat (GI) 1saat (menenjit)
Nükleik asit	Cepheid	GeneXpert system	Bulaşıcı hastalıklar (MRSA, MTB/ RIF), Kanser	qPCR, RT-PCR	1 saat
Nükleik asit	Abbott	ALERE Q	HIV	İzotermal amplifikasyon	52 dakika
Nükleik asit	Mobidiag	Novodiag	Bulaşıcı hastalıklar, antibiyotik direnci	RT-PCR	1 saat
Küçük molekül	Roche	COBAS B 101	Birincil bakım (lipid profili, chol, HDL, LDL, TG)	İmmünolojik test	6 dakika

(RTI, solunum yolu enfeksiyonu; BI, kan enfeksiyonu; GI, gastrointestinal enfeksiyon; MRSA, metisiline dirençli Staphylococcus aureus; MTB, mycobacterium tuberculosis; RIF, rifampin; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; TG, trigliserit) [77].

Mikroakışkanlar birçok POC cihazında kullanılmaktadır. Mikroakışkanlar, POC testleri ile entegre edildiğinde taşınabilirlik, yüksek hassasiyet ve özgüllük gibi gereksinimleri kolayca karşılayabilmektedir. Bu özelliklerden dolayı akademik araştırmalardan klinik uygulamalara kadar birçok mikroakışkan platform geliştirilmiştir. WHO, kaynakların kısıtlı olduğu ortamlarda teşhis araçlarının geliştirilmesine rehberlik etmeye yardımcı olacak bir dizi gereksinim önermiştir. Bu gereksinimler uygun fiyatlı, hassas, özel, kullanıcı dostu, hızlı ve sağlam, ekipmansız ve son kullanıcılara teslim edilebilir, kısaca “GÜVENİLİR (ASSURED)” olarak kısaltılmıştır. Mikroakışkan teknolojileri, günümüzde “ASSURED” kriterlerini karşılayan etkili araçlar olarak popülerlik kazanmaktadır. Mikroakışkan tabanlı sistemler yalnızca az miktarda sıvı gerektirmekte ve

POC’de bulaşıcı hastalık teşhisi ve gerçek zamanlı izleme için kullanılabilmektedir [56], [78].

Mikroakışkan teknolojisinin PCR tabanlı amplifikasyonla entegrasyonu, eser miktarda nükleik asidin hassas ve hızlı tespitini sağlamaktadır. DNA amplifikasyonu için en klasik teknik olan PCR, genetik analiz için mikroakışkanlar ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroakışkan cihazın, DNA amplifikasyonu için “denatürasyon – bağlanma – uzama” döngüsünü gerçekleştirmesinde sıcaklık kontrol modülünün entegre edilmesi gerekmektedir. Bu durum cihazın üretim karmaşıklığını ve maliyetini arttırmaktadır. Mikroçip tasarımı, ısıtıcı sayısını ortadan kaldırabilmekte ve buna bağlı olarak maliyeti düşürmektedir. Örneğin, mikroakışkan cihaz ortasına bir ısıtma çubuğu yerleştirmek, merkezi bir denatürasyon bölgesi oluştururken, doğal olarak oluşan termal gradyan, çevredeki sıcaklığı bağlanma ve uzama/uzatma için uygun hale getirmektedir [15], [79].

2.10. Mikroakışkan Tabanlı PCR Çipler

LOC olarak da bilinen mikroakışkan çip, sıvı hareket sistemine ve birkaç santimetre karelik çip üzerinde örnek hazırlama, reaksiyon, sıralama, algılama ve diğer temel işlemleri entegre edebilen fonksiyonel birim modüllerine sahiptir. İlk mikroakışkan PCR cihazı, sıcaklık döngülerinin sürekli-tek fazlı bir akışta gerçekleştirildiği 1993’te ortaya çıkmıştır. 1996 yılında ise bir elektroforez çip sistemi geliştirilmiş ve 540 sn’de 150 baz okuyarak %97 doğruluk oranıyla DNA dizilemeyi başarıyla gerçekleştirilmiştir [80].

Mikro toplam analiz sistemleri (μ -TAS) uygulamaları, temel bilim, klinik tıp ve saha çalışmasını kapsamaktadır. Bu uygulamalar için tasarlanan deney cihazları, mevcut yöntemlerde iyileştirmeler sunmakta veya temelde yeni stratejiler sağlamaktadır. μ -TAS platformları, PCR’na dayalı nükleik asit analizleri için benzersiz avantajlar sunmaktadır. Paralel üretim, çok sayıda reaksiyon kabında dijital PCR’ye izin verirken, örnek işleme ve minyatürleştirmenin entegrasyonu, örnek ve reaktif tüketimini azaltarak test performansına fayda sağlamaktadır. Mikroakışkan PCR çiplerinin ticari gelişimi, PCR ile kapiler elektroforezi birleştirmiş ve örnek işlemede μ -TAS potansiyelini göstermiştir. Bu durum genetik analizlerde mikroakışkan çiplerin pratik uygulamaları için önemli bir temel sağlamıştır [36], [81].

Mikroakışkan çiplerin kullanılması, geleneksel PCR cihazlarında bulunan çeşitli problemlerin üstesinden gelebilmektedir. Örneğin;

- Daha küçük hacimli bir reaksiyon sistemi, ısıyı daha hızlı iletebilmektedir, bu durum reaksiyon hızını önemli ölçüde arttırmaktadır, spesifik olmayan amplifikasyondan kaçınmakta ve verimliliği arttırmaktadır;
- Kapalı sistem, sık yapılan manuel işlemlerden kaynaklanan örnek kontaminasyonu ve çözelti kaybını azaltmaktadır;
- Mikro ve taşınabilir sistem gerçek zamanlı algılama, vb. için uygun olmaktadır [29].

Aynı şekilde mikro ya da minyatürize PCR, büyük yüzey-hacim oranına bağlı olarak hızlı ısı aktarımı ve küçük boyutundan dolayı difüzyon ile hızlı karıştırma sağlayabilmektedir. Ayrıca örnek işleme, teşhis, karıştırma ve ayırma işlemleri tek bir mikroçip içerisinde entegre edilebilmektedir. Mikro PCR ile PCR karışımı, PCR işlemi sırasında daha homojen sıcaklıklara maruz kalmakta böylece verim artmaktadır. Minyatürize PCR'nun diğer bir özelliği, yerinde teşhis ve analiz yapılmasını sağlayan taşınabilirliğidir. Ancak, yüzey ve örnek/reaktif arasındaki etkileşimler, geniş yüzey-hacim oranından dolayı PCR inhibisyonu ve taşıyıcı kontaminasyonuna yol açabilmektedir [5].

Mikroakışkan PCR çiplerinin tasarımındaki başlıca teknik zorluklardan biri kabarcık oluşumunun ve örnek buharlaşmasının önlenmesi olmuştur. Kompakt, kapalı bir PCR reaksiyon odasının kullanımı bilimsel araştırma ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, reaksiyon odası içerisinde hapsolmuş hava bulunduğunda ve özellikle sıvı sıcaklığı 90 °C'yi geçtiğinde havanın genleşmesine neden olmaktadır. PCR odasının içindeki hava kabarcığı arttığında, yerel basınçta artışa neden olmakta ve potansiyel olarak PCR reaktiflerinin buharlaşmasına ve PCR odasından dışarı çıkmasına neden olmaktadır. Hızlı mikroakışkan PCR cihazlarının etkinliğini arttırmak için buharlaşma kaybı sorununu ele almak gerekmektedir [16].

2.11. Mikroçip Üretiminde Kullanılan Malzemeler

DNA ekstraksiyonu, PCR amplifikasyonu ve DNA parça ayrımı için mikroçiplerin üretiminde, daha geleneksel cam ve silikonun yanı sıra alternatif polimer bazlı malzemeler dahil olmak üzere çeşitli substratlar kullanılmıştır [82]. Sıkça kullanılan malzeme örnekleri:

- Cam,
- Silikon,
- Kuartz,
- Seramikler,
- Polimetilmetakrilat (PMMA), Siklikolefin kopolimer (TOPAS), Polistren (PS), polikarbonat (PC), polidimetilsiloksan (PDMS) gibi polimerlerdir [28], [29].

Mikroakışkan cihazlar, DNA analizi için güçlü araçlar olarak daha yaygın hale geldikçe, odak, başlangıçta geliştirilen cam ve kuartz cihazlardan yeni polimerik malzemelere kaymıştır. Polimerik malzemeler, tek kullanımlık cihazların düşük maliyetli üretimini sağlayan hızlı ve basit bir üretime izin vermektedir. Polimer ve diğer malzemelere ek olarak kâğıt yüzeyinde hidrofilik ve hidrofobik alan oluşturmak için işlenen kâğıt mikroakışkan çipler de bulunmaktadır. Bu malzemelere dayalı olarak, kanal ağ yapıları mikro borular, mikro pompalar, mikro valfler, mikro reaktörler, elektrotlar gibi diğer işlevsel birimler ile bir mikroakışkan sistemi oluşturabilmektedir [80], [82].

Bunlar arasında, silikon ve cam iyi kimyasal inertliğe ve termal kararlılığa sahiptir. Silikon ile karşılaştırıldığında, mekanik mukavemeti daha yüksek olan cam, PCR çipleri için daha iyi bir malzeme olarak belirtilmiştir. PDMS mükemmel biyouyumluluk ve güçlü esnekliğe, yüzeyi ise sayısız malzeme ile iyi afiniteye sahiptir. Bununla birlikte, PDMS'in düşük termal iletkenlik ve zayıf ısı dağılımı gibi PCR için olumsuz sayılabilecek özellikleri de vardır. PDMS-cam hibrit çipler geliştirilerek, ısı dağılımı ve optik özellikler aynı anda iyi bir şekilde iyileştirilmiştir. Özetle bu malzemelerin seçilmesinin nedenleri şunlardır:

- (i) İyi biyouyumluluk, çalışma ortamı ile reaksiyona girmeme,
- (ii) İyi elektrik yalıtımı ve ısı dağılımı,
- (iii) İyi optik performans ve değiştirilebilir, modifiye edilebilir olma,
- (iv) Basit üretim süreci ve düşük maliyet [80], [83], [84].

Tıp alanında hızlı, uygun maliyetli ve kullanıcı dostu teşhis araçlarının geliştirilmesine yönelik artan bir talep bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, bu çalışmada da tercih edilen tek kullanımlık, tıbbi sınıf bantlardan hazırlanmış mikroakışkan cihazlara dayanan yenilikçi bir glikoz sensörü gösterilmiştir. Mikroakışkan kanal, iki tıbbi sınıf bant kullanılarak üretilmiştir. İki çift taraflı yapışkan bant (3M 9965/9969) bir lazer kesici kullanılarak

desenlenmiştir. Mikroakışkan kanalların şekillerinin ve akış hızlarının kontrol edilebilmesi sayesinde bu cihazın kapsamlı teşhis alanlarına genişletilebileceği söylenmiştir. Bu makaleden elde edilen sonuçlar, tek kullanımlık sensör olarak tıbbi sınıf bantların kullanıldığı temel araştırmayı göstermiştir [85]. Başka bir çalışmada ise gömülü elektrotlara sahip mikroakışkan cihaz üretmek için düşük maliyetli ve hızlı (~dakika) bir üretim tekniği önerilmiştir. Mikroakışkan kanalların üretilmesinde, 3M 9965 basınca duyarlı çift taraflı banda (DSA) mikro ölçekli özellikleri doğrudan kesmek için xurografi kullanılmıştır. Bu tekniğin, yaygın olarak erişilebilen masaüstü makineleri ve düşük maliyetli malzemeler kullanarak elektronik sensörlü mikroakışkan cihazların ölçeklenebilir, ucuz üretimini mümkün kıldığı söylenmiştir [86]. Başka bir çalışmada ise 3M 9965'in hücresel toksisitesini belirlemek için ISO 10993-5'e göre bir elüsyon test yöntemi uygulanmıştır. Test materyallerinden ekstrakte edilebilir maddeler içeren bir hücre kültürü ortamı, hücreleri besleyen ortamın yerine tek katmanlı bir L929 hücrelerine (fare fibroblastları) uygulanmıştır. Hücreler 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak, test ortamındaki LDH (laktat dehidrojenaz, göreceli hücre canlılığının göstergesi) miktarı kontrol ortamındaki LDH miktarı ile karşılaştırılmıştır. Analizler hücre çoğalması üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir [87].

2.12. Mikroçip Üretim Teknikleri

Mikroakışkan teknolojileri alanındaki en önemli zorluklardan bir tanesi, karmaşık topolojilere sahip mikroçiplerin hızlı üretilmesidir. Mikroakışkan çiplerin üretim yöntemleri son 20 yılda büyük başarılar elde etse de neredeyse tüm geleneksel üretim yöntemleri karmaşık topolojilerin ve üç boyutlu mikro kanalların üretiminde hala büyük engellerle karşılaşmaktadır. Günümüzde, sayısal kontrol mikro işleme, lazer ablasyon, mürekkep püskürtmeli baskı, fotolitografi, kuru dağlama ve litografi, galvanoformung ve abformung (LIGA) teknolojisi gibi temel mikroakışkan çip üretim yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar arasında fotolitografi, çip işlemede en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemler karmaşık topolojik yapı ve 3B mikroakışkan çiplerin hızlı bir şekilde işlenmesi için uygulamada kısıtlamalara sahiptir ve ayrıca pahalı ekipmanlara, karmaşık üretim süreçlerine ve düşük verime sahiptirler [29], [88].

Mikroakışkan yapıların üretimi genellikle mikrofabrikasyon teknikleriyle (örneğin; fotolitografi, yumuşak litografi) yapılmaktadır. Diğer üretim teknikleri, mikroakışkan

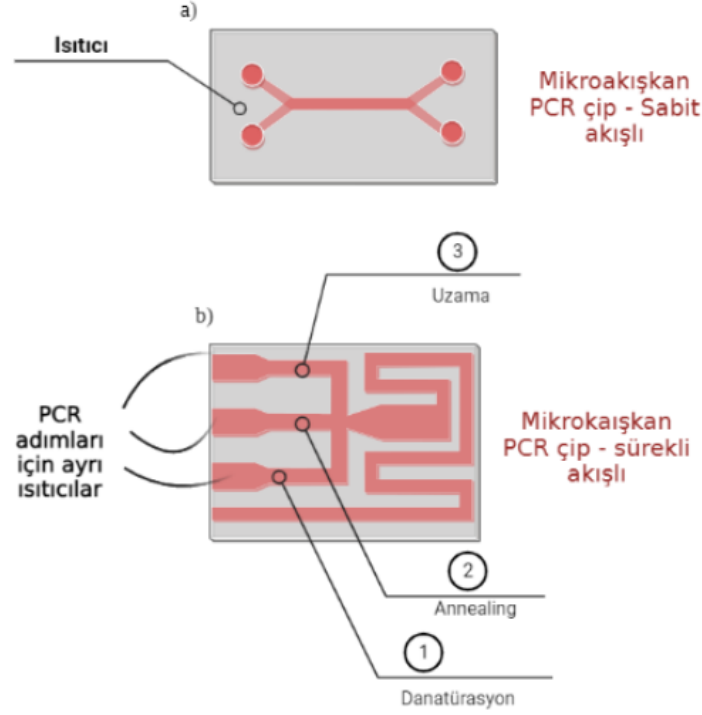
üretiminde giderek daha fazla kullanılmaya başlamıştır, ancak henüz litografinin hassasiyet ve çözünürlüğünü elde edememiştir. Ayrıca, sıcak kabartma (hot embossing), enjeksiyonlu kalıplama (injection molding), lazer ablasyonu (laser ablation) gibi geleneksel yöntemler ve üç boyutlu baskı gibi yeni teknolojiler PCR çipinin üretiminde uygulanmıştır. Benzer şekilde lazer yazıcı ile baskı üretim alternatifi olarak kullanılabilir. Bu üretim yöntemi hızlı ve düşük maliyetli olsa da basılan mikro kanalların çözünürlüğü ve kalitesi fotolitografik üretimli çiplere kıyasla daha düşük olmaktadır [28], [29], [88].

2.13. Mikro PCR Çip Çeşitleri

Çip temelli mikro PCR cihazları iki farklı çeşit olarak sınıflandırılmaktadır; kuyucuk/odacık temelli PCR çipleri ve sürekli akışlı PCR çipleri [3], [89].

Mikro odalı PCR çipleri, üç farklı şekilde olmak üzere (tek odacıklı, damlacık sanal odacıklı ve diziler halinde odacıklı PCR çipleri) geleneksel sıcaklık döngüleyicilerin minyatürleştirilmiş halidir. Odacık temelli PCR’da, PCR karışımı kuyucuğa enjekte edilmekte ve ardından amplifiye edilecek örnek de dahil tüm çip belirli termal döngü sıcaklıkları ile ısıtılmakta ve soğutulmaktadır. Kuyucuk temelli PCR cihazları, istenmeyen termal eylemsizlik yaratabilen, uzun termal döngü süresine neden olan, büyük toplam termal kütleyle sahip cihazlardır (Şekil 2.6.a) [3], [29], [89].

Çeşitli mikro ölçekli PCR türleri arasında, sürekli akışlı mikro PCR, farklı fonksiyonel birimlerle entegrasyon potansiyeli nedeniyle dikkat çekmiştir. Sürekli akışlı mikro PCR gerekli sıcaklık döngüsünü sağlamak için örneği sabit sıcaklık bölgelerinde sürekli olarak hareket ettirmektedir. Sürekli akışlı mikro PCR yaklaşımı daha küçük bir termal eylemsizliğe sahiptir, çünkü çipin tamamı yerine sadece PCR karışımının ısıtılması ve soğutulması gerçekleşmektedir. Bu durum, hızlı termal döngüye izin vermektedir ve aynı zamanda daha az enerji tüketimi ile sistemi taşınabilir uygulamalar ve μ -TAS’e entegrasyon için uygun hale getirmektedir. Ancak sürekli akışlı mikro PCR için PCR inhibisyonu büyük bir zorluk olmuştur, çünkü PCR bileşenleri büyük yüzey/hacim oranından dolayı yüksek yüzey adsorpsiyonuna sahiptir (Şekil 2.6.b) [3], [5], [89].



Şekil 2.6. a) Kuyucuk/Odacık temelli PCR Mikroçip Tasarımı, b) Sürekli – Akış PCR Mikroçip Tasarımı.

2.14. Mikro Sıcaklık Döngüleyici

Nükleik asit amplifikasyonu genellikle denatürasyon, bağlanma, uzatma basamakları için üç ayrı sıcaklık bölgesi gerektirmektedir. Bu nedenle, PCR'daki çok adımlı sıcaklık kontrolü cihazın minyatürleştirilmesi ve taşınabilirliği konusunda sınırlayıcı bir faktör olmaktadır. Uygun reaksiyon için minimum iki ısıtma cihazı gerekmektedir. Hedef ampikonların 300 bp'den az olduğu durumlarda bağlanma ve uzatma adımları aynı sıcaklıkta gerçekleştirilebilmektedir, bu durum gereken ısı kontrolü sayısını ikiye indirmektedir. Araştırmacılar, çip üzerinde PCR gerçekleştirirken, metal ısıtma blokları, ince film ısıtıcılar, kızılötesi cihazlar, halojen lamba, mikrodalga, platin dirençler ve indüksiyonla ısıtma gibi çeşitli ısı kaynakları kullanmışlardır [89].

Bazı araştırmacılar amplifikasyon için, sadece tek bir sıcaklık kontrolü kullanmayı gerektiren “izotermal amplifikasyon” denilen yeni bir mekanizmayı kullanmıştır. İzotermal PCR'da bir adet sıcaklık kontrolü reaksiyon için yeterli olsa da bu sistemlerin bazıları RNA veya primer kümelerinin kullanılmasını gerektirmekte, bu durum kullanımlarını özel durumlarla sınırlamaktadır [90], [91].

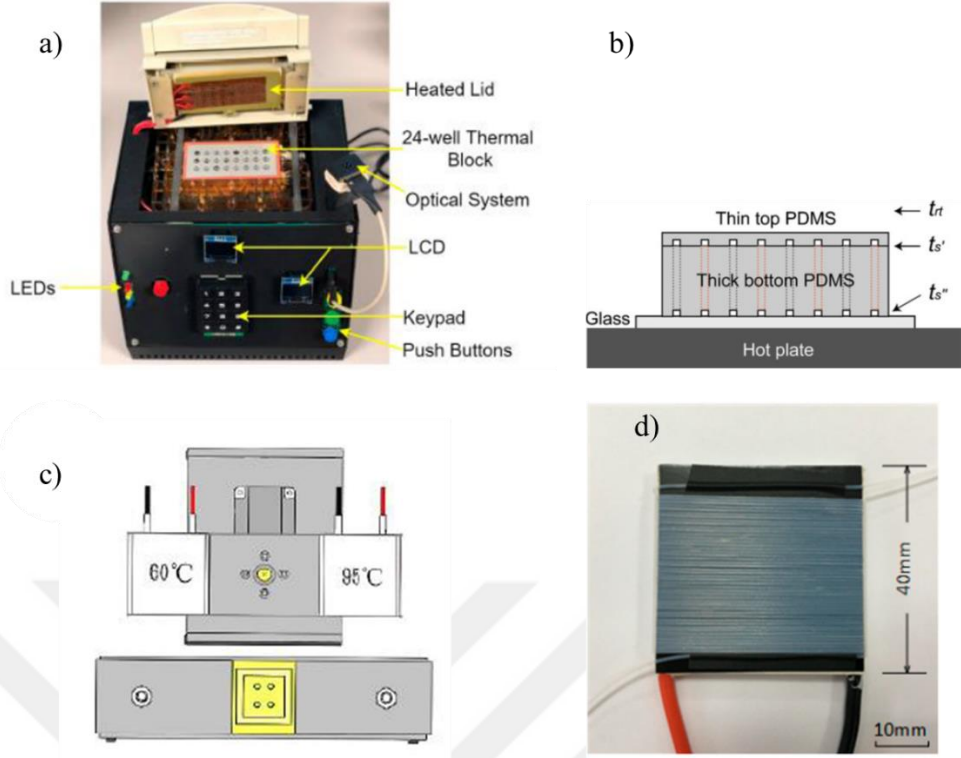
Odacık temelli sabit PCR çipleri için, temaslı ısıtma ve temassız ısıtma yöntemleriyle termal döngü gerçekleştirilebilmektedir. Temaslı ısıtma (entegre ısıtıcılar ile), çipin içinde veya çipin dışıyla termal temas halinde üretilmiş ısıtıcılar olduğu ve mikroçipin termal kütlelerinin ısıtma elemanı ile temas halinde olduğu durum olarak tanımlanmaktadır. Temassız ısıtma (harici ısıtıcılar ile), PCR odasıyla fiziksel olarak temas etmeyen bir ısıtma yöntemi kullanılmaktadır [92].

Temaslı ısıtma yöntemleri arasında, ince film ısıtma elemanları ve metal / diğer ısıtma blokları bulunmaktadır. İnce film ısıtma elemanları, ince film biriktirme teknikleri kullanılarak, film ısıtma elemanlarını oluşturmak için temel olarak mikro üretim ile gerçekleştirilmektedir. Entegre ısıtıcılar, bir mikrometreden birkaç milimetreye kadar değişen, bir PCR mikroçipinin arka tarafında fiziksel buhar biriktirme, püskürtme ve lazer biriktirme teknikleriyle doğrudan üretilmektedir. Bazı durumlarda, ince filmler doğrudan PCR mikroçipine temas eden substrat (örneğin cam veya silikon) üzerinde üretilmektedir. Yüksek termal iletkenlik nedeniyle, platin, altın, alüminyum, tungsten, indiyum ve kalay oksit ısıtıcılar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroçipin ince filtre ısıtıcı ile entegrasyonu, PCR reaktif karışımına verimli ısı transferi sağlamaktadır. Metal ısıtma blokları ise kartuş ısıtıcının metal bloklara yerleştirilmesi veya Peltier elemanlarının kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Harici ısıtıcılar statik odacıklı mikro PCR için kullanıldığında, çip termal döngüsü için doğrudan düz metal plaka (peltiere ekli) ile sıcaklık döngüleyiciye yerleştirilmektedir. Harici bir ısıtıcı veya düşük ısıtma hızına sahip ticari bir sıcaklık döngüleyici kullanarak mikro PCR gerçekleştiriminin avantajı, çipin minyatürleştirilmesi nedeniyle reaksiyon hacminde azalma gerçekleşmesidir [5], [53].

Statik odacıklı mikro PCR sisteminde, ısıtma kaynağı ile PCR reaksiyon kabı arasında etkili bir temas, yüksek verimli tekrarlanabilir PCR ile sonuçlanan verimli ısı transferine yol açmaktadır. Isıtma blokları ile ilişkili ısı transfer problemleri temassız ısıtma yaklaşımı uygulanarak giderilebilmektedir. Daha hızlı ısıtma / soğutma ve hızlı DNA amplifikasyonu için temassız ısıtma seçenekleri uygulanmaktadır. Temassız ısıtmanın bazı örnekleri arasında PCR reaktif karışımını sıcak hava, kızılötesi (IR) ışığı, lazer, indüksiyon, mikrodalga ile ısıtma bulunmaktadır. Sıcak hava ve IR bazlı ısıtma, diğer temassız ısıtma seçeneklerinden daha çok mikro PCR sistemlerine uygulanmıştır [53].

Sürekli akışlı PCR sistemlerinde termal döngü sürecini yürütmek için mevcut birkaç yöntem bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılmakta olanlar termoelektrik soğutucu (TEC),

ısıtma bloğu ve termostatik ısıtıcıdır. Sürekli akışlı PCR sistemlerinin amplifikasyon işlemi sırasında termal döngüyü kontrol etmek için açık döngü kontrollü tek termostatik TEC adı verilen yeni bir yaklaşım da tanıtılmıştır. Mikroakışkan çipin farklı sıcaklıklara sahip ısıtma blokları üzerine yerleştirilmesiyle mikro cihaz PCR reaksiyonunu gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.7. a). Bu sistem, her bir ısıtma bloğunu bağımsız olarak kontrol etmek için birkaç kapalı döngü entegre devreden (IC) oluştuğundan, devre kontrolü karmaşık hale gelmektedir. Buna ek olarak, birkaç ısıtma bloğunun kullanılması ekipmanın minyatürleştirilmesini daha zor hale getirmektedir. Diğer bir yöntem ise TEC-H köprü kontrolörünü kullanmaktır. TEC, PCR reaksiyonu için uygun denatürasyon aşaması ve bağlanma aşaması sıcaklıklarını elde etmek için bir devre tarafından kontrol edilmektedir. Ancak, TEC devre kontrolüne ve bir soğutma fanına ihtiyaç duyduğundan, tüm cihaz minyatürleştirilememektedir (Şekil 2.7. c). Başka bir yöntem termal döngü elde etmek için tek bir termostatik ısıtıcı kullanmaktır (Şekil 2.7. b). Uygun sıcaklığı elde etmek için kapalı döngü IC gerektirir, bu da denatürasyon ve bağlanma sıcaklığı arasındaki sıcaklık değişiminin daha yavaş olduğu ve devre kontrolünün önceki iki yöntemden daha karmaşık olduğu anlamına gelmektedir. Yapılan bir çalışmada önerilen yöntemde, PCR reaksiyonunun termal döngüsünü sağlamak için tek bir TEC kullanılmış, sürekli akışlı PCR elde etmek için yalnızca Teflon tüple sarılmış bir TEC çipi tasarlanmıştır (Şekil 2.7.d). Deneyde, uygun devre kontrolü altında TEC'nin denatürasyon ve bağlanma sıcaklığı gereksinimlerini aynı anda karşılayabildiği bulunmuştur. Yüksek sıcaklık bölgesi 95°C'ye ulaştığında, düşük sıcaklık bölgesi 63 °C'ye ulaşmıştır. Bu sistemin karmaşık devre kontrolüne gerek kalmadan uygun voltajı korumak için yalnızca bir açık döngü entegre devreyi (IC) gerektirdiği söylenmiştir [93], [94].



Şekil 2.7. Dört ısıtma yönteminin karşılaştırılması. a) Gerekli sıcaklığa ulaşmak için ısıtma blokları kullanarak; b) termal döngü sağlamak için tek bir termostatik ısıtıcı kullanarak; c) termoelektrik soğutucunun (TEC) gerekli sıcaklığa ulaşmasını sağlamak için devre kontrolü ile; d) bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) reaksiyonunun termal döngüsünü sağlamak için tek bir TEC kullanarak [94]–[97].

2.15. Mikro Isıtıcılar ve Uygulamaları

Isıtma araştırma, mühendislik, madencilik ve uzayda gerekli bir parametredir ve elektrik, indüksiyon, kızılötesi veya mikrodalga radyasyon kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Hızlı anahtarlama gerektiren veya sürekli uygulamalar için plakalar veya Peltier elemanları kullanılmaktadır. Ancak, hacimleri nedeniyle, taşınabilir uygulamalar veya uzak konumlardaki işlemler için etkisiz olmaktadır. Isıtıcıların minyatürleştirilmesi, güç tüketimini ve hacmini azaltırken, termal tepki süresini artırmakta ve çeşitli sensörler veya mikroakışkan çiplerle entegre olmayı sağlamaktadır. Ayrıca sensörler, MEMS, giyilebilir elektronikler ve POC DNA amplifikasyon cihazları, minyatür bir ısıtıcının gerekliliğini arttırmaktadır [79], [98], [99].

Mikro ısıtıcılar genellikle ~100 nm ila ~100 µm kalınlığa sahiptir ve hassas kontrol ile 1900°C'ye kadar sıcaklık sunabilmektedir. Mikro ısıtıcının sıcaklığı, malzeme özellikleri ve geometrik tasarımlarının yanı sıra elektriksel, mekanik ve termal dahil olmak üzere birçok fiziksel özelliğe bağlıdır. Mikro ısıtıcıların mikro cihazlara entegrasyonu, gaz sensörleri,

aktüatörler, biyomedikal test cihazları, elektron mikroskopları ve güçlendirici fiber ısıtıcılar gibi çeşitli uygulamalara sahiptir. Diğer potansiyel kullanımlar arasında yakıt hücresi ısı kaynakları, elektronik ve substrat ısıtma, RF uygulamaları, küçük hacimli gaz ısıtma için mikro tüplü ısıtıcılar, yüksek güçlü mikro fırın, fiber optik, mikropalak ısıtıcılar, malzeme testi ve karakterizasyonu, termal özellik ölçümleri, SEM/TEM/AFM, gaz/buhar ısıtıcıları/dönüştürücüler ve ince film hazırlama bulunmaktadır [79], [99].

İlk zamanlarda, metal bloklar bir ısıtma elemanı olarak yaygın kullanıma sahip olmuştur. Ancak, büyük hacimli metal katman cihazları pahalı ve hantal hale getirmiştir. Isıtıcı elemanların bu eksiklikleri mikro ve nanoteknolojinin ortaya çıkmasıyla giderilmeye başlanmıştır. Günümüzde mikro ısıtıcı ısıtma malzemeleri metalikten metal-seramik kırılğan malzemelere dönüşmüştür. Isıtıcı malzemesinin imal edilmesi kolay olmalı ve üretilen ısıyı yönetmek için yeterli genişlik ve kalınlığa sahip olmalıdır. İdeal mikro ısıtıcı özellikleri;

- Elektriksel
- Düşük temas yüzeyi direnci
- Düşük güç tüketimi
- Düşük elektrik iletkenliği
- Yüksek ısıtıcı direnci
- Fiziksel
- Yüksek sıcaklığa dayanıklı
- Az reaktif
- Korozyon direnci
- Uzun ömür ve tekrar kullanılabilirlik
- Zorlu ortamlarda çalışabilme
- Yüzeye iyi yapışma
- Ucuz
- Termal
- Düşük sıcaklık direnci katsayısı
- Düşük termal kütle
- Isıtma sırasında az hacim değışikliğı
- İyi özgül ısı kapasitesi
- Yüksek termal iletkenlik

- Yüksek tepki süresi
- Yüksek ısı izolasyonu olarak sıralanmıştır [79].

Mikro ısıtıcılar Platin (Pt), Altın (Au), Gümüş (Ag), Nikrom (NiCr), Nikel (Ni), Tungsten (W), Titanyum (Ti), Alüminyum (Al), Bakır (Cu), grafenden ve karbon nanotüplerden (CNT) yapılmıştır. Tüm bu katı madde ısıtıcıların dışında sıvı metal temelli mikro ısıtıcılar da bulunmaktadır. Sıvı metal temelli mikro ısıtıcı, sıcaklık 100°C'yi aştığında boşlukların oluşması nedeniyle kırılmaktadır. Mikro ısıtıcı tasarımları ise, homojen termal dağılım sağlamak için basit tel veya çizgi modellerinden karmaşık kanat şekilli modellere kadar uygulamaya bağlı olarak değişebilmektedir [79], [99].

Genel olarak, ısıtma sistemleri iki kategoriye ayrılmaktadır: harici ve dahili ısıtma sistemi. Dahili ısıtma sistemleri, sıvıların sıcaklığını kontrol etmek için mikro kanal veya odacık içinde ısıtma elemanları içermektedir. Harici bir ısıtma sisteminde ise, çalışma sıvıları, ayrı ısıtma elemanları ile bir mikro kanalda ısıtılmaktadır. Isı transfer yöntemlerine bağlı olarak, harici ısıtma yöntemleri temaslı ve temassız ısıtma teknikleri olarak ayrıca ikiye ayrılmaktadır. Temaslı ısıtma, ısıyı iletim yoluyla akışkanlara aktarmak için kanalın yüzeyine entegre veya yapıştırılmış ısıtma elemanlarını içermektedir. Temassız ısıtma ise, ısıнын malzemelere ultrasonik veya radyasyon yoluyla aktarılmasına izin vermektedir. Böylece kablosuz ısıtmanın kullanılmasını sağlamaktadır [79], [98].

2.16. Sıcaklık Döngüleyicide Soğutma

Denatürasyon ve bağlanma adımı arasında, PCR karışımının sıcaklığının, hangi PCR tekniğinin kullanıldığına bağlı olarak 30 – 40 °C düşmesi gerekmektedir. Bu sıcaklık düşüşü aktif veya pasif olarak gerçekleştirilmektedir. Pasif soğutma, yüksek yüzey/hacim oranına sahip bir çip tasarımı kullanılarak yapılmaktadır. Bu şekilde ısı, oldukça etkili bir şekilde çevreye konveksiyon yoluyla dağıtılmaktadır. Bu dağıtımı iyileştirmek için, ısıyı mikro kanaldan çevreye dağıtmak için bir bakır blok kullanılabilir. Küçük reaksiyon hacimleri kullandığında, bu soğutma yöntemi hızlı döngü elde etmek için yeterli olmaktadır. Soğutma hızlarını arttırmak için aktif soğutma kullanılmaktadır. Aktif soğutma yaygın olarak kullanılmamaktadır. Çoğu aktif soğutma sistemi çipin boyutunu artırmakta, cihaz daha fazla güç tüketmekte ve bu da tasarımı karmaşıklaştırmaktadır. Soğutma hızlarını arttırmak için çeşitli seçenekler vardır. Isı dağılımını aktif olarak artırmak için çipin üzerine basınçlı hava veya nitrojen gazı üflenmektedir. Bunun yanında termoelektrik elemanlar,

Peltier Etkisine dayalı olarak cihazın iki tarafı arasında bir ısı farkı oluşturmaktadır. Polarite değiştirilerek elemanlar hem soğutma hem de ısıtma için kullanılabilir. Peltier elemanlar, mekanik olarak hareket eden parçaların bulunmaması ve yüksek güç tüketimine rağmen yüksek soğutma kapasiteleri üretebilmeleri nedeniyle kompakt ve sağlam bir yapı avantajına sahiptir [52] (Tablo 2.5.).

Tablo 2.5. PCR çipleri için kullanılan soğutma tekniklerine genel bakış.

Soğutma Yöntemi	Soğutma Kapasitesi	Fabrikasyon Kolaylığı	Güç Tüketimi
Basıncılı Hava	Orta	Kolay	Orta
Termoelektrik Elemanlar	İyi	Kolay	Çok
Pasif Soğutma	Düşük	Kolay	Yok

2.17. Mikrokanalda Akışkan Akışı ve Isı Transferi

2.17.1. Akışkan akışı

Akışkanlar sürekli ortamlardır, bu nedenle, kütle veya kuvvet gibi ayrık nicelikler yerine özelliklerini tanımlarken birim hacim başına kuvvet yoğunluğu gibi sürekli nicelikler kullanılmaktadır. Sonsuz küçüklükte bir akışkan elemanı, akışkanın kendisinden kaynaklanan bir gerilim alanı/birim alandaki kuvvet (σ) ve aynı akışkan elemana etki eden dış kuvvetlerden etkilenmektedir. Bu kuvvetlerin Newtonian bir akışkan için uyguladığı hız alanı, Newton yasasının ($F = m.a$) sürekli karşılığı olan Navier-Stokes diferansiyel denklemi ile belirlenmektedir (2.1) [100], [101]:

$$\rho \left(\frac{dV}{dt} + V \cdot \nabla V \right) = \nabla \sigma + f = -\nabla p + \mu \nabla^2 V + f \quad (2.1)$$

(2.1): p-basınç, μ -sistem özelliklerine bağlı olan viskoz sürtünmenin yoğunluğu/viskozite.

Kütle korunumu, sürekli durumda da geçerlidir (2.2):

$$\frac{d\rho}{dt} + \nabla \cdot (\rho V) = 0 \quad (2.2)$$

Su gibi sabit yoğunluğa sahip yavaş akan akışkanlar için sıkıştırılmazlık koşulu $V \cdot \nabla V = 0$ sağlanmaktadır. Mikroakışkanlarda olduğu gibi eylemsizlik kuvvetleri viskoz kuvvetlerle karşılaştırıldığında küçük olduğundan, Navier-Stokes denklemindeki doğrusal olmayan terim ihmal edilmekte ve böylece aşağıdaki denklem elde edilmektedir (2.3):

$$\rho \left(\frac{dV}{dt} \right) = \nabla \sigma + f = -\nabla p + \mu \nabla^2 V + f \quad (2.3)$$

Reynold sayısı, basınçlı akışlarda boyutsuz parametreler arasında en önemlisidir. Eylemsizliğin viskoz kuvvet yoğunluklarına oranı olarak tanımlanmakta, laminar veya türbülanslı akış düzeninin belirlenmesini sağlamaktadır. Viskoz kuvvetler aşağıdaki gibi ifade edilmektedir (2.4):

$$f_v = \frac{\mu V_0}{L_0^2} \quad (2.4)$$

(2.4): V_0 -akışkan hızı, L_0 -mikrokanalın uzunluk ölçeği.

Eylemsizlik kuvvetleri ise akışkan hareket durumunun değişmesinden kaynaklanmaktadır ve aşağıdaki gibi ifade edilmektedir (2.5):

$$f_i = \frac{\rho V_0 L_0}{\mu} \quad (2.5)$$

Sonuçta Reynolds sayısı elde edilmektedir (2.6):

$$Re = \frac{f_i}{f_v} = \frac{\rho V_0 L_0}{\mu} \quad (2.6)$$

Akış düzeni Reynolds sayısının (Re) değerine göre üç durumda olabilmektedir. $Re < 2000$ için akış laminar, $Re > 3000$ için akış türbülanslı ve $Re \sim 2000 - 3000$ olduğunda ise akış ara bir düzende olmaktadır. Mikroakışkanlarda Reynolds sayısının tipik değerleri $\sim 10 - 2, 10 - 3$ aralığında olmaktadır. Bu durumda eylemsizlik kuvvetleri, viskozite yanında önemsiz ve ihmal edilebilir olmaktadır [100], [101].

2.17.2. Isı transferi

Isı transferi, fiziksel sistemler arasındaki ısı transfer oranı ile ilgilenmektedir. Isı transferi her zaman yüksek sıcaklık ortamından düşük sıcaklık ortamına doğru gerçekleşmektedir. Bu nedenle, ısı transferinin gerçekleşmesi için bir sıcaklık farkı

gerekmektedir. Isı transfer hızı ayrıca ısıнын aktarıldığı araya giren ortamın özelliklerine de bağlı olmaktadır. Isı transferi süreçleri üç tipte sınıflandırılmaktadır: iletim (kondüksiyon), taşınım (konveksiyon) ve ışıınım (radyasyon) [102].

İletim ile ısı transferi, ısıнын maddenin yığın hareketi olmaksızın madde üzerinden aktarılmasıdır. Başka bir deyişle, iletim, parçacıklar arasındaki etkileşim nedeniyle enerjinin bir maddenin daha enerjik parçacıklarından daha az enerjili parçacıklarına aktarılmasıdır. İletim ile ısı transferinin temel denklemi *Fourier* yasasıdır (2.7) [102], [103]:

$$Q_{cond} = -ktA \left(\frac{dT}{dx} \right) \quad (2.7)$$

(2.7): Q_{cond} -iletim ile ısı transfer hızı, kt -malzemenin ısıl iletkenliği, A -ısı transfer yönüne dik enine kesit alanıdır, dT / dx - ısı transferi yönündeki sıcaklık gradyanıdır.

Taşınım ile ısı transferi, hareketli akışkandan kaynaklanmaktadır. Akışkan, bir gaz veya bir sıvı olabilmektedir. Konveksiyonla ısı transferinde ısı, homojen olmayan sıcaklıkta bir sıvının hacimce transferi yoluyla hareket ettirilmektedir. Yani taşınım ile ısı transferi, bir nesne çevreleyen sıvıdan daha sıcak veya daha soğuk olduğunda meydana gelmektedir. Konveksiyonla ısı transferinin temel denklemi *Newton*'un soğutma yasasıdır (2.8) [102], [103]:

$$Q_{conv} = hA(T_{\infty} - T_s) \quad (2.8)$$

(2.8): Q_{conv} -taşınım ile ısı transfer hızı, h -konvektif ısı transfer katsayısı, A -soğutulan veya ısıtılan nesnenin yüzey alanı, T_{∞} - çevredeki sıvının yığın sıcaklığı, T_s - nesnenin yüzey sıcaklığıdır.

Radyasyon ile ısı transferi, maddenin foton veya elektromanyetik dalgalar şeklinde yaydığı enerji olarak tanımlanmaktadır. Radyasyonla ısı transferi vakum ortamında en yüksek olmaktadır. Kızılötesi, ultraviyole, görünür ışık, radyo ve televizyon dalgaları, X ışınları vb. radyasyonla ısı transferinin tüm biçimleridir. Radyasyon ile ısı transferi, *Stefan-Boltzmann* yasası ile verilmektedir (2.9) [102]:

$$Q_{rad} = F_{1-2\epsilon_1} A_1 \sigma (T_2^4 - T_1^4) \quad (2.9)$$

(2.9): Q_{rad} -radyasyon ile ısı transfer hızı, F_{1-2} -nesne 1 ve 2 arasındaki görüş faktörü, ϵ_1 boyutsuz yayma oranı veya soğurabilirlik (daha soğuk olan nesnenin enerjii emerken daha sıcak nesnenin enerji yaydığı söylenmektedir.), A_1 -nesne 1'in yüzey alanı, σ -Stefan Boltzmann sabiti ($5,69 \times 10^{-8} \text{ W/m}^2 \cdot \text{K}^4$ veya $0,1714 \times 10^{-8} \text{ Btu / h.ft}^2 \cdot \text{R}^4$), T_1 ve T_2 nesnelerin yüzey sıcaklıklarıdır.

2.18. Sayısal Simülasyon

Son yıllarda mikro ölçekli uygulamalar birçok araştırma alanında daha iyi performans, doğru ölçüm ve daha küçük ürün boyutları nedeniyle daha fazla ilgi kazanmıştır. Mikroakışkanlar ve ısı transferi alanında, araştırmacılar, maksimum verimlilik elde etmek için yeni geometrilili mikro kanallar, mikro soğutucu elemanlar vs. geliştirmişlerdir. Bu mikrokanalların karmaşıklığı arttıkça, üretim maliyetleri de artmış ve bazen bu tür yapılarla deney yapmak olanaksız hale gelmiştir. Bu noktada sayısal simülasyon programları, kullanım kolaylığı, kapasite ve fiyat olarak fayda sağlamıştır. Mikrokanalda ısı transferi ve mikroakışkan araştırmalarında simülasyon programlarının kullanımı, bu tür programların geliştirilmesi ve artan kullanılabilirliğine paralel olarak büyük ölçüde artmıştır [100].

Piyasada yaygın olarak kullanılan birkaç ticari hesaplamalı akışkanlar dinamiği (CFD) programı bulunmaktadır. Bu programlar arasında, COMSOL sonlu eleman yöntemini (FEM) kullanırken ANSYS-CFX ve OpenFOAM sonlu hacim yöntemini (FVM) kullanmaktadır. COMSOL Multiphysics, kullanıcının akışkan akışı ve ısı transferi dahil olmak üzere çeşitli fizik arayüzleri ile bağlantı kurup çalışabileceği güçlü ve kullanımı kolay bir simülasyon programıdır. COMSOL Multiphysics'te uygulamaya özel birkaç modül vardır. En yaygın uygulamalar; AC / DC Modülü, Akustik Modülü, CAD import modülü, Kimya Mühendisliği Modülü, Yer Bilimleri Modülü, Isı Transfer Modülü ve Malzeme Kitaplığıdır.

2017 yılına ait bir çalışmada yeniden kullanılabilir bir elektrot parçası ve tek kullanımlık PDMS-cam odasından oluşan düşük maliyetli PCR çipi gösterilmiştir. Oda 300 μm yüksekliğinde ve hacmi $\sim 6 \mu\text{l}$ 'dir. Tüm PCR odası üzerindeki sıcaklığın homojenliğini göstermek için elektrot parçasının ısıtıcısı COMSOL Multiphysics kullanılarak simüle edilmiştir. Simülasyonda akım kabuğu (current shell) ve katılarda ısı transferi modülleri kullanılmıştır. Ayrıca reaksiyon reaktifi olarak simülasyonda su tercih edilmiştir. Simülasyon sonucunda yüksek sıcaklık bölgelerinin oda etrafına dağıldığı ve bu durumun oda içerisindeki sıcaklık dağılımının daha homojen olmasını sağladığı görülmüştür. Fuzzy – PID algoritması kullanılarak sıcaklık döngüsü için gereken denatürasyon, bağlanma ve uzatma sıcaklıkları sağlanmıştır. Sıcaklık kontrol sistemi ise temel olarak yedi bölümden oluşmaktadır; PCR çipi, MCU denetleyici, sıcaklık algılama devresi, ısıtma devresi, soğutma fanı, harici güç kaynağı ve PC tabanlı kullanıcı arayüzü. Sıcaklık dağılımını test etmek için kızılötesi görüntüleyici de kullanılmıştır. Sıcaklık simülasyonu ve kızılötesi görüntüleme

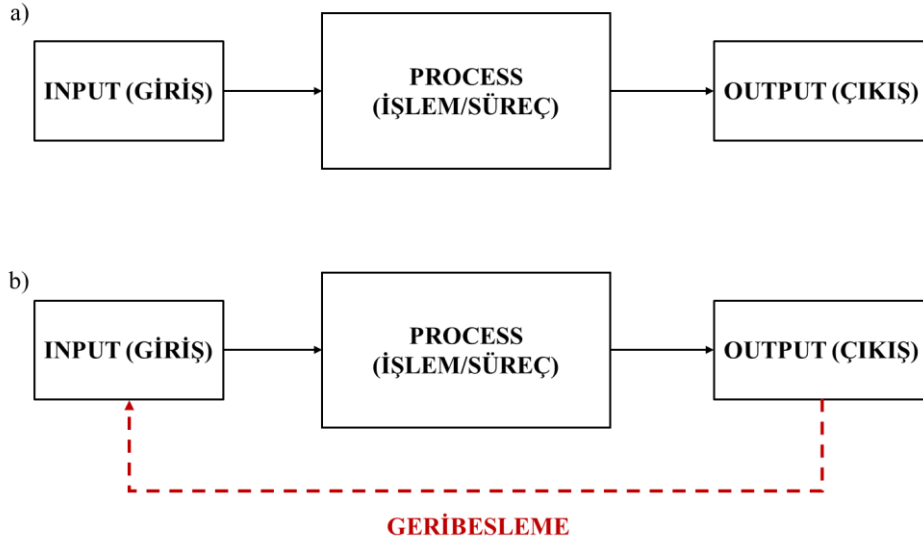
testi, ısıtıcıdaki sıcaklık dalgalanmalarının 1°C sınırında olduğunu ve oda içerisinde homojen sıcaklık dağılımı sağlayabildiğini doğrulamıştır. Ayrıca PCR çipinin performansı, β -aktin geninin 239 bp DNA hedefinin başarılı amplifikasyonu ile doğrulanmıştır [104].

2018 yılına ait bir çalışmada, PCR kullanılarak gerçekleştirilen DNA'nın amplifikasyonu için biyoçipe entegre, optimize edilmiş bir alüminyum mikro ısıtıcının tasarımı gösterilmiştir. Mikro ısıtıcı ve PCR reaktörünün tasarımına yardımcı olmak için 3B sonlu elemanlar yöntemi ile elektro-termal simülasyonu birleştirilerek kullanılmıştır. Mikro ısıtıcı, PCR odası boyunca tekdüze bir sıcaklık sağlamak için tasarlanmış özel bir şekle sahip olarak tasarlanmıştır. Mikro reaktör, 20 mm × 20 mm silikon çipin merkezinde konumlandırılmıştır. Isıtıcı tasarım optimizasyonundan sonra, PCR odası içindeki sıvı hacmi simüle edilmiş ve sıcaklığın çok benzer olduğu görülmüştür. Bu sonuç, DNA T_m deneyleriyle doğrulanmıştır. Sistemin işlevselliğini göstermek için 50 döngülük amplifikasyondan oluşan bir PCR deneyi gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon yöntemi şimdilik ısıtıcının deneme yanılma yöntemi ile elde edilmiş tasarımına dayanmıştır, otomatik bir algoritmanın geliştirilmesi için çalışmaların devam ettiği söylenmiştir [99].

2.19. Kontrol Sistemleri

Kontrol, sensörleri, aktüatörleri, iletişimi, bilgi işlemi, mimarileri ve arayüzleri, algoritmaları içeren multidisipliner bir konudur. Kontrol sistemleri, belirtilmiş bir girdi göz önüne alındığında, istenen performansa sahip çıktıyı elde etmek amacıyla toplanan alt sistemler ve proseslerden oluşmaktadır. Şekil 2.8.a ve Şekil 2.8.b, bir girişin istenen bir çıktıyı temsil ettiği kontrol sistemlerini en basit haliyle göstermektedir [105], [106].

Kontrol sistemlerinin amacı, kontrol sisteminin elemanları aracılığıyla girişleri kullanarak, çıkışları önceden belirlenmiş şekilde kontrol etmektir. Kontrol sistemlerinin tercih edilmesinin nedenleri güç amplifikasyonu, uzaktan kontrol/kumanda, bozulmaların telafi edilmesi/dengelemesi olarak sıralanmaktadır [105].



Şekil 2.8. a) Açık Döngü Kontrol Sistemi Blok Şeması, b) Kapalı Döngü Kontrol Sistemi Blok Şeması.

Sistemde mevcut olan geri besleme yoluna bağlı olarak kontrol sistemleri ikiye ayrılmaktadır. Bunlar açık döngü ve kapalı döngü kontrol sistemleri olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.8.a, Şekil 2.8.b). Açık döngü kontrol sistemi, çıkış sinyalinin sistemin girişine geri beslenmediği sistemdir. Bu nedenle açık döngü kontrol sistemine geri beslemesiz kontrol sistemi de denmektedir. Açık döngü kontrol sistemlerinde, çıkışın sistemin kontrol eylemi üzerinde kontrolü bulunmamaktadır. Açık döngü kontrol sisteminin en büyük dezavantajı, istenen görevi tamamlama yeteneğini azaltabilecek aksaklıkların üstesinden gelmek için yetersiz donanıma sahip olmasıdır. Açık döngü kontrol sistemlerinde çıkış değişkenleri giriş değişkenlerini etkilemez, öngörülemeyen bir etki meydana gelmezse sistem istenen referans komutlarını takip edecektir ve sistemin kararlılığını değiştirecek bir etkisi bulunmamaktadır. Kapalı döngü kontrol sistemi, çıkış sinyalinin sistemin girişine geri beslendiği sistemdir. Bu nedenle kapalı döngü kontrol sisteminde kontrol eylemi, istenen çıkış sinyalinin bir fonksiyonudur. Kapalı döngü kontrol sisteminde sistemin girişi, sistemden istenen yanıtı üretecek şekilde otomatik olarak ayarlanmaktadır. Kapalı döngü kontrol sistemlerinde çıkış değişkenleri, istenen sistem davranışını sürdürmek için giriş değişkenlerini etkilemektedir. Bu kontrol sistemi kontrol edilen değişken ile referans komut arasındaki fark olarak hesaplanan kontrol hatalarına ihtiyaç duymaktadır [106].

2.20. Oransal İntegral Türev Kontrolörü

Oransal integral türev (PID) Kontrolörü, endüstriyel kontrol sistemlerinde yaygın olarak kullanılan genel bir kontrol döngüsü geri besleme mekanizmasıdır. PID kontrolörü, ölçülen sistem değişkeni ile sabit bir ayar noktası arasındaki fark olan “hata” değerini hesaplamaktadır. Sistem kontrol girişlerini ayarlayarak hatayı en aza indirmek amacıyla kontrolör kullanılmaktadır [107]. PID kontrolör ailesine ait dört tip kontrolör bulunmaktadır: oransal (P) kontrolör, oransal artı integral (PI) kontrolör, oransal artı türev (PD) kontrolör ve oransal artı integral artı türev (PID) kontrolör [108], [109].

Temel PID kontrolörü matematiksel olarak yazılabilir, bir kontrol sinyali üç matematiksel işlemin toplamıdır:

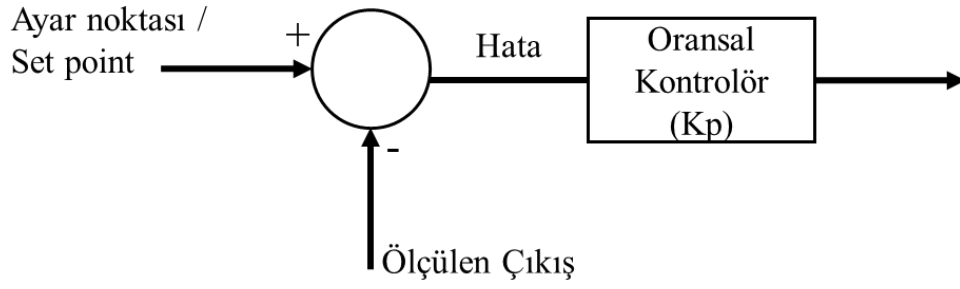
$$u(t) = K_p \cdot e(t) + K_i \int_0^t e(\tau) d\tau + K_d \cdot \frac{de}{dt} \quad (2.10)$$

(2.10): u: Kontrol sinyali, K_p: oransal kazanç, K_i: integral kazanç, K_d: türev kazanç (K_p, K_i, K_d ayarlama(tuning) parametreleridir.), e: hata, t: zaman ya da anlık zaman.

Her terimin önünde bir sabit bulunmaktadır. Bunlar ayarlama (tuning) sabitleri olarak bilinmektedir. Uygun şekilde seçildiklerinde kontrolörün hatayı sıfıra indirecek bir kontrol sinyali vermesini sağlamaktadırlar. K_p, K_i ve K_d'nin düzgün ayarlanmaması aşma (overshoot), uzun işlem süresi, kararsızlık ve salınımlara neden olabilmektedir.

2.20.1. Oransal kontrolör

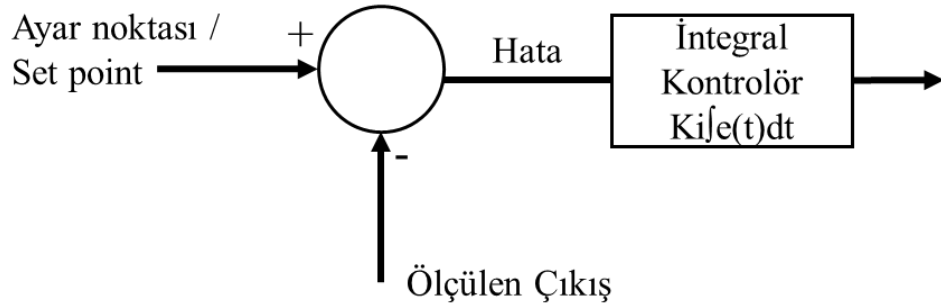
Oransal kontrolör, çıkışta geçerli hata değeri ile orantılı bir değişiklik yapmaktadır. En basit kontrolör oransal kontrolördür. Oransal terimle, geri besleme kontrol sinyali u(t), geri besleme hatası e(t) ile orantılı olarak hesaplanmaktadır. Oransal yanıt, hatayı oransal kazanç adı verilen sabit “K_p” değeri ile çarparak ayarlanabilmektedir (Şekil 2.9.)[110]. P Kontrolün avantajı uygulamasının kolay olması ve işlemi istenen ayar noktasına yakın bir yere götürebilmesidir. Basitliğinden dolayı oransal kontrolör genellikle sistem hakkında çok az bilginin mevcut olduğu ve kararlı durum çalışmasında gerekli kontrol performansının zor olmadığı durumlarda kullanılmaktadır. Kontrolörün belirlenmesi gereken tek bir parametre olduğundan, sistem hakkında detaylı bilgi olmadan K_p seçimi yapmak mümkündür. Ancak, hata asla otomatik olarak sıfıra gitmemekte, bu nedenle işlem asla ayar noktasına ulaşmamaktadır. Ayrıca ofseti ve kararlı durum hatasını da otomatik olarak ortadan kaldıramamaktadır [108], [111].



Şekil 2.9. Oransal Kontrolör (P Kontrolör) Blok Diyagramı.

2.20.2. İntegral kontrolörü

İntegral kontrolörün etkisi hem hatanın büyüklüğü hem de hatanın süresi ile orantılıdır. Zaman içinde anlık hatanın toplanması (hatanın integrali), daha önce düzeltilmesi gereken birikmiş ofseti vermektedir. Biriken hata daha sonra integral kazancı ile çarpılmakta ve kontrolör çıkışına eklenmektedir. İntegral teriminin toplam kontrol eylemine katkısının büyüklüğü, integral kazancı “ K_i ” tarafından belirlenmektedir (Şekil 2.10.). İntegral kontrolörünün ana avantajı, kararlı durum hatasını tamamen ortadan kaldırmaya izin vermesidir. K_i terimini ayarlayarak, integral kontrolörün kontrol başarısı ayarlanabilmektedir [110], [111].

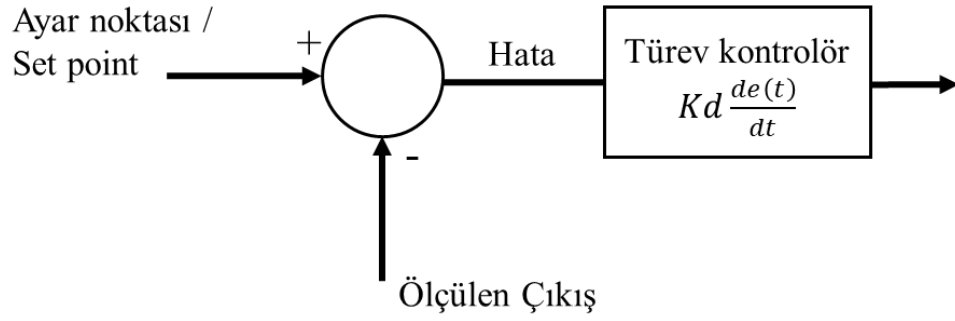


Şekil 2.10. İntegral Kontrolör (I Kontrolör) Blok Diyagramı.

2.20.3. Türev kontrolörü

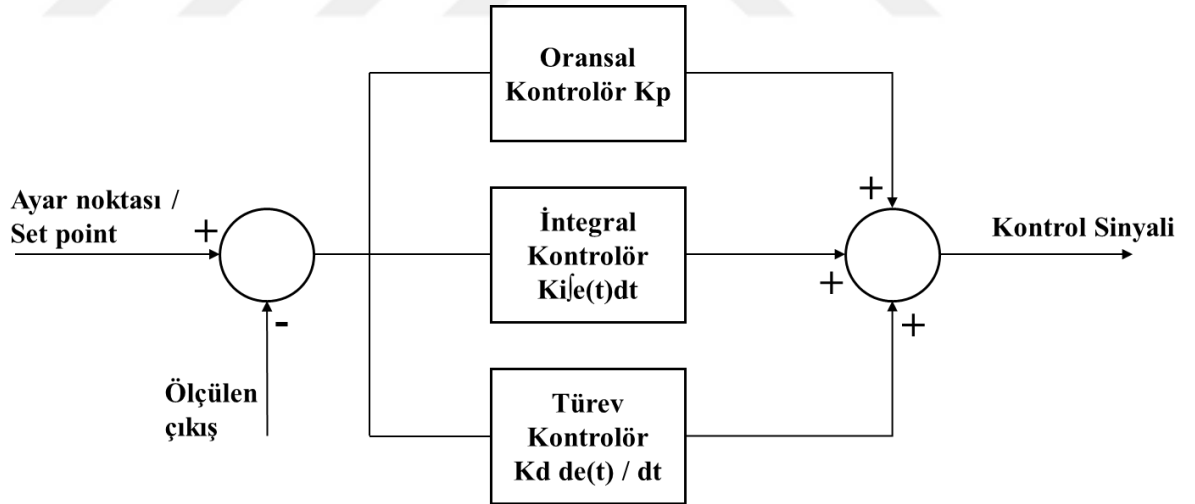
İntegral kontrolörünün hatanın gelecekteki davranışını tahmin etme yeteneği bulunmadığı için ayar noktası değiştiğinde normal tepki vermektedir. Türev kontrolör ise hatanın gelecekteki davranışını tahmin edebildiği için bu sorun çözülmektedir. Sistem

hatasının değişim hızı, hatanın zaman içindeki eğimi belirlenerek ve bu değişim hızının türev kazancı “Kd” ile çarpılmasıyla hesaplanmaktadır. Türev teriminin kontrol eylemine katkısının büyüklüğüne türev kazancı (Kd) denilmektedir (Şekil 2.11.) [110], [111].



Şekil 2.11. Türev Kontrolör (D Kontrolör) Blok Diyagramı.

Sonuç olarak PID kontrolörün işi hata sinyalini almak ve üzerinde üç ayrı matematiksel işlem gerçekleştirmektir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. PID Kontrolör Blok Diyagramı.

2.21. PID Parametreleri

Kapalı döngü bir sistemin performansı aşağıdaki özelliklere bağlıdır:

- Yükselme süresi: Sistem çıkışı için ilk kez istenen seviyenin %90'ının üzerine çıkması için geçen süre.
- Aşma: Tepe seviyesinin sabit duruma göre ne kadar yüksek olduğu, sabit duruma göre normalize edilmektedir.
- Yerleşme Zamanı: Sistemin sabit durumuna yaklaşması için geçen süre.
- Kararlı Durum Hatası: Kararlı durum çıkışı ile istenen çıkış arasındaki fark.

Üç parametrenin (K_p , K_i , K_d) sistemin performansı üzerindeki bireysel etkileri Tablo 2.6.'da özetlenmiştir. K_p , K_i ve K_d 'nin istenilen performansı elde edebilmek için birlikte ayarlanması gerekmektedir [112]–[114].

Tablo 2.6. PID Parametrelerinin Sisteme olan Etkisi.

Parametreler	Yükselme Süresi	Aşma	Yerleşme Zamanı	Kararlı Durum Hatası
K_p	Azaltır	Arttırır	Küçük Artış	Azaltır
K_i	Azaltır	Arttırır	Arttırır	Yok eder
K_d	Küçük Değişim	Azaltır	Azaltır	Etkisi yok

Tablo 2.6'ya göre örneğin, örneğin K_p ve K_i sabitken, tek başına artan K_d , yükselme süresinde küçük bir değişim meydana getirirken, aşmayı ve yerleşme zamanını azaltmakta, kararlı durum hatası üzerinde etkisiz kalmaktadır. Aynı zamanda K_i ve K_d sabitken, tek başına artan K_p , yükselme süresini azaltmakta, aşmayı arttırmakta, yerleşme süresini hafifçe arttırmakta ve kararlı durum hatasını ise azaltmaktadır.

PID kontrolörlerin parametrelerinin ayarlanması için çok sayıda ayarlama tekniği vardır; her birinin artıları ve eksileri bulunmaktadır. Ayarlama tekniklerinin çoğu, Zaman Gecikmeli Birinci Dereceden Süreç (FOPDT) için önerilmektedir. FOPDT modeli elde etmek için birçok yöntem bulunmaktadır. Bunların arasında reaksiyon eğrisi uydurma adı verilen basit bir prosedür adım tepki (step response) testi olarak adlandırılmaktadır [108].

Açık döngü ayarlama yöntemlerinin en çok kullanılan üç temel yöntemi şunlardır; klasik Ziegler – Nicholas (Z-N), Cohen – Coon (C-C) ve Chien Hrones Nicholas (CHR) yöntemi. Kapalı döngü ayarlama yöntemlerine ise Z-N, modifiye Z-N ve Tyreus-Luyben yöntemleri örnek verilebilir. Kapalı döngü ayarlama yöntemleri işlemin frekans tepkisine bağlıdır. İki parametre nihai periyot (T_u) ve nihai kazanç (K_u) kapalı döngü sistem tepkisinden değerlendirilmektedir [108], [115].

2.22. Ziegler Nichols Kapalı Döngü Ayar Yöntemi

Kontrol sisteminde parametreleri ayarlama yöntemi çok önemlidir. Kontrolördeki parametrelerin değerleri sistemin performansını etkileyebilir. Sistemin performansı genellikle uygun ayarlamayla geliştirilebilir, ancak zayıf ayarlamayla da performans kötüleşebilir. PID’de istenen kontrol yanıtını bulmak için kullanılabilecek çeşitli ayarlama yöntemleri vardır [116]. Literatürde birkaç PID kontrolör ayarlama yöntemi önerilmektedir. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir:

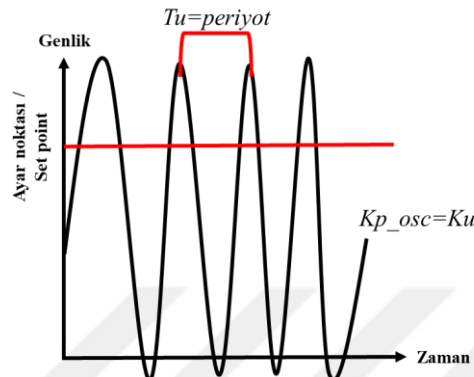
- Ziegler – Nichols yöntemi
- Chien – Hrones – Reswick yöntemi
- Cohen – Coon yöntemi
- Refined Ziegler – Nichols yöntemi
- Wang – Juang – Chan yöntemi
- Tyreus ve Luyben yöntemi
- Optimum yöntem
- Deneme & Yanılma Yöntemi [116]

Literatürde en sık tercih edilen yöntem Z-N kuralı, üç PID kazanç parametresi için iyi değerler üretmeye çalışan sezgisel bir PID ayarlama kuralıdır. Z-N salınımına dayalı ayarlama kuralları, PID kontrolör parametrelerini belirlemek için gereken kritik bilgileri elde etmek amacıyla kapalı döngü kontrolünü kullanmaktır. PID kontrolör parametrelerini Z-N kuralı ile ayarlamak için aşağıdaki adımlar sırasıyla uygulamaktadır:

I. Tüm kazanç terimleri (K_p , K_i , K_d) sıfıra ayarlanır.

II. Çıktı düzenli salınıma başlayana kadar K_p kazancı (yinelemeli olarak) arttırılır. Bu durumda elde edilen değer oransal kazanç K_u olarak bilinmektedir. Bu gerçekleşmez ise, başka bir yöntemin uygulanması gerekmektedir.

III. $K_{p_osc}=K_u$ değerine karşılık gelen salınım periyodu da bilinmelidir (T_u) (Şekil 2.13.) [112]–[114].



Şekil 2.13. K_u ve T_u değerlerinin sürekli salınım yapan sinyalden bulunması.

Z-N ayarlama formülü, Tablo 2.7 ve Tablo 2.8’de gösterildiği gibi nihai kazanç K_u ve nihai periyot T_u 'nun deneye dayalı bilgisine dayanmaktadır [117].

Tablo 2.7. Ziegler-Nichols Ayarlama Tablosu [117].

Kontrolör Tipi	PID	PI
Oransal Kazanç	$K_c = 0.6 \times K_u$	$K_c = 0.45 \times K_u$
İntegral Zamanı	$T_i = 0.5 \times T_u$	$T_i = 0.85 \times T_u$
Türev Zamanı	$T_d = 0.125 \times T_u$	-

Tablo 2.8. Ziegler – Nichols Kontrolör Kazançlarının Belirlenmesi [117].

Kontrolör Tipi	K_p	$T_i = K_p/K_i$	$T_d = K_d/K_p$
P	$0.5 K_u$	∞	0
PI	$0.45 K_u$	$T_u/1.2$	0
PID	$0.6 K_u$	$T_u/2$	$T_u/8$

Genel olarak, salınım yöntemini kullanan Z-N ayarlama kuralları, birçok kontrol uygulaması için istenmeyen, kapalı döngü yanıtlarındaki salınımlarla oldukça agresif yanıtlara yol açmaktadır. Tyreus ve Luyben'de salınımları azaltmak için daha küçük bir K_c ve daha büyük bir T_i önerilmektedir ($K_c = 0.313K_u$; $T_i = 2.2T_u$). Kontrolör kazancını artırarak sürekli salınım oluşturma güvenli bir işlem olmadığı belirtilmektedir. Ayarlama sürecindeki küçük bir hata, kapalı döngü sisteminin kararsız hale gelmesine neden olabilmektedir. Bu güvenli olmayan prosedürün yerine bazı çalışmalarda röle geri besleme kontrolü kullanılmaktadır [108].

Sistemin cevabındaki aşmanın azaltılması için Z-N, temel PID kapalı döngü ayarlama yaklaşımında değişiklikler yapılmasını önermiştir; bu, Z-N yönteminin modifiye yaklaşımı olarak bilinmektedir. Modifiye Z-N ayarlama yönteminin formülleri; $K_p = 0.33T_u$, $T_i = T_u/2$ ve $T_d = T_u/3$ şeklindedir [115].

C-C ayarlama kuralları adı verilen, reaksiyon eğrisine dayalı olarak türetilen başka bir ayarlama kuralları dizisi daha bulunmaktadır [108]. C-C ayarlama yöntemi, Z-N ayarlama yönteminden sonra en çok tercih edilen yöntemdir. Bu yöntem 1953'te Cohen ve Coon tarafından ortaya konmuştur. Bu yöntem daha geniş işlem çeşitliliğinde Z-N ayarlama yönteminden daha esnektir [116].

Deneme ve yanılma yöntemi, PID parametresinin değerini elde etmenin en kolay yollarından bir tanesidir. Bu yöntemde herhangi bir matematiksel işleme gerek yoktur. Ancak parametrenin optimum değeri garanti edilememektedir. K_p 'yi artırmadan önce K_i ve K_d değerinin sıfır olarak ayarlanması gerekmektedir. Bu yöntem, en iyi sonucu elde etmek için fazlasıyla zaman ve deneyim gerektirmektedir [113], [116], [118], [119].

İyi tasarlanmış bir kontrol sisteminin, kararlılığın yanı sıra birkaç gereksinimi karşılaması gerektiği ve bozucu etki azaltma, ayar noktası takibi ve kararlılık ve/veya sağlam performansa sahip olması gerektiği iyi bilinmektedir. Sağlamlık, kapalı döngü sisteminin bileşen değişikliklerine karşı duyarsız olma yeteneğidir. Geri bildirimin en kullanışlı özelliklerinden bir tanesidir. Performans ve sağlamlık yakından ilişkilidir [115].

PID kontrolörlerinin kabulü ve yaygın kullanımı, parametrelerini ayarlama yöntemlerinin yaygın kullanıma yol açmıştır. Geçtiğimiz yıllarda PID parametrelerinin ayarlanmasına ilişkin çok sayıda öneri ortaya konmuştur. Bu önerilerden bazıları kararlı süreçlere, entegre ve kararsız süreçlere ve çok değişkenli süreçlere odaklanmıştır. Buna dayanarak farklı stratejilerden PID ayarlama yöntemlerinin nasıl karşılaştırılabileceği

üzerine sorular ortaya çıkmıştır. Bu soruları cevaplamak için birçok araştırmacı, performans ölçümleri konusunu ele alacak farklı yöntemler önermiştir. Son yıllarda, kapalı döngü performansını değerlendirmek için işlem kontrolünde kriter olarak minimum varyans standart olarak kullanılmıştır. Diğer çalışmalarda tek döngülü işlem için iyi bir ölçü olarak integral hatasının, sağlamlık ölçüsü için ise kazanç fazı marjının kullanılması önerilmiştir. Ancak bu yöntemler çok döngülü işlemler için uygun değildir [118].

2.23. Dinamik Analizler, Zaman Cevabı ve Transfer Fonksiyonu

Geleneksel sayısal simülasyon analiz yöntemleri son derece doğru olmasına rağmen zaman alıcı olmaktadır ve araştırmacıların harici ısı akışı değişimlerinin etkilerini hızlı bir şekilde değerlendirmesine olanak sağlamamaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin büyük ölçekli ve yinelenmeli hesaplamalar gerektiren program optimizasyon kodlarına veya yerleşik sıcaklık kontrol çiplerine yönelik kodlara uygulanması zor olmaktadır. Isı transferi genellikle termal analiz yapılırken karmaşık, doğrusal olmayan, kararsız bir iletim ve radyasyon birleştirme problemi olarak kabul edilmektedir.

Son yıllarda, kararsız ısı transferi hesaplamaları sonlu elemanlar yöntemi veya sonlu hacim yöntemi gibi sayısal yöntemlere dayanan ticari yazılımlar ile yapılmaktadır. Genellikle bu yazılım araçları, doğru bir çözüme ulaşmak için modellemeden sonra ağ oluşturmayı ve yineleme yöntemlerini uyarlamayı gerektirmektedir. Sonuç olarak bu yöntemler yoğun hesaplama gerektirmektedir. Hesaplamanın bilgisayarda yapılması durumunda hesaplama miktarının büyük olmasının dezavantajı göz ardı edilebilmektedir. Ancak uygulamada ısı transferi hesaplamasının MCU veya PLC gibi kontrol sistemi içerisinde yapılması gerekiyorsa hızlı hesaplama için analitik bir algoritma bulunması gerekmektedir. Buna ek olarak, tasarımcının bazı tasarım parametrelerini optimize etmesi gerektiğinde, hesaplama miktarı katlanarak artmaktadır; çünkü her optimizasyon yinelemesinin, yakınsamayı sağlaması gereken sıcaklık alanı için sayısal bir çözüm yinelemesini depolaması gerekmektedir. Bu durumda yinelemesiz analitik algoritma, sayısal algoritmaya göre daha uygun olmaktadır [120].

Transfer fonksiyonu yöntemi, basit ve anlaşılır bir hesaplama prosedürü ile sıcaklık kontrol analizlerine uygulanabilmektedir. Transfer fonksiyonu analizi yöntemi, binaların dış kaplamalarının ısı iletkenlik analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca termal

iletkenlik ölçümü gibi malzemenin termal özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Mevcut ana akım sayısal simülasyon algoritmalarıyla karşılaştırıldığında, tasarımcının hesaplamalı sonuçları hızlı bir şekilde elde etmesine ve ısı transferinin fiziksel süreçlerinin anlaşılmasını geliştirmesine olanak tanımaktadır. Transfer fonksiyonu yönteminin dezavantajı yalnızca doğrusal zamanla değişmeyen sistemlere uygulanabilir olmasıdır. Isı transferi süreçleri için, ısı iletimi doğrusal zamanla değişmeyen bir süreç olarak ele alınabilir, konveksiyon doğrusal zamanla değişmeyen bir süreç olarak ele alınabilir, ancak radyasyonla ısı transferi sıcaklıkla ikinci dereceden bir ilişkiye sahiptir ve doğrusal zamanla değişmeyen bir süreç olarak ele alınamaz. Bu nedenle ısı transferi radyasyon içerdiğinde transfer fonksiyonu yöntemi doğrudan kullanılamamaktadır [120].

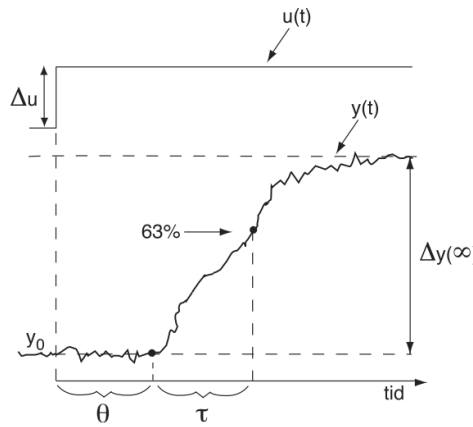
Bir sistemin çıkış yanıtı iki yanıtın toplamıdır: Zorunlu yanıt (kararlı durum tepkisi) ve doğal yanıt (homojen çözüm). Diferansiyel denklem çözme veya ters Laplace dönüşümünü alma gibi birçok teknik, bu çıkış tepkisinin değerlendirilmesini sağlasa da bu teknikler zahmetli ve zaman alıcı olmaktadır. Verimlilik, minimum sürede sonuç veren analiz ve tasarım teknikleriyle sağlanmaktadır. Kutupların ve sıfırların kullanımı ve bunların sistemin zaman tepkisiyle ilişkisi de başka bir tekniktir. Bu ilişkiyi öğrenmek problemler üzerinde niteliksel bir ele alma olanağı sağlamaktadır. Kontrol sistemlerinin analizi ve tasarımında temel olan kutuplar ve sıfırlar kavramı, sistemin tepkisinin değerlendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Bir transfer fonksiyonunun kutupları, transfer fonksiyonunun sonsuz olmasına neden olan Laplace dönüşüm değişkeni s 'nin değerleri veya transfer fonksiyonunun paydasının payın kökleriyle ortak olan herhangi bir köküdür. Bir transfer fonksiyonunun sıfırları, transfer fonksiyonunun sıfır olmasına neden olan Laplace dönüşüm değişkeni s 'nin değerleri veya transfer fonksiyonunun payının paydanın kökleriyle ortak olan herhangi bir köküdür [121], [122].

Kullanılan en yaygın test girişlerinden bir tanesi birim adım tepkisidir. Adım tepkisi, bağımsız değişken u 'daki bir adım değişikliğine (kalıcı değişiklik) bağımlı değişken y 'deki yanıttır. Matematiksel olarak u 'daki değişim;

$$u(t) = \begin{cases} u_0 & t \leq t_0 \\ u_\infty = u_0 + \Delta u & t > t_0 \end{cases} \quad (2.11)$$

Bu denklemde Δu adım büyüklüğüdür.

Şekil 2.14'te başlangıçta "durgun" olan, yani $dy/dt = 0$ ile kararlı durumda olan bir sistem ele alınmıştır. Daha sonra bağımsız değişken u 'da, sistemi başlangıçtaki kararlı durumundan uzaklaştıran bir adım değişikliği meydana gelmiştir. Sistemin sonunda yeni bir kararlı duruma yaklaşacak şekilde kararlı olduğu görülmektedir. $Y(t)$ 'de elde edilen adım tepkisi genellikle üç parametreyle karakterize edilmektedir. Bunlar kararlı durum kazancı, gecikme ve zaman sabitidir [121]. Zaman sabiti, adım tepkisinin nihai değerinin %63'üne çıkması için geçen süredir. Zaman sabitinin tersi birim (1/saniye) veya frekansa sahiptir. Zaman sabiti kutup grafiğinden de değerlendirilebilmektedir. Yükselme süresi, dalga formunun nihai değerinin 0,1'inden 0,9'una çıkma süresi olarak tanımlanmaktadır. Yerleşme süresi, yanıtın nihai değerinin %2'sine ulaşması ve bu değerde kalması için geçen süre olarak tanımlanmaktadır. Zaman sabiti, sistemin bir adım girişine tepki verme hızıyla ilgili olduğundan, birinci dereceden bir sistem için geçici yanıt özelliği olarak düşünülmektedir. Pik süresi ise, ilk veya maksimum pike ulaşmak için gereken zamandır. Aşma, dalga formunun tepe zamandaki kararlı durum veya nihai değeri aşma miktarıdır ve kararlı durum değerinin yüzdesi olarak ifade edilmektedir.



Şekil 2.14. Deneyel adım yanıtı [121], [122].

2.24. Dijital/Sayısal Sistemlerde PID Kontrolörü

Çoğu kontrolör yazılımda dijital olarak uygulanmaktadır. Yazılımda kullanabilmek için sürekli zamanlı kontrol sinyalini ayrık zamanlı veya dijital sinyale dönüştürmek gerekmektedir. Dijital kontrol yazılımları belirli kontrol eylemleri için kullanılmaktadır. Dijital bir kontrol cihazı gerçek zamanlı çalışan bir bilgisayar olarak tanımlanmaktadır. Bu,

programın sürekli çalıştığı, tekrar tekrar en yeni sensör verilerini aldığını ve sistem için yeni bir çıkış hesapladığını göstermektedir [123].

PID kontrolörü mikrodenetleyici üzerinde uygulanmak istendiğinde, ayrık zamanlı bir sinyale veya dijital alana dönüştürülmesi gerekmektedir. Dijital alanda her sinyale ayrık zamanlı bir sinyal gibi davranılması gerekmektedir. Bu durumda aşağıdaki denklemlerde de görüleceği gibi oransal terim, ayrık zamanlı hata sinyali ile çarpılan kazanç, integral terimi bir sigma toplamı, türev terimi mevcut hata ile önceki hata arasındaki fark olacaktır (Denklem 2.12 ve 2.13).

$$u(t) = Kp \cdot e(t) + Ki \int_0^t e(\tau) d\tau + Kd \cdot \frac{de}{dt}, \text{Sürekli Zamanlı Sinyal} \quad (2.12)$$

$$u[n] = Kp * e[n] + Ki * \sum_{k=0}^n e[k]T + Kd * \frac{e[n]-e[n-1]}{T}, \text{Ayrık Zamanlı Sinyal} \quad (2.13)$$

(2.12): u: Kontrol sinyali, Kp: oransal kazanç, Ki: integral kazanç, Kd: türev kazanç, e: hata, t: zaman ya da anlık zaman.

(2.13): Kp: oransal kazanç, Ki: integral kazanç, Kd: türev kazanç, T: Örnekleme Zamanı, e: hata

2.25. PID Kontrolör ile Sıcaklık Kontrolü

Sıcaklık döngüleyici, PCR gerçekleştirmek için hassas sıcaklık kontrolü ve hızlı sıcaklık değişimleri uygulayan bir cihazdır. Piyasada bulunan ticari sıcaklık döngüleyicilerin çoğunda, sıcaklık kontrolü genellikle basit algoritması, sağlamlığı ve kararlılığı nedeniyle PID kontrolü ile gerçekleştirilmektedir [110]. Bir PID kontrolörü, mikroakışkan PCR cihazlarında sıcaklığı kontrol etmek için kullanılmakta olan en popüler algoritmadır ve yapılan çalışmalara göre, bulanık PID ve sinir ağı tahmine dayalı kontrol stratejisi gibi çok daha karmaşık algoritmalarından çok daha iyi performans göstermektedir. PID parametrelerinin deneysel olarak oluşturulmuş bir süreç transfer fonksiyonuna dayalı olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bu algoritmaya göre, hedef sıcaklığın altında kalma ve aşmalar oldukça düşük olmaktadır. Kararlı durum hatası ise $\pm 0,05$ °C'den az olmaktadır. Bu algoritma aynı zamanda PCR odası ve sensör sıcaklıkları arasındaki farkı açıklayan dinamik bir düzeltme faktörünü de içermektedir [16].

PID sıcaklık kontrolörünün amacı, PCR bloğunu doğru sıcaklığa getirmek ve daha sonra bu sıcaklıkta tutmaktır. Sıcaklık kontrolörünün performansı, PID kontrolörünün

oransal, integral ve türev kazançlarının değerlerine bağlıdır. Kontrolörde uygun olmayan kazanç değerinin ayarlanması, istenen sıcaklığın aşılması veya altında kalınmasına neden olmaktadır. Sıcaklık hedeflerinin aşılması veya altında kalınması gecikmelere neden olmakta, aşırı ısınma ise DNA örneğinde hasara neden olmaktadır. Ayrıca PCR karışımı yeterli bir süre boyunca hedef sıcaklıkta olmazsa, hedef sıcaklığın altında kalma tamamlanmamış reaksiyonlara yol açmaktadır [110]. Bir PCR sıcaklık döngüleyici için PID kontrol algoritması tasarlamak, hassas kontrol döngüleri aracılığıyla PCR örneklerinin sıcaklığını doğru bir şekilde koruyan bir sistem oluşturmayı içermektedir. Bu sistem oluşturulurken öncelikle rampa, bekletme ve soğutma aşamaları dahil olmak üzere PCR işlemi için gereken hedef sıcaklık profili belirlenmektedir. Daha sonra sıcaklık döngüleyicinin ısıtma ve soğutma mekanizmaları, sensör tipleri (örn. termokupllar) ve yanıt süresi veya doğruluk açısından sınırlamaları hakkında bilgi toplanmaktadır. PID kontrolörünün üç bileşeninin anlaşılması gerekmektedir. Bu değerlerin sistemin özelliklerine göre ayarlanması önemlidir. PID parametreleri ayarlandıktan sonra algoritma oluşturulmakta ve bir kod üretilmektedir. Örneklerin aşırı ısıtılmadığından veya aşırı soğutulmadığından emin olmak için kontrol çıkışına sınırlar eklenebilmektedir. Bu, çıkış değerinin sınırlandırılmasını veya sıcaklık sınırlara yaklaştığında integral bileşenin geçici olarak devre dışı bırakılmasını içermektedir. Parametreler ayarlandıktan sonra ise kontrol algoritması simüle edilmiş veya gerçek sıcaklık döngüleyici donanımı kullanılarak test edilmektedir. Rampa, bekletme ve soğutma aşamaları sırasında sıcaklık tepkisini izlenmektedir. Yanıt tatmin edici değilse, PID parametreleri ayarlanarak ve tekrar test edilerek yinelenmektedir. Gözlenen sistem davranışına göre PID parametreleri iyileştirilmektedir. İyileştirme adımı, manuel ayarlama, Z-N veya deneme-yanılma gibi daha gelişmiş ayarlama yöntemlerini içerebilmektedir. PID kontrol algoritması etkinliği sıcaklık sensörlerinin doğruluğuna, ısıtma ve soğutma mekanizmalarının kalitesine ve sistemin genel tepki özelliklerine bağlıdır.

Yapılan bir çalışmada PID kontrolörü kullanılarak sıcaklık döngüleyicide sıcaklık kontrolü yapılmaya çalışılmıştır. Gerekli sıcaklık sınırı, kullanıcı tarafından kontrolörün ayar noktası olarak belirlenmektedir. Sıcaklık döngüleyici sistemi temel olarak örnek tutucu metal blok, sıcaklık sensörü, veri toplama sistemi, kontrolör ve ısıtma/soğutma modülünden oluşmaktadır. Sıcaklık sensörü olarak termistör kullanılmıştır. Ölçülen sıcaklık ile ayar noktası arasındaki fark (hata) kontrolöre uygulanmıştır. PWM sinyali, sıcaklık döngüleyicinin sıcaklığını kontrol etmek için sensörün çıkış voltajına karşılık gelecek

şekilde üretilmekte, otomatik olarak ayarlanmakta ve hatayı düzeltmektedir. PID kontrolör ayar yöntemi olarak Z-N ayar yöntemi kullanılmıştır. PID kontrolörünün diğer kontrolörlere kıyasla daha az yerleşme süresi, gecikme süresi, yükselme süresi ve maksimum tepe aşımı olduğu gösterilmiştir. PI ve PID kontrolörün performans analizi sonucunda PID kontrolörün simülasyonunun uygulanmasına karar verilmiştir [107].

Başka bir çalışmada PI kontrolörün sıcaklık döngüleyici üzerindeki etkisi araştırılmıştır. PCR bloğu, 9 mm kalınlığında alüminyum tutucu üzerine yerleştirilmiş ve standart 0,1µl PCR tüpleri ile temas halinde 25 adet mikro odacığa sahip metal ısıtma bloğundan oluşmaktadır. PCR bloğu 4V, 10A termoelektrik eleman kullanılarak ısıtılmış ve soğutulmuştur. Termoelektrik eleman bir ısı pompası görevi görmüştür. Isı transferi miktarı, termoelektrik elemanın sıcak tarafı ve soğuk tarafı arasındaki sıcaklık farkı ve akım kaynağı ile belirlenmiştir. PCR bloğu termoelektrik elemanın soğuk tarafına yerleştirilirken, diğer tarafına soğutucu ve fanlar yerleştirilmiştir. Termoelektrik eleman kontrol etmek ve PCR bloğun sıcaklığını ayarlamak için PI kontrolör algoritması kullanılmış, PI sabitleri Z-N kapalı döngü yöntemi kullanılarak ayarlanmıştır. Termistör PCR bloğunun sıcaklığını ölçmek için kullanılmıştır. Geliştirilen kullanıcı ara yüzü ise PCR protokolünün tanımlanmasına ve verilerin kaydedilmesine olanak sağlamıştır. Sıcaklık döngüsü 25°C ile 94°C arasında gerçekleştirilmiştir. Isıtma ve soğutma süresi dâhil toplam 30 döngü süresi 400 saniye olmuştur [110].

Bir çalışmada standart PCR protokolünü tamamlamak için harcanan zamanı azaltmak amacıyla, sıcaklık döngüsünü hızlı bir şekilde izleyebilmek için hibrid kontrol stratejisi geliştirilmiştir. Bu çalışmadaki hibrid kontrol yapısı ileri ve geri beslemeli kontrol eylemlerinin bir birleşimi şeklinde tasarlanmıştır. İleri beslemeli kontrol hızlı takipten sorumluyken, geri beslemeli kontrol bozulmaları engellemek ve sabit durumda takip hatasını ortadan kaldırmadan sorumludur. Hibrid kontrol mikrodenetleyici tabanlı olarak gerçekleştirilmiş, sıcaklık termistör ile ölçülmüştür. Tek döngülü sıcaklık izleme deneyi 55, 72, 94°C'de gerçekleştirilmiş ve hibrid kontrolün PID kontrol cihazından daha iyi performans gösterdiği görülmüştür. Daha sonra hibrid kontrol stratejisinin verimliliğini değerlendirmek için, farklı miktarda HBV DNA örnekleri içeren gerçek zamanlı bir PCR deneyi tasarlanmış ve gerçekleştirilmiştir. Geleneksel PID kontrolü ile DNA örnekleri 2ⁿ (n: sıcaklık döngüsü) üstel fonksiyonu ile amplifiye olamamıştır, DNA amplifikasyon verimliliği düşüktür. Öte yandan, hibrid kontrol stratejisi ile gen amplifikasyonu etkinliği artmıştır. Karmaşık akıllı sıcaklık kontrol algoritması ile karşılaştırıldığında, hibrid kontrol

stratejisinin gömülü mikrodenetleyicilerde uygulanması kolaydır. Deneysel sonuçlar, gen amplifikasyonunun etkinliğinin ve doğruluğunun hibrid kontrol stratejisi ile iyileştirildiğini göstermektedir [124].

Tablo 2.9.'da farklı kontrolör tipleri kullanmış sıcaklık döngüleyiciler verilmiştir. Bu çalışmaların bazılarında amplifikasyon gerçekleştirilmiş bazılarında gerçekleştirilememiştir. PCR koşulları ve adımları da çalışmaya göre değişmektedir.

Tablo 2.9. Sıcaklık Döngüleyicilerin Kontrolör Tipi ve PCR Koşullarının Karşılaştırılması.

Kaynak	Kontrolör Tipi	PCR Koşulları	Amplifikasyon
[125]	PID	Den: 93.42°C ± 0.21 Ann: 56.35°C ± 0.30 Ext: 73.20°C ± 0.31	Lambda faj geni
[126]	fuzzy-PID	Den: 95°C Ann: 60°C Ext: 72°C	-
[107]	PID	Den: 94°C Ann: 55°C Ext: 72°C	-
[104]	fuzzy-PID	Den: 98°C Ann: 55°C Ext: 72°C	β-aktin geni
[127]	Optimize PID	Den: 95°C Ann/Ext: 65°C	SEC61 translokon alt birimi alfa, Matrix Metallopeptidaz ve ORF1ab'ın DNA segmentleri
[128] [129]	PI	Den: 94°C Ann: 50°C; Ext: 72°C	6 DNA örneği
[130]	PID	Den: 95°C Ann/Ext: 60°C	T. pallidum (Syphilis) bakteriyel DNA ve Zika virüsü RNA örnekleri
[131]	Hibrid fuzzy PID	Den: 95°C Ann/Ext: 70°C	-

2.26. Termoelektrik Sistemler

Termoelektrik modüller veya Termoelektrik Soğutma/Isıtma Modülleri olarak da bilinen Peltier modülleri, bir elektrik akımı uygulandığında iki yüzey arasında ısı aktarmak için Peltier etkisini kullanan katı hal cihazlarıdır. Peltier modülleri genellikle soğutma uygulamaları ile ilişkilendirilse de ısıtma amacıyla da kullanılabilir. Termoelektrik sistemlerin avantajlarından biri, çözelti pompaları, kompresör ve valfler gibi hareketli donanıma ihtiyaç duyulmamasını sağlamalarıdır, çünkü bu tür sistemlerde hiçbir çalışma sıvısı kullanılmamaktadır. Yüksek hassasiyetli sıcaklık kontrolü de sağlamaktadır. Hareketli donanım eksikliği, güvenilirlik ve kullanım ömrünün artmasına, işletme ve bakım maliyetlerinin düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca, çalışma prensiplerinde sıvı bulunmaması nedeniyle tehlikeli çevresel zararlar önlenmektedir. Termoelektrik teknolojisi askeri, havacılık, enerji üretimi, nakliye ve belirli hedefler için HVAC (ısıtma, havalandırma ve iklimlendirme) cihazlarında kullanılmaktadır. Askeri, havacılık, endüstriyel ve bilimsel çalışmalarda uygulamarının yanı sıra, termoelektrik teknolojisi insanların günlük yaşamına daha fazla dâhil olmaya başlamıştır. Termoelektrik soğutma cihazları, bilgisayar işlemcileri, portatif yiyecek ve içecek depoları, sıcaklık kontrollü araba koltukları ve hatta termoelektrik klimalar gibi elektronik soğutma işlemlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır [132]–[134].

2.27. Termoelektrik Sistemlerin Çalışma Esasları

- Seebeck Etkisi

1821'de, iki farklı metalin birleşim yerindeki sıcaklık farkının (ΔT) akımla sonuçlandığı ve çalışan devrede bir elektromotor kuvvet yarattığı bir fenomen keşfedilmiştir. Bu fenomen, üretilen akım ve elektromotor kuvvet sırasıyla Seebeck etkisi, termo-akım ve termo-elektromotor kuvvet olarak adlandırılmıştır. Metal birleşim yerleri arasındaki ΔT , voltaj farkı (ΔV) yükseltilerek yükseltilebilmektedir. Seebeck katsayısı, özelliğe dayalı bir sabittir ve çeşitli malzemeler için farklı olmaktadır. Bu katsayı yarı iletken malzemeler için çok büyük olarak kabul edilirken ($200 \mu V/K$), metaller için yaklaşık olarak $0 \mu V/K$ olarak kabul edilmektedir. Seebeck katsayısı (α) şu şekilde tanımlanmaktadır [132]:

$$\alpha = \frac{\Delta V}{\Delta T} \quad (2.14)$$

Burada ΔV , voltaj cinsinden voltaj farkı ve ΔT , Kelvin cinsinden sıcaklık farkıdır.

- Peltier Etkisi

1834'te, devredeki akım varlığında, akımın yönüne bağlı olarak, çeşitli iletken malzemelerin birleşme yerlerindeki ısıyı absorpladığı veya geri çevirdiği keşfedilmiştir. Bu fenomene Peltier etkisi denmektedir. Birleşik malzemeler arasındaki Fermi enerjileri (elektronların sıfırın üzerindeki sıcaklıklarda enerji durumları ile ilgili kuantum fiziğinde bir kavram) bu durumun oluşmasının nedenidir. İki farklı malzeme özelliği ve birleşme yeri sıcaklığı, belirli bir malzemenin termoelektrik performansını belirlemek için kullanılmakta olan, ölçüsüz parametre olan, ısı absorplama veya geri çevirme kapasitesini yani performans katsayısını (ZT) belirlemektedir:

$$ZT = \frac{\alpha^2}{k} \sigma T \quad (2.15)$$

Burada σ ve T sırasıyla elektriksel iletkenlik ve sıcaklığı göstermektedir. k , iki ayrı termal özellikten oluşan termal iletkenliği belirtmektedir (sırasıyla k_e ve k_l , elektriksel iletkenlik ve kafes iletkenliği).

- Thomson Etkisi:

Son olarak termoelektrik etki, tek iletkendeki akım nedeniyle üretilen (tersinir) ısı oranıyla ilişkili Thomson etkisi olarak adlandırılmıştır. Thomson etkisi, 1851'de William Thomson tarafından keşfedilmiş olan Peltier etkisinin sürekli bir versiyonu olarak kabul edilmekte ve aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır [132]:

$$\beta = \frac{q}{I \Delta T} \quad (2.16)$$

2.16 numaralı denklemde, β , V/K cinsinden Thomson etkisi katsayısı, I , amper cinsinden akım ve ΔT , Kelvin cinsinden sıcaklık farkıdır.

2.26. Peltier Eleman

Peltier termoelektrik hücreler (TEC), termal olarak paralel ve elektriksel olarak seri bağlanmış birkaç termokupldan (TC) oluşan cihazlardır. TC'ler, katı hal yarı iletkenleri “termoelektrik malzemeler” (TM) olarak adlandırılan n ve p tipi termoelement (TE)

çiftlerinden oluşur. TEC, sıcaklık gradyanından (Seebeck etkisi) elektrik voltajı oluşturmakta veya elektrik voltajını sıcaklık gradyanına (Peltier etkisi) dönüştürmektedir. Peltier hücreleri birçok uygulamaya çok sayıda çözüm sağlamaktadır. Örneğin TEC genel olarak iki şekilde kullanılmaktadır: ısı pompaları (soğutma veya ısıtma modlarında çalışma) ve elektrik jeneratörleri [134], [135].

Kullanılacak uygun peltier hücresini seçerken dikkate alınması gereken birkaç özellik vardır. Genellikle bir veri sayfasında verilen temel parametreler şunlardır: Q_{cmax} , ΔT_{max} , V_{max} , I_{max} . En önemlisi peltier hücresinin çıkarabileceği ısı miktarıdır (Q_{cmax}). Q_{cmax} değerinin, soğutulacak sistem tarafından üretilen maksimum ısı (Q_c) miktarından daha yüksek olduğundan emin olunmalıdır. Bir sonraki adım Q_c 'yi elde etmek için gerekli akımı (I) belirlemek ve istenen ΔT 'yi oluşturmaktır. Q_c 'i elde etmek için tüketilen gücü ($P=I.V$) bilmek, performans katsayısını (COP) tahmin etmeyi sağlamaktadır. Peltier performans katsayısı (COP), soğutma kapasitesinin tüketilen elektrik gücüne bölümü olarak tanımlanmaktadır [135], [136].

$$COP = Q_c/P \quad (2.17)$$

COP'nin birden düşük olması, yani elde edilen güçten daha fazla güç tüketilmesi olasıdır. Peltier hücrelerin avantajı, sıcaklığın hassas kontrolünü sağlamaları ve ortam sıcaklığından neredeyse bağımsız davranmalıdır. Bununla birlikte, sistemin dikkatli tasarımı ile COP değeri kolayca yükseltilebilmektedir. Bir TEC modülünün verimliliği, transfer edilen ısı miktarına, kenarları arasındaki sıcaklık farkına ve uygulanan akıma bağlıdır [136].

Peltier modülü doğru akımla (DC) beslenirse, bir tarafında ısı diğer tarafında soğuk üretmektedir. Bununla birlikte, COP ve soğutma oranı, herhangi bir termoelektrik soğutma sistemi tasarımı için önemli göstergelerdir. PID kontrol, bulanık kontrol, sinir ağı kontrolü ve uyarlamalı kontrol dahil olmak üzere TEC soğutma sistemi performansının artırılması için çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Sıcaklık kontrolü alanında PID kontrolünü bulanık mantık kontrolü ile birleştiren bazı yöntemler de uygulanmıştır [137].

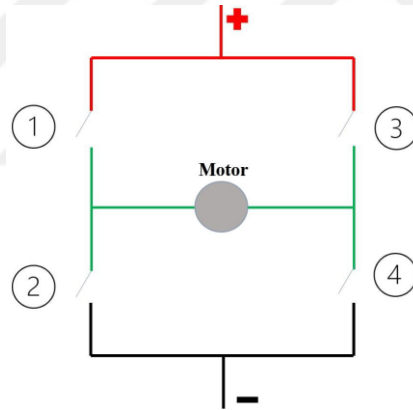
2.28. Transistör ve MOSFET

İlk transistör 1947'de Bell Labs, Murray Hill NJ'de geliştirilmiştir. Silikon metal oksit yarı iletken alan etkili transistör (MOSFET veya MOS transistörü), Bell Laboratories

tarafından 1948'de transistörün icadının duyurulmasından sonraki yirmi yıla kadar ticari olarak önemli hale gelmemiştir. MOSFET teknolojisinin entegre devre işlemeyi daha basit hale getireceği ve tek bir çip üzerinde daha fazla cihazın paketlenilebileceğinin kabul edilmesi, 1970'te başlamıştır. MOSFET'ler, entegre devrelerin (IC'ler) ve mikro işlemcilerin temel yapı taşlarıdır [138], [139].

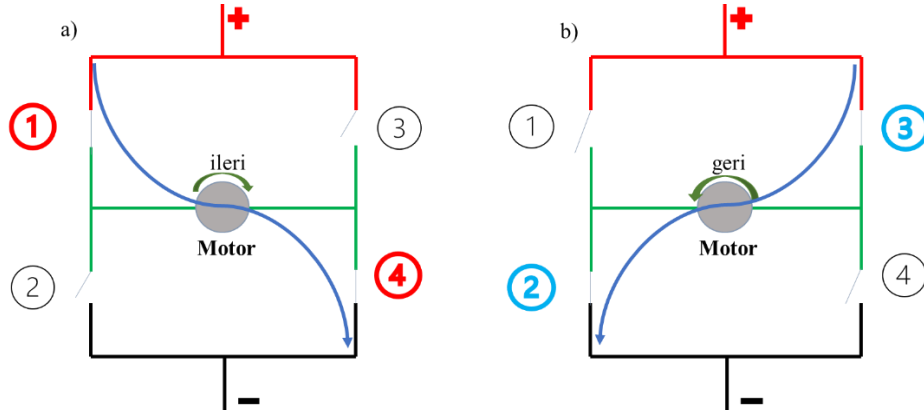
2.29. H-Köprüsü

H-Köprü devresi, merkezde “H” benzeri bir konfigürasyon oluşturan motorla birlikte dört anahtarlama elemanı, transistör veya MOSFET içermektedir. İki belirli anahtarı (örneğin 1 ve 4 numaralı anahtarlar) aynı anda etkinleştirmek akım akışının yönünü değiştirmektedir. Böylece motorun dönüş yönü de değişmektedir. Özetle H köprü tipi DC motor sürücüler basit yapıda ve DC motorun hem hız hem de yön kontrolüne olanak sağlayan elemanlardır. Güç elektroniği, Şekil 2.15.'de gösterildiği gibi, bir H harfi konfigürasyonu oluşturmaktadır [140].



Şekil 2.15. H-Köprü Devresi.

Anahtarlar, anahtarlama için kullanılan elektronik MOSFET'lerin simgesi olarak kullanılmıştır. Motoru ileri yönde döndürmek için, motora güç sağlamak amacıyla anahtarlar 1 ve 4 kapatılmalıdır. Şekil 2.16.a, motoru ileri yönde hareket ettiren H-Köprüsüdür. Motoru ters yönde döndürmek için, motora güç sağlamak amacıyla anahtarlar 2 ve 3 kapatılmalıdır. Şekil 2.16.b, motoru geri yönde hareket ettiren H-Köprüsüdür.



Şekil 2.16. H-Köprü Topolojisi – a) İleri Yön, b) Ters/geri yön.

Genellikle motorlar, mekanik bir hedefe ulaşmak için mikrodenetleyiciden kontrol edilmektedir. Mikrodenetleyici, motorlara bilgi sağlamaktadır, ancak motorları sürmek için gereken gücü sağlayamamaktadır. Bir H-köprü devresi, mikrodenetleyici bilgilerini girdi olarak almakta ve bunları mekanik bir motoru sürmek için güçlendirmektedir. Kısaca H köprüsü, küçük elektrik sinyallerini alarak bunları mekanik motor için yüksek güç çıkışına çevirmektedir. Ayrıca H köprüsü sadece motora sabit bir güç aktarmak ve motoru iki yönlü döndürmek için kullanılmamaktadır. Ek olarak, motora aktarılan gücün değişken olduğu yani hız kontrolü gerektiren uygulamalarda da kullanılmaktadır. Bunu sağlamak için PWM yöntemi tercih edilmektedir. PWM ve H-Köprüsü yöntemleri birlikte kullanıldığında, DC motor üzerinde tam kontrole sahip olunmaktadır [140], [141].

2.30. Hız Kontrolü ve Darbe Genişlik Modülasyonu

DC motorları kontrol etme yöntemlerinden bir tanesi PWM kullanmaktır. Sadece motora giriş voltajını kontrol ederek DC motorun hızı kontrol edilebilir ve bunu yapmanın en yaygın yöntemi PWM sinyalini kullanmaktır. PWM yöntemi ile motora bir dizi darbe gönderilmektedir. PWM, gücü hızlı bir şekilde açıp kapatarak elektronik cihaza giden voltajın ortalama değerini ayarlamaya izin veren bir tekniktir. Darbelerin genişliği, motor hızını kontrol etmek için değiştirilebilmektedir. Dar genişliğe sahip darbeler motorun yavaş dönmesine neden olurken darbe genişliğini artırmak ise motorun hızını arttırmaktadır. Motoru tamamen durdurmak için, darbeyi durdurmak yeterli olmaktadır, yani sıfır volt göndermek yeterlidir. Tam hızda çalıştırmak ise, tekrar atım yapmadan tam voltajı

göndermektir. Şekil 2.15.'de 1 ve 4 numaralı anahtarlar açık olduğunda, motor tam hızda çalışmaktadır. Anahtar 1 kapalıyken yalnızca anahtar 4 açıldığında motor duracaktır. Bu sistem kullanılarak, motoru yarı hızında çalıştırmak için frekans ve görev döngüsü olmak üzere iki ana faktörü göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Arduino kartı kullanıldığında ise PWM çıkışını transistörün base veya bir MOSFET'in gate ucuna bağlayarak ve PWM çıkışını kontrol ederek motorun hızı kontrol edilebilmektedir.

Frekans, anahtarın ne kadar hızlı açılıp kapatıldığıdır. Frekans çok düşükse (anahtar yavaş değiştirilirse), motor anahtar açıldığında tam hızda çalışacak ve anahtar kapatıldığında tamamen duracaktır. Frekans çok düşükse, motorun zaman sabiti, açık ve kapalı arasında tam olarak geçiş yapmak için yeterli zamana sahip demektir.

Görev döngüsü, bir yükün ya da devrenin ne kadar süreyle açık kaldığını gösteren oransal bir ifadedir. Motora ne kadar güç verildiğinin ortalamasıdır. %75'lik görev döngüsü, zamanın %75'inde açık, kalan %25'lik zamanda kapalı olan bir sinyali ifade etmektedir.

2.31. Röle

Röleler, elektronik endüstrisinde kullanılmakta olan temel bileşenlerden bir tanesidir. Röle, akımı kontrol etmek için elektrik temas noktalarını açıp kapatarak anahtar görevi gören bir elektromıknatıs olarak tanımlanmaktadır. Bir elektromanyetik nötr röle, en basit, en eski ve yaygın röle türüdür. Basit bir elektromanyetik röle yaylar, kontaklar, armatür, çekirdek, sargı, manyetik çekirdek ve yalıtıkandan oluşur. Bir röleye enerji verildiğinde, sargısında bazı ilginç akım değişimleri gözlemlenebilir. Bir rölenin sargısı bir güç kaynağına bağlandıktan hemen sonra, endüktanslı bir devrede olduğu gibi akım üstel kanuna göre artar. Röle modülleri ihtiyaca göre tek kanaldan çift kanala, dört kanaldan sekiz kanala kadar kullanım alanı sağlayabilmektedir [142], [143]. Ayrıca röle modülleri, bir mikrodenetleyiciden gelen dijital çıkış sinyalini kullanarak enerjilenebilmektedir.

2.32. Sıcaklık ve Ölçümü

Sıcaklık süreç kontrolünde en önemli parametrelerden biridir. Sıcaklığın doğru ölçümü kolay değildir ve $\sim 0,5^{\circ}\text{C}$ 'den daha iyi doğruluk elde etmek gerekmektedir. Sensörün

doğrusal olmaması, sıcaklık gradyanları, kalibrasyon hataları ve zayıf termal temas gibi çeşitli kaynaklar nedeniyle hatalar meydana gelmektedir.

Sıcaklığı ölçmek için birçok sensör tipi vardır. Termokupllar, direnç sıcaklık dedektörleri (RTD) ve termistörler gibi bazı sensörler eski klasik sensörlerdir ve büyük avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Entegre devre sensörleri ve radyasyon termometre cihazları gibi yeni nesil sensörler sadece sınırlı uygulamalar için kullanılmaktadır. Bir sensörün seçimi doğruluk, sıcaklık aralığı, tepki hızı, termal kuplaj, çevre (kimyasal, elektriksel veya fiziksel) ve maliyete bağlıdır [144].

Termistör (thermistor) adı "termal (thermal)" ve "direnç (resistor)" kelimelerinden türetilmiştir. Termistörler, gövde sıcaklığında küçük bir değişikliğe maruz kaldıklarında elektrik direncinde büyük bir değişiklik sergileyen sıcaklığa duyarlı pasif yarı iletkenlerdir. Çok yüksek ve çok düşük sıcaklıklarda, termokupllar gerekli bir araçtır, ancak -90°C ila 130°C arasında, termistörler çok daha doğru ve kararlı çalışmaktadır. Bunun nedeni, termistörlerin elektrik dirençlerini önemli ölçüde değiştirerek sıcaklığı algılamasıdır. Termistör tabanlı bir sistemde, 0°C başına 35 mV sinyal değişimi geneledir; termokupl tabanlı bir sistemden yaklaşık 1000 kat daha büyüktür. RTD'ler, Pt100 veya Pt1000 platin RTD'ler kullanılarak üretilen endüstriyel termometrelerde sık kullanılmaktadır. Bu sensörler pahalıdır ve her RTD için ayrı bir elektronik sürücünün yanı sıra özel ağ bağlantısı gerektirmektedir [145], [146] .

Piyasada elektrik direnci, radyasyon, yarı iletken, manyetik vb. gibi farklı çalışma prensiplerine sahip çeşitli sıcaklık sensörleri bulunmaktadır. DHT11 ve DHT22 sensörleri en çok kullanılan sensörlerdir, piyasada bulunmaları kolaydır, ayrıca sıcaklık ve nem ölçme gibi bir sensörde iki fonksiyona sahip olma avantajına sahiptirler. DHT11, DHT22, DS18B20 sensörleri mevcut tüm sıcaklık sensörleri arasında en küçük sapma değerine sahiptir. Yapılan bir çalışmada DS18B20 sensörünün %99,05 ile en yüksek doğruluğa sahip olduğunu, onu sırasıyla %98,15 ve %97,19 ile DHT22 ve DHT11'in izlediğini gösterilmiştir [147].

PCR, DNA amplifikasyonunu sağlamak için esas olarak DNA örneklerinin sıcaklık döngülerini kullandığından, sıcaklık doğruluğu PCR teknolojisi için çok önemlidir. Bu nedenle, yapılan çalışmalarda genellikle sıcaklık ölçümü için aynı anda iki yöntem kullanılmıştır: gerçek zamanlı kızılötesi sıcaklık ölçümü ve tüp veya mikrokanal içerisinden sıcaklık ölçümü [148]. Kızılötesi termal görüntüleme kameraları yalnızca malzemenin yüzey

sıcaklığını analiz edebilmektedir. Bu yöntemin yanında PCR işleminin gerçekleştiği alanın içerisinden ölçüm alınabilmesi işlem doğruluğunu önemli ölçüde arttırmaktadır. Tablo 2.10’da yapılan çalışmalarda sıcaklık ölçümünde kullanılan sensör çeşitleri verilmiştir. Bu sensörler genellikle PCR’ın gerçekleştiği alan içerisine veya ısıtmada kullanılan elemanların üzerine sabitlenmiştir. Her iki durumda da amplifikasyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir. Yapılan çalışmalarda ince cidarlı amplifikasyon tüpleri veya mikroçip kullanılmış, örnek hacimleri ise daha çok 25 µl olmak üzere değişkenlik göstermiştir.



Tablo 2.10. Sıcaklık Döngüleyici Cihazlarında Kullanılan Sıcaklık Ölçüm Yöntemleri ve Karşılaştırmalar.

Sıcaklık ölçümü / Sensör	Sensör Konumu	Örnek Hacmi	PCR koşulları / Hız	Hedef gen	Güç Kaynağı	REF.
PT1000 RTD, K tipi termokupl	Çip içerisinde	25 µl	24,12°C /s ısıtma oranı ve 25,28°C/s soğutma oranı, toplam 9 dk (1 dk ön-denatürasyon + 45 PCR döngüsü)	HCMV DNA'sı	24V harici güç kaynağı	[149]
LM35 TO220, LM35 SMD	Isıtıcı bloğa sabit	25 µl	110°C ve 65°C, 30 döngü	SARS-CoV-2 RNA örnekleri	AC/DC adaptörü (giriş: 100-240 V, frekans: 50/60 Hz, çıkış: 12 V, 5 A)	[150]
DS18B20, kızılötesi termal kamera, K tipi termokupl	DS18B20 Al blok altında, K tipi termokupl reaksiyon çemberi içerisinde	25 µl	30 döngü 50dk	turmeric DNA	Üç adet 18.650'lik Lityum batarya seri bağlı toplam 12,6 V'luk bir gerilim	[148]
2 adet 10 kΩ'luk yüzeye monte (SMD) NTC termistör	PCB ısıtıcı yüzeylere monte	20 µl	95°C de 15 s ve 60°C de 1 dk, 2,0 °C/s ısıtma ve soğutma oranı	T. pallidum	AC/DC adaptörü (giriş: 100-240 V, frekans: 50/60 Hz, çıkış: 12 V, 5 A)	[130]
PT1000	Bakır kalıba monte	50 µl	95°C ve 60°C	rat GAPDH geni	-	[151]
T tipi termokupl	Özel bir kontrol tüpünde merkezli	1-5 µl arası	bağlanma/uzama sıcaklığı 62°C–76 °C ve denatürasyon sıcaklığı 85°C–92 °C	human genomic DNA	-	[26]
Pt ince film sensörü	Seramik plaka üzerinde	1 µl	7,7°C/s ısıtma oranı ve 6,6°C /s soğutma oranı, 32 döngü 25dk	CFTR geni	2 adet ayarlanabilir güç kaynağı (Agilent E3640A)	[152]

2.33. Mikrodenetleyici Sistemler

Mikrodenetleyiciler, harici cihazları kontrol etmelerini sağlayan ek parçalara sahip genel amaçlı mikroişlemcilerdir. Temel olarak, bir mikrodenetleyici, program belleğine yüklenen bir kullanıcı programını yürütmektedir. Bu programın kontrolü altında, veriler harici cihazlardan (girişler) alınmakta, ayarlanmakta ve daha sonra veriler harici çıkış cihazlarına gönderilmektedir. Ayrıca mikrodenetleyici, bir araştırmacıya karmaşık giriş / çıkış (G/Ç) veri işleme algoritmaları oluşturma imkânı veren çok güçlü bir araçtır. Mikrodenetleyiciler veri kelimesindeki bit sayısına göre sınıflandırılmaktadır. 8 bit mikrodenetleyiciler en popüler olanlardır ve birçok uygulamada kullanılmaktadır. 16 bit ve 32 bit mikrodenetleyiciler çok daha güçlüdür, ancak genellikle daha pahalıdır ve mikrodenetleyicilerin kullanıldığı birçok küçük ve orta genel amaçlı uygulamada kullanımlarına ihtiyaç duyulmamaktadır [144].

En basit mikrodenetleyici mimarisi bir mikroişlemci, bellek ve G/Ç'dan oluşmaktadır. Mikroişlemci ise merkezi bir işlem birimi (CPU) ve kontrol biriminden (CU) oluşmaktadır. CPU bir mikroişlemcinin beynidir ve tüm aritmetik ve mantıksal işlemlerin yapıldığı yerdir. Kontrol ünitesi mikroişlemcinin içerisindeki işlemlerini kontrol etmekte ve verilen görevleri yerine getirmek için mikroişlemcinin diğer kısımlarına kontrol sinyalleri göndermektedir. Bellek, bir mikrobilgisayar sisteminin önemli bir parçasıdır. Uygulamaya bağlı olarak, bellek iki gruba ayrılmaktadır: program belleği ve veri belleği. Program belleği tüm program kodunu saklamaktadır ve bu bellek genellikle kalıcıdır, yani güç kesildikten sonra veriler kaybolmamaktadır. Veri belleği ise, çeşitli aritmetik ve mantıksal işlemler sırasında geçici kullanıcı verilerinin depolandığı yerdir [144].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Mikroçip Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Tez çalışmasında mikroçip üretiminde PMMA, DSA ve lamel kullanılmıştır, üç katmanlı tasarım gerçekleştirilmiştir. Temin edilen malzemelerin özellikleri ve fiyatları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Temin edilen malzemeler, özellikleri ve fiyatları.

MALZEME	EN	BOY	KALINLIK	TERMAL İLETKENLİK	ADET	FİYAT	MALZEME TİPİ
LAMEL	24 mm	50 mm	0.13 – 0.17 mm	1 W/m.K	100	11,96 ₺	Hidrolik sınıf I borosilikat cam
	22 mm	22 mm	0.13 – 0.17 mm	1 W/m.K	100	-	Hidrolik sınıf I borosilikat cam
3M™ Microfluidic Diagnostic Tape 9965	15,3 cm		0.18 mm	-	1	-	Akrilik
PMMA	50 cm	50 cm	3 mm	0.16 - 0.25 W/m.K	1	-	PMMA

3.1.1. Çift taraflı bant

DSA seçimi yapılırken 3M™ ürünleri incelenmiştir, PCR mikroçip tasarımı için uygun olduğu düşünülen Tablo 3.2.'deki çift taraflı bantlar gösterilmiştir. Çift taraflı bantların yüksek sıcaklık dayanımına sahip olmasına ve kimyasal olarak inert olmasına dikkat edilmiş, kalınlıkları ise ~1 mm'yi geçmeyecek şekilde seçilmiştir.

3M™ 9965 kodlu bant özellikle mikroakışkan uygulamalarda veya medikal cihaz tasarımlarında kullanılmak üzere geliştirildiği için tercih edilmiş ve kullanılmıştır. Önemli özelliklerinden birkaçı ise her iki tarafının basınca duyarlı akrilat yapıştırıcı ile kaplanmış beyaz bir polyester filminden oluşması, hidrofobik yapıştırıcının lekelenmeyi ve

bulanıklaşmayı önlemesi ve farklı birçok yüzeye yapışması, hemolitik olmaması, memeli hücreleri için toksik olmaması ve ışık geçirgenliğinin düşük olmasıdır. Bu özellikleri sayesinde PCR için ideal olacağı düşünülmüştür.

Tablo 3.2. Çift taraflı bantlar ve özellikleri.

<u>Çift Taraflı Bant (DSA)</u>	Bant Kalınlığı Kaplamaşız mil (mm)	Açıklama	Yapıştırıcı Tipi	Sıcaklık Dayanımı (Dakika/Saat)
<u>3M™ VHB™</u>	45 (1.1 mm)	Gri, akrilik köpük taşıyıcı, uyumlu	Akrilik	300°F (149°C)
<u>3M™ VHB™ GPH-160GF</u>	62 (1.6 mm)	Gri, çift taraflı akrilik köpük bant	Akrilik	450°F (230°C)
<u>3M™ 9088</u>	7.9 (0.20 mm)	Solventsiz modifiye akrilik	Akrilik	300°F (148°C)
<u>3M™ Microfluidic Diagnostic Tape 9965 Double Sided White Tape</u>	7.4 (0.51 mm)	Her iki tarafı basınca duyarlı akrilat yapıştırıcı ile kaplanmış beyaz bir polyester filminden oluşur.	Akrilik	-

3.1.2. Lamel

24 mm x 50 mm ve 22 mm x 22 mm boyutlu, 0.13 – 0.17 mm arası kalınlığa sahip 100 adet Isotherm lamel Labshop41 firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Polimetilmetakrilat

PMMA, yüksek yüzey parlaklığına ve yüksek şeffaflığa sahip doğrusal amorf bir termoplastik polimerdir. PMMA ışığı neredeyse kayıpsız olarak 360 - 1000 nm aralığında iletmektedir. Oksidatif foto degradasyona karşı olağanüstü derecede dayanıklıdır ve güneş ışığına karşı oldukça karardır. Gerilme, basınç ve eğilme dayanımları çoğu uygulama için yeterlidir. Ayrıca, PMMA hem asidik hem de alkalın ortamlara karşı büyük hidrolitik

dirence sahiptir. Birçok inorganik reaktife, alifatik hidrokarbon, polar olmayan çözücü, seyreltik sulu asit ve alkaline dayanıklıdır [153].

Tasarımda kullanılacak PMMA malzeme Önder Kimya San. A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.2.Mikroçip Tasarımı

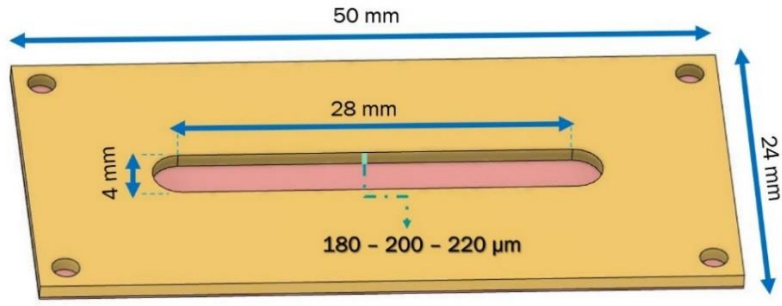
Mikroçip kanal tasarımı yapılırken, kanal hacminin 20 µl ve üzeri olmasına dikkat edilmiş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır (Tablo 3.3.). Mikroçip 3 katmandan oluşmaktadır. Orta katman DSA ile oluşturulan ve mikrokanalı oluşturacak şekilde desenlenen katmandır. Üst katman, giriş ve çıkış deliklerine sahip esnek polimer PMMA katmanıdır. Alt katman ise lamel katmanıdır.

Farklı boyutlarda mikroçip tasarımları yapılmıştır. 24 mm x 50 mm boyutlu mikroçip için tasarımında mikrokanal genişliği sabit tutulmuş (4 mm olarak), kanal yüksekliği ve derinliği değiştirilerek hacim hesaplanmıştır. Örneğin; kanal genişliği 4 mm, yüksekliği 28 mm ve derinliği 180 µm ve üzeri seçildiğinde hacim 20 µl'den büyük olmuş, istenilen sonuç elde edilmiştir (Şekil 3.1.).

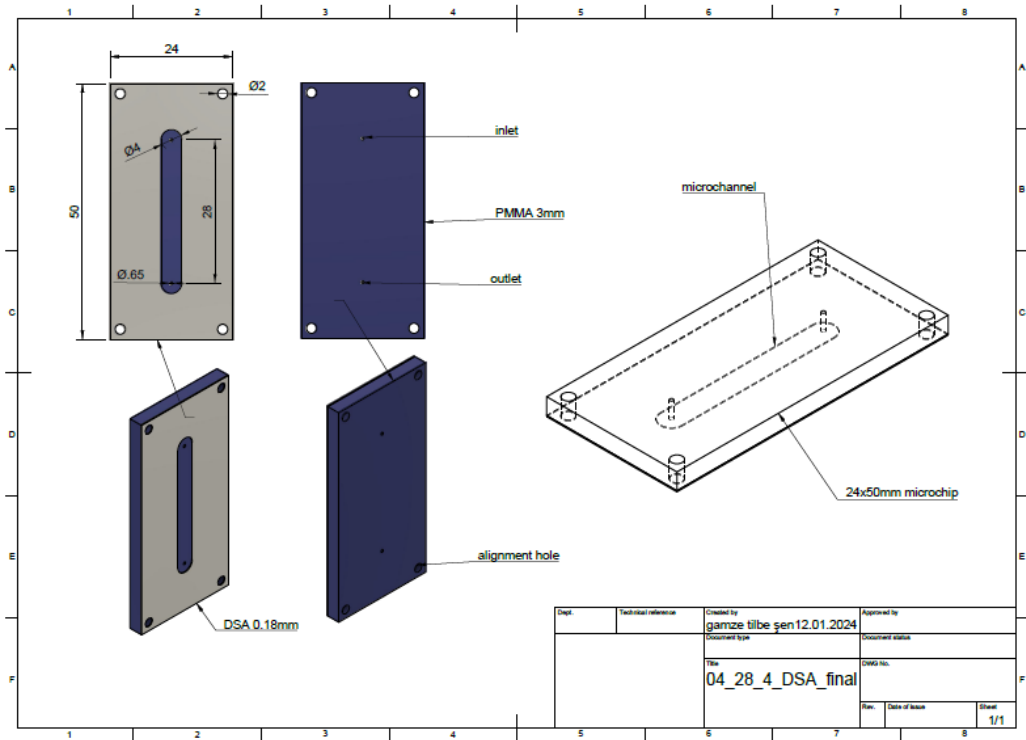
Tablo 3.3. Mikro kanal hacim hesabı tablosu. Hesaplamalar dikdörtgenler prizması hacim hesabı dikkate alınarak 24 mm x 50 mm boyutlu çip için yapılmıştır. İstenilen ve kullanılacak hacimler kırmızı ile belirtilmiştir.

DİKDÖRTGENLER PRİZMASI							
	BOYUTLAR			HACİM (mm ³ , µl)	YÜZEY ALANI	YÜZEY ALANI/HACİM	KANAL BOYUTU (mm x mm)
	BOY (mm)	EN (mm)	YÜKSEKLİK (µm)				
REAKSİYON KABI	22,00	4,00	180,00	15,84	185,36	11,70	22x4
	22,00	4,00	200,00	17,60	186,40	10,59	
	22,00	4,00	220,00	19,36	187,44	9,68	
	22,00	4,00	250,00	22,00	189,00	8,59	
	24,00	4,00	180,00	17,28	202,08	11,69	24x4
	24,00	4,00	200,00	19,20	203,20	10,58	
	24,00	4,00	220,00	21,12	204,32	9,67	
	24,00	4,00	250,00	24,00	206,00	8,58	
	26,00	4,00	180,00	18,72	218,80	11,69	26x4
	26,00	4,00	200,00	20,80	220,00	10,58	
	26,00	4,00	220,00	22,88	221,20	9,67	
	26,00	4,00	250,00	26,00	223,00	8,58	
	28,00	4,00	180,00	20,16	235,52	11,68	28x4
	28,00	4,00	200,00	22,40	236,80	10,57	
	28,00	4,00	220,00	24,64	238,08	9,66	
	28,00	4,00	250,00	28,00	240,00	8,57	
	30,00	4,00	180,00	21,60	252,24	11,68	30x4
	30,00	4,00	200,00	24,00	253,60	10,57	
	30,00	4,00	220,00	26,40	254,96	9,66	
	30,00	4,00	250,00	30,00	257,00	8,57	

Kanal genişliği, boyut ve derinlik belirlendikten sonra mikroçip tasarımı bilgisayar destekli 3B CAD kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2.'de mikroçip tasarımı ölçekli olarak gösterilmiştir. Örnek giriş – çıkış delikleri çapı 0.65 mm olarak belirlenmiş, mikroçip hizalama delikleri ise DSA ve PMMA katmanlarında dörder adet olmak üzere 2 mm çaplı olarak ayarlanmıştır.

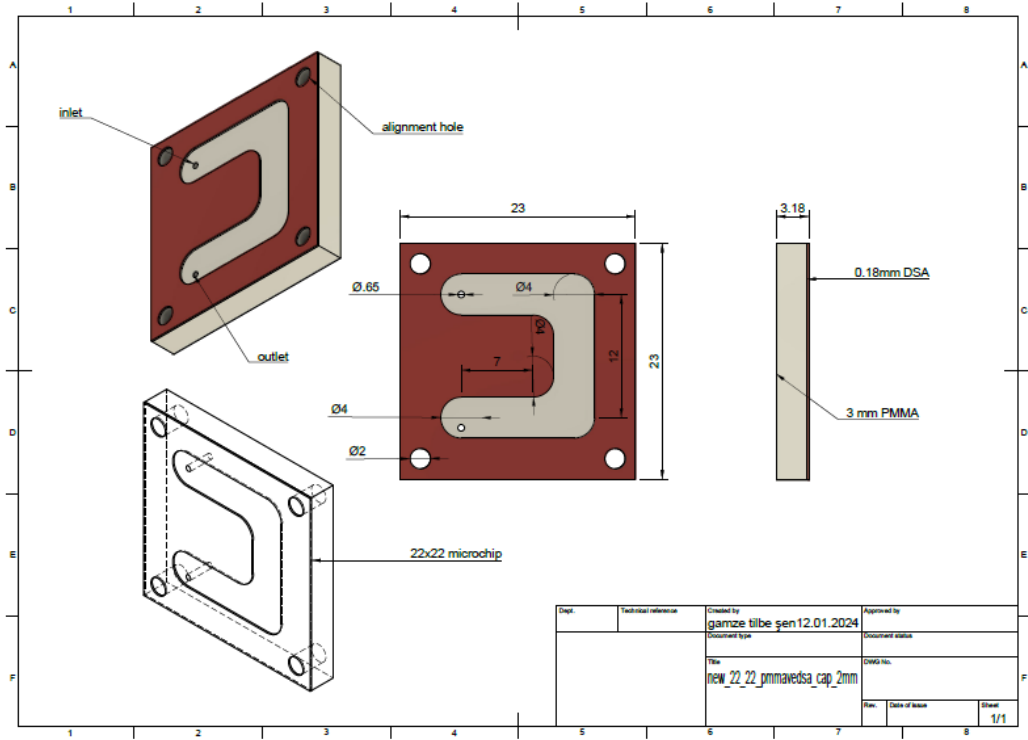


Şekil 3.1.Üç boyutlu mikroçip tasarımı.

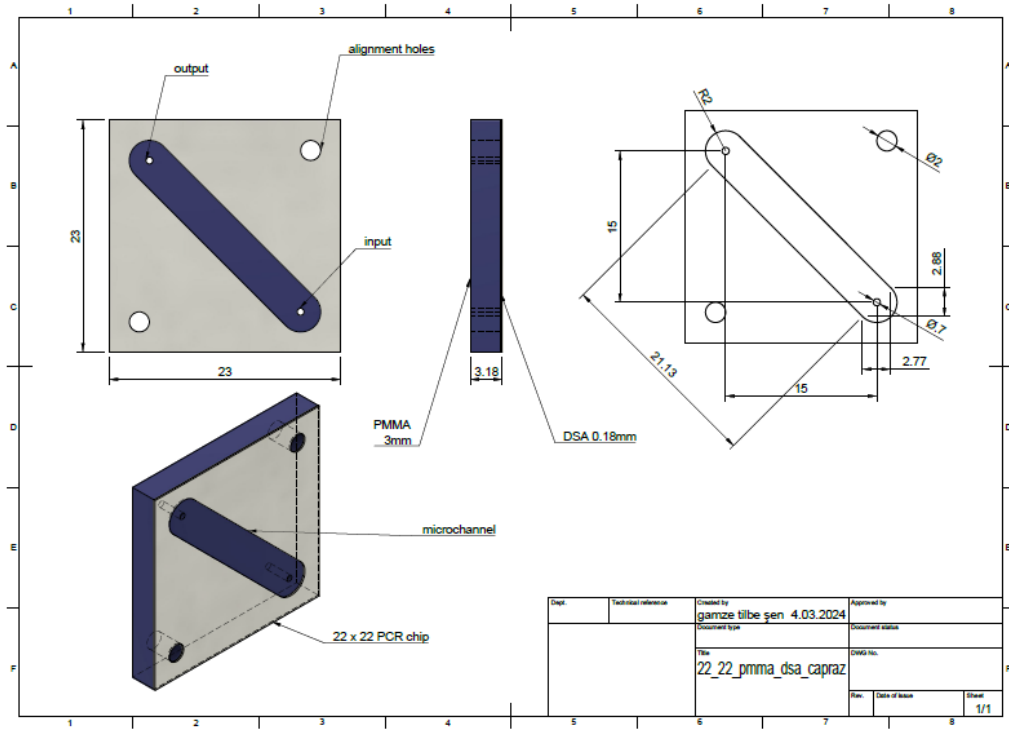


Şekil 3.2. 24 mm x 50 mm boyutlu mikroçip tasarımı (bu mikroçip örneği 20.16 µl hacme sahiptir).

22 mm x 22 mm boyutlarında farklı tasarımlar yapılmıştır. “U” şeklinde 4 mm ve 3 mm çaplı mikro kanallar oluşturulmuştur. Ayrıca çapraz mikrokanallar ile de istenilen hacimler elde edilmiştir. Mikrokanal hacimleri 10 µl ve üzeri olacak şekilde tasarımlar oluşturulmuştur (Şekil 3.3., Şekil 3.4.)

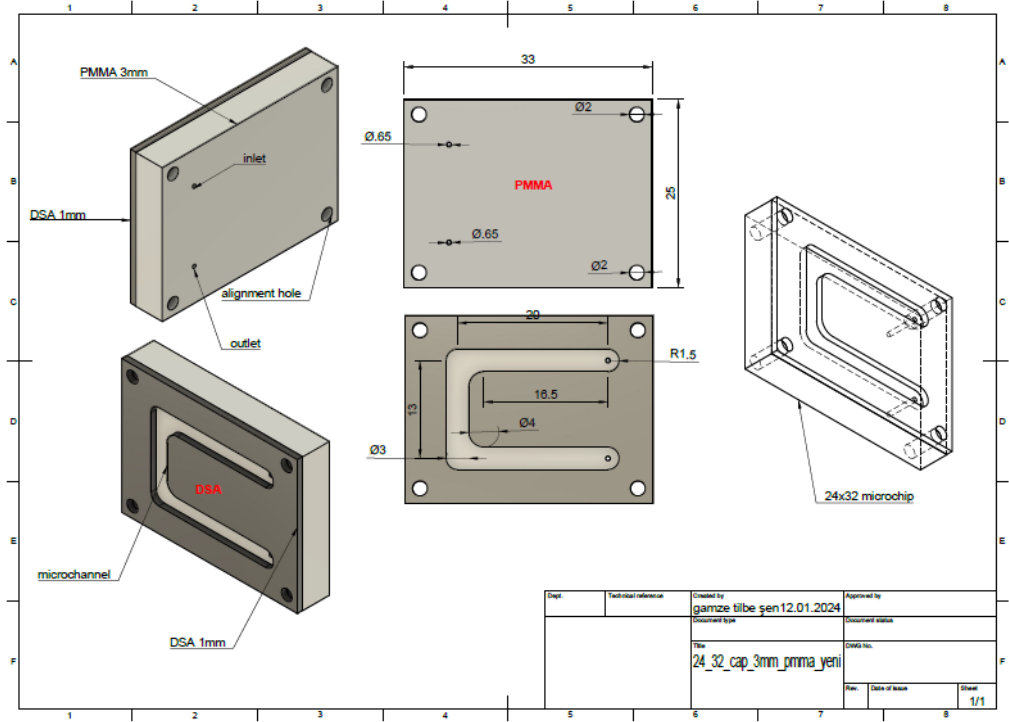


Şekil 3.3. 22 mm x 22 mm boyutlu tasarlanan mikroçip 26.62 µl hacme sahiptir.

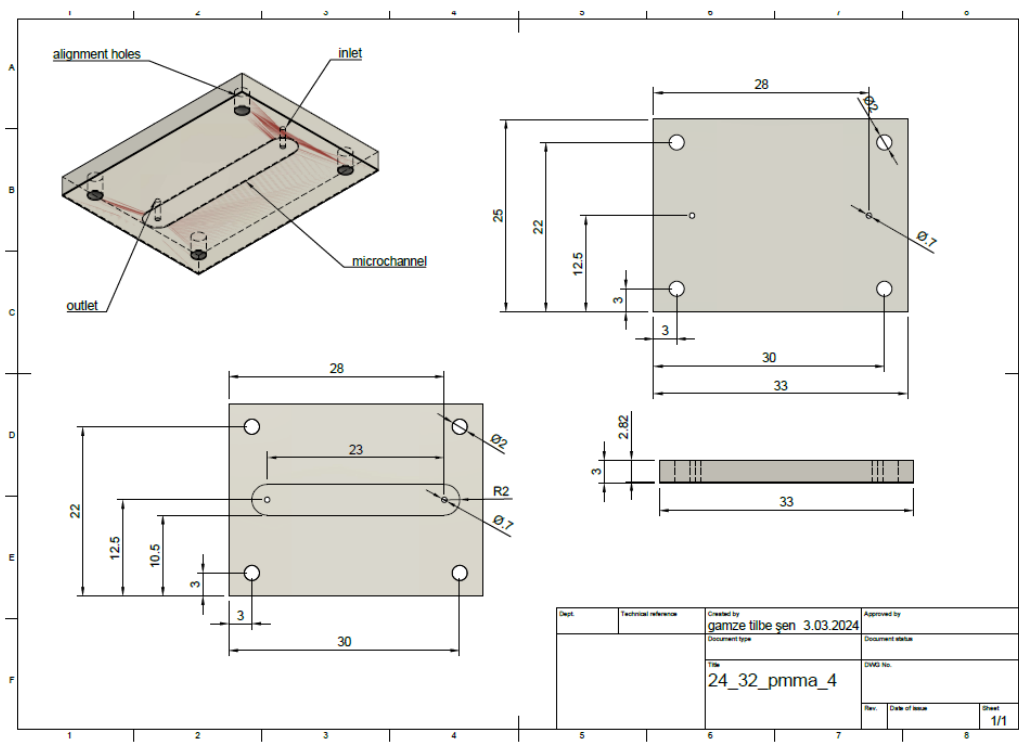


Şekil 3.4. 22 mm x 22 mm boyutlu tasarlanan çapraz kanala sahip mikroçip 15,84 µl hacme sahiptir.

Son olarak 24 mm x 32 mm boyutlarında farklı tasarımlar yapılmıştır. “U” şeklinde 4 mm ve 3 mm çaplı mikro kanallar oluşturulmuştur. Ayrıca düz mikrokanallar ile de istenilen hacimler elde edilebilmiştir. Mikrokanal hacimleri 10 µl ve üzeri olacak şekilde tasarımlar oluşturulmuştur (Şekil 3.5., Şekil 3.6.)

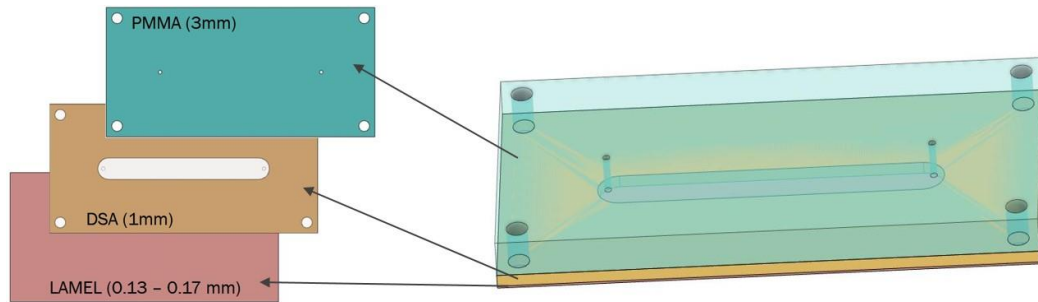


Şekil 3.5. 24 mm x 32 mm boyutlu tasarlanan u şekilli kanala sahip mikroçip 28,62 µl hacme sahiptir.

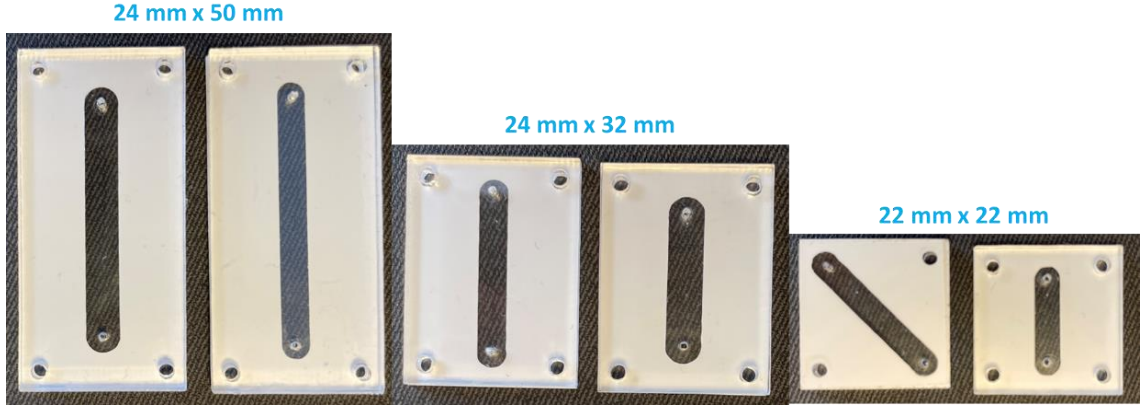


Şekil 3.6. 24 mm x 32 mm boyutlu tasarlanan kanala sahip mikroçip 16,56 µl hacme sahiptir.

Mikroçip bütün tasarımlar için üç katmandan oluşmaktadır. Bu katmanlar sırasıyla 0.65 mm çaplı örnek giriş – çıkış delikleri ve hizalama deliklerinin bulunduğu ve 3mm kalınlığa sahip PMMA üst katmanı, 10 µl ve üzeri hacme sahip reaksiyon kanalının ve hizalama deliklerinin bulunduğu 0.18 mm kalınlıkta DSA orta katmanı ve 0.13 – 0.17 arası kalınlıkta olabilen lamel alt katmanıdır (Şekil 3.7.). Üç boyutlu tasarım belirlendikten sonra, lazer kesici kullanılarak DSA ve PMMA tasarıma göre kesilmiş ve birleştirilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.7. Üç katmandan oluşan (üst PMMA, orta DSA, alt LAMEL) PCR mikroçip tasarımı.



Şekil 3.8. Lazer kesici kullanılarak kesilmiş DSA ve PMMA lamel ile birleştirildiğinde elde edilen mikroçipler.

Lazer kesim işlemi genellikle CAD tasarımındaki kesin boyutları vermemektedir çünkü lazer, polimeri ve DSA'yı yakarak şekillendirmektedir. Gerçek mikro boyutlar planlanandan farklı olabilmektedir. Bu nedenle boyutlar (mikroçip en ve boy) 1 mm fazla olacak şekilde CAD tasarımı yapılmıştır.

3.3.Mikro Sıcaklık Döngüleyici Tasarımı

Sıcaklık döngüleyici tasarımı, ısıtıcı-soğutucu elemanlar (Peltier eleman, kartuş ısıtıcı), fan, sıcaklık ölçümü için sıcaklık sensörü ve kontrol devresinden (mikrodenetleyici, H-köprüsü, röle) oluşmaktadır.

3.3.1. Peltier Elemanlar

Isıtma-soğutma işlemlerini gerçekleştirmek için Peltier eleman kullanılmıştır. Peltier elemanlar boyut, çalışma sıcaklığı, maksimum akım, maksimum voltaj ve fiyatları açısından değerlendirilmiştir. Mikroçipin peltier ile temasının tam olarak sağlanması ve peltier ile kanal arasında ısıyı kaybetmeden iletim sağlanması gerekmektedir. Bu nedenle peltier boyutu ve kalınlığı önemlidir. Beş adet peltier çalışılmak üzere seçilmiştir (Tablo 3.4.). Uygulamada kullanılacak olarak seçilmiş Peltier modülleri Laird Thermal Systems ve Marlow Industries tarafından üretilmiştir.

Tablo 3.4. Termal Peltier Modüllerine ait özellikler tablosu.

Peltier Ürün Numarası	Çalışma Sıcaklığı	Akım - Max	Voltaj - Max	Uzunluk X Genişlik	Yükseklik
ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6	150°C	5A	8.4V	40.00 mm L x 20.00mm W	3.61mm
ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6	175°C	3.8A	7.2V	43.20mm L x 20.60mm W	3.81mm
PCX7.5,13,F1,4023,TA,RT,W6	120°C	7.7A	15.3V	40.00mm L x 23.00mm W	2.80mm
RC12-8-01LS	130°C	7.4A	14.7V	44.70mm L x 40.13mm W	3.53mm
ETX8-12-F2-2525-TA-RT-W6	150°C	7.9A	16.6V	26.90mm L x 24.60mm W	1.96mm

3.3.2. Kartuş Isıtıcı

Bir kartuş ısıtıcı, ısıtma endüstrisinde kullanılan, genellikle amaçlanan uygulamasına bağlı olarak belirli bir watt yoğunluğuna göre özel olarak üretilmiş, tüp şeklinde Joule ısıtma elemanıdır. Bir kartuş ısıtıcı, dielektrikle çevrelenmiş ve metal bir kılıfla kaplanmış seramik bir çekirdeğin etrafına sarılan dirençli bobinden oluşmaktadır. Bobinden kılıfa aktarılan güçlendirilmiş ısı, kılıfın ısınmasına neden olmaktadır. Bu ısı daha sonra ısı gerektiren iç metal kısma aktarılmaktadır. Kartuş ısıtıcılar yarı iletkenler, sıvı ısıtma, 3B yazıcılar, yemek üretimi, kütle spektrometrisi, tıbbi cihazlar ve enjeksiyon kalıplama gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Kartuş ısıtıcılar düşük, orta ve yüksek watt yoğunluklarında çalışabilir. 760 °C'ye kadar çalışma sıcaklığına dayanacak şekilde tasarlanmıştır [154].

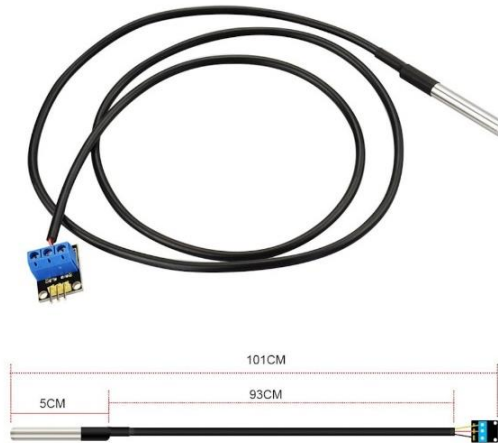
Bu çalışmada istenilen sıcaklıklara hızlı bir şekilde ulaşmak amacıyla 12V – 40 Wattlık silindirik ve dikdörtgen şeklinde kartuş ısıtıcılar ile denemeler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. 12V - 40W kartuş ısıtıcılar.

3.3.3. Sıcaklık Sensörü

Sıcaklık ölçümünün uygun sensörler aracılığıyla gerçekleştirilmesi planlanmış ve bu amaçla DS18B20 sıcaklık dedektör sensörü temin edilmiştir. DS18B20 sıcaklık sensörü, çıkış voltajı Celsius (Santigrat) sıcaklığı ile doğrusal orantılı olan hassas bir entegre devre sıcaklık sensörüdür. Bu nedenle DS18B20, °Kelvin cinsinden kalibre edilmiş doğrusal sıcaklık sensörlerine göre bir avantaja sahip olmaktadır. Çünkü kullanıcının uygun Santigrat ölçeklendirmesi elde etmek için çıkışından büyük bir sabit voltaj çıkarmasını gerektirmemektedir. DS18B20, dijital sinyal çıkışı veren ve yaygın olarak kullanılan bir dijital sıcaklık sensörüdür. Küçük boyut, düşük donanım maliyeti, güçlü anti-parazit yeteneği ve yüksek hassasiyet özelliklerine sahiptir. Sıcaklık algılama aralığı -55°C ve $+125^{\circ}\text{C}$ 'dir. $-10^{\circ}\text{C} \sim +85^{\circ}\text{C}$ aralığında, hassasiyeti $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'dir (Şekil 3.10.). Geleneksel termistörler ile karşılaştırıldığında, ölçülen sıcaklığı doğrudan okuyabilmekte ve basit programlama yoluyla 9-12 basamaklı dijital değer okumayı gerçekleştirebilmektedir. 9 bit ve 12 bit dijital büyüklükler sırasıyla 93,75 ms ve 750 ms içinde tamamlanabilmekte ve DS18B20'den okunan veya DS18B20'ye yazılan bilgiler, okumak ve yazmak için yalnızca bir bağlantı noktası hattına ihtiyaç duymaktadır. DS18B20, 9 ila 12 bit sıcaklık çözünürlüğü gerektiren tüm uygulamalar için önerilmektedir. DS18B20, negatif sıcaklık katsayılı (NTC) sıcaklık sensörlerinin bir örneğidir. Sensörün voltaj ve sıcaklığının doğrusal ölçeği $+10.0 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$ 'dir [147].



Şekil 3.10. DS18B20 Sıcaklık Sensörü.

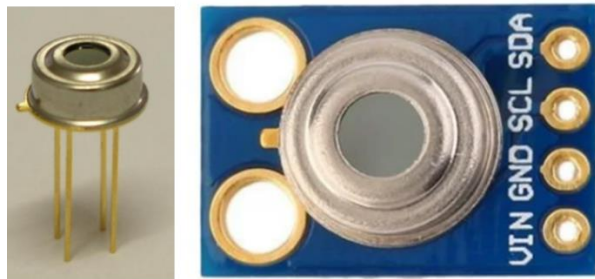
DS18B20 sıcaklık sensörüne ek olarak $10 \text{ k}\Omega$ negatif termistör katsayısı (NTC) halka sıcaklık sensörü temin edilmiştir. NTC termistörler, sıcaklık arttıkça dirençte azalma

gösteren elektronik bileşenlerdir. Halka şeklindeki montaj tırnağı sayesinde yüzeye güvenli montaj ve ısı algılama sağlamaktadır. Çalışma sıcaklığı aralıkları -40°C ila +150°C; -40°C ila +105°C arasındadır. Beta değeri 3950 K'dır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. 10 kΩ NTC halka sıcaklık sensörü.

Sıcaklık ölçümü yapılırken PCR işleminin gerçekleştiği kutunun içerisinden DS18B20 dijital sıcaklık sensörü ile ölçüm alınmıştır. Bunun yanında kutu dışından MLX90614, temassız sıcaklık sensörü ile de ölçüm yapılmıştır. MLX90614 kalibre edilmiş bir Kızılötesi termometredir. Sensör çıkışı I2C veya PWM olarak yapılandırılabilir. Bu modül sadece I2C (10kHz - 100kHz) bağlantısını desteklemektedir. MLX90614, -70°C - 382,2°C arasındaki belirli bir nesnenin sıcaklığını ve -40°C - 125°C ortam sıcaklığını, gözlem altındaki bir nesneyle fiziksel temas kurmadan ölçebilmektedir. Değerleri 0,14 °C çözünürlükle gösterebilen modüle 17 bitlik bir ADC yerleştirilmiştir. Bu sensör hem ortam sıcaklığını hem de nesne sıcaklığını 0,5°C hassasiyetle ölçebilmektedir. GY-906 MLX90614 sensörünün görüş alanı 90°'dir. Gerekli ölçüm mesafesi istenen görüş alanına göre belirlenmektedir. Bir nesnenin yüzey sıcaklığını ölçmek için genellikle yaklaşık 1 cm'lik bir ölçüm mesafesi kullanılmaktadır. MLX90614 ölçüm sırasında 2mA'den daha az güç tüketmektedir. Bu düşük güç tüketimi, pille çalışan cihazlarda uygulamaya olanak tanımaktadır (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. MLX90614 Kızılötesi temassız sıcaklık sensörü.

3.3.4. Mikrodenetleyici

Kontrol devresi için uygun bir mikrodenetleyicinin kullanılması planlanmıştır. Mikrodenetleyici olarak öncelikle Arduino UNO kartı kullanılmıştır (Şekil 3.13.). Arduino Uno, ATmega328P tabanlı bir mikrodenetleyici kartıdır. 14 dijital giriş/çıkış pini, 6 analog girişi, 16 MHz seramik rezonatörü (CSTCE16M0V53-R0), bir USB bağlantısı, bir güç girişi, bir ICSP başlığı ve bir sıfırlama düğmesi bulunmaktadır. USB kablusuyla bir bilgisayara bağlanabilmekte, AC-DC adaptörü veya pil ile çalıştırabilmektedir. Kart 6 ila 20 V'luk harici bir kaynak ile çalışabilmektedir. Bununla birlikte, 7V'den daha düşük bir güçle beslenirse, 5V'luk pin 5V'tan daha az güç sağlayabilmekte ve kart kararsız hale gelebilmektedir. 12V'den fazla kullanılıyorsa, voltaj regülatörü aşırı ısınabilir ve panele zarar verebilmektedir. Önerilen çalışma aralığı 7 ila 12 voltur. ATmega328, 32 KB hafızaya sahiptir. Ayrıca 2 KB SRAM ve 1 KB EEPROM içermektedir. Arduino Uno, Arduino Yazılımı (IDE) ile programlanabilmektedir.



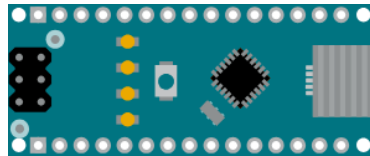
Şekil 3.13. Arduino UNO kartı.

Sıcaklık kontrolü için Arduino ile bir PID kontrolörü kullanmak, bir sensörden sıcaklık verilerini okuyan, PID algoritmasını kullanarak kontrol sinyalini hesaplayan ve hesaplanan çıktıya göre kontrol edilen bir elemanı (ısıtıcı gibi) ayarlayan kod yazmayı içermektedir. Arduino kullanarak sıcaklık kontrolü için bir PID kontrolörünün uygulanmasına dair bir taslağın adımları aşağıda verilmiştir:

1. Donanım Kurulumu: Sıcaklık sensörü, aktüatörü (örneğin, bir ısıtıcıyı kontrol eden bir röle modülü) Arduino üzerindeki uygun bir pine bağlamak.

2. Kütüphane Kurulumu: Sıcaklık sensörünüz için gerekli kütüphaneleri yüklemek. Örneğin, bu çalışmada DS18B20 kullanılmıştır, OneWire ve DallasTemperature kütüphaneleri yüklenmiştir.
3. PID Denetleyici Kodu: PID parametreleri (K_p , K_i , K_d) ve diğer parametreleri kurulumu ve gereksinimlere göre ayarlamak.
4. Kodun Yüklenmesi: Arduino IDE'ye kodu eklemek ve Arduino kartına yüklemek.
5. Kalibrasyon ve İnce Ayar: Sistemin davranışını izlemek ve istenen sıcaklık kontrol performansını elde etmek için PID parametrelerini ayarlamak. Bunu koddaki K_p , K_i ve K_d değerlerini değiştirerek yapmak.
6. Güvenlik Önlemleri: Aşırı ısınmayı veya diğer tehlikeli durumları önlemek için acil kapatma mekanizmaları eklemek gibi güvenlik önlemlerini dahil etmek.

Mikrodenetleyici olarak Arduino Nano kartı daha sonraki uygulamalarda boyutu nedeniyle kullanılmıştır (Şekil 3.14.). Nano serisinin ilk gömülü mikrodenetleyicisi olan Arduino Nano, küçük uygulamalara yöneliktir ve sınırlı sayıda fonksiyona sahiptir. Nano, Arduino tarafından üretilen en küçük kart olup 45 mm uzunluğunda ve 18 mm genişliğindedir. Sadece 7 gram ağırlığındadır. Arduino Nano, ATmega328 tabanlı bir mikrodenetleyici kartıdır. 20 dijital giriş/çıkış pini, 8 analog giriş, 6 PWM girişi, 16 MHz seramik rezonatör, mini USB bağlantı noktası vardır. Kart 6 ila 20 V arası harici bir kaynakla çalışabilir. Ancak 7V'tan daha düşük bir voltajla beslenirse 5V pini 5V'tan daha az güç sağlayabilir ve kart kararsız hale gelebilir. 12V'tan fazla kullanılması durumunda voltaj regülatörü aşırı ısınıp panele zarar verebilir. Önerilen çalışma aralığı 7 ila 12 V'tur. ATmega328'in 32 KB belleği vardır. Ayrıca 2 KB SRAM ve 1 KB EEPROM içerir. Arduino Nano, Arduino Yazılımı (IDE), Arduino CLI ve Web Editor ile programlanabilir.



Şekil 3.14. Arduino Nano Kartı.

Aşağıda Arduino UNO ve Arduino Nano kartlarının özelliklerine ait tablo verilmiştir (Tablo 3.5.). Arduino UNO ve Nano ve kartlarının en temel farkı boyut ve ağırlıklarıdır. Bunlar dışındaki özellikleri benzer veya aynı olduğu için sıcaklık döngüleyici algoritması ve çalışmasını etkilememiştir.

Tablo 3.5. Arduino UNO ve Arduino Nano kartları özellikleri karşılaştırma tablosu.

	Arduino UNO R3	Arduino Nano
Mikrodenetleyici	ATMEGA328P	ATMEGA328
Çalışma Voltajı	5V	5 V
Giriş Voltajı (önerilen)	7-12V	7-12V
Dijital I/O Pinleri	14 (6 tanesi PWM çıkışı)	22 (6 tanesi PWM çıkışı)
PWM Dijital I/O Pinleri	6	6
Analog Giriş Pinleri	6	8
DC Akım her I/O Pin için	20 mA	20 mA
Flash Bellek	32 KB - 0.5 KB bootloader tarafından kullanılır	32 KB - 2 KB bootloader tarafından kullanılır
SRAM	2 KB	2 KB
EEPROM	1 KB	1 KB
Clock Speed	16 MHz	16 MHz
LED_BUILTIN	13	13
Uzunluk	68.6 mm	45 mm
Genişlik	53.4 mm	18 mm
Ağırlık	25 g	7 g

3.3.5. Fan

Hızlı soğutma işlemini gerçekleştirebilmek için sıvı soğutmalı fan kullanılmış ve soğutma verimliliği arttırılacağı düşünülmüştür. Bunu sağlamak için Rampage Helios C1 Serisi Sıvı Soğutma Sistemi tercih edilmiştir. Termal bileşimli bakır levhası daha verimli ısı transferi ve daha iyi termal iletkenliğe sahip bir eleman olmasını sağlamaktadır. Pompa ünitesi fazla yer kaplamamaktadır ve yüksek hızda sirkülasyon sağlayabilmektedir (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. Rampage Helios C1 teknik özellikleri.

Rampage Helios C1 Serisi Sıvı Soğutma Sistemi

<i>Radyatör boyutları</i>	154 mm x 120 mm x 27 mm
<i>Fan boyutları</i>	120 mm x 120 mm x 25 mm
<i>Pompa boyutları</i>	75 mm x 75 mm x 55 mm
<i>Fan hızı</i>	1800 RPM +/- 10%
<i>Fan hava akış gücü</i>	68 CFM
<i>Fan basıncı</i>	2,3 mm H ₂ O
<i>Fan ses seviyesi</i>	23 dB (A)

Sıvı soğutmalı fana ek olarak salyangoz veya santrifüjlü fan istenilen belirli bir noktayı veya bölgeyi havalandırmak için kullanılması amacıyla tercih edilmiştir. Santrifüjlü bir fan, havayı iten bir motor veya pompadır ve havayı üfleyicinin içinde hareket ettirerek ve 90 derecelik bir açıyla dışarı itmektedir. Fan havayı hareket ettiren elektrikli bir cihaz iken, üfleyici bir fandan oluşan santrifüjlü sistem, havayı fandan yönlendirerek belirli bir noktaya gönderen mekanik bir cihazdır [155]. Salyangoz üfleyici sayesinde mikroçip kutusunda oluşan sıcak hava dışarı atılmıştır. Tercih edilen 12V salyangoz üfleyici Şekil 3.15.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. 12V Salyangoz üfleyici.

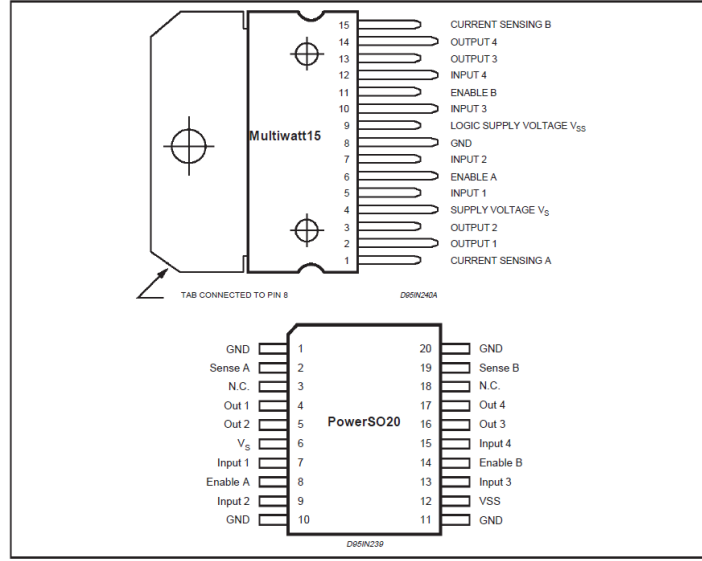
3.3.6. H-Köprüsü

- L298N:

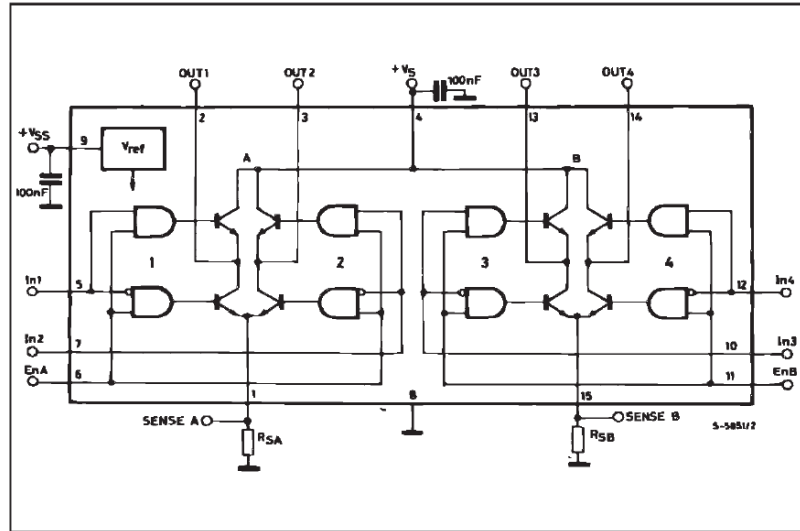
L298, entegre monolitik devredir. Standart TTL mantık seviyelerini kabul etmek ve röleler, solenoidler, DC ve kademeli motorlar gibi endüktif yükleri sürmek için tasarlanmış yüksek voltajlı, yüksek akımlı dual (çift) tam köprü sürücüsüdür (Şekil 3.16., Şekil 3.17.). L298 H-Köprüsüne ait pin fonksiyonları Tablo 3.7.'de verilmiştir.

Genel Özellikler

- 46 V'a Kadar Çalışma Besleme Gerilimi
- 4 A'e Kadar Toplam DC Akım.
- Düşük Satürasyon Gerilimi.
- Aşırı Sıcaklık Koruması
- 1,5 V'a Kadar Mantık "0" Giriş Gerilimi (Yüksek Gürültü Bağışıklığı) [156].



Şekil 3.16. L298 pin bağlantıları.

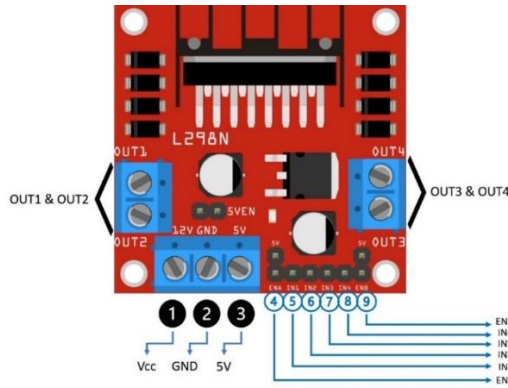


Şekil 3.17. L298 Blok Diyagramı.

Tablo 3.7. L298N Pin Fonksiyonları (blok diyagrama göre).

İSİM	FONKSİYON
Sense A; Sense B	Bu pin ile toprak arasına, yükün akımını kontrol etmek için algılama direnci bağlanır.
Out 1; Out 2	A Köprüsünün Çıktıları; Bu iki pin arasına bağlanan yükten geçen akım pin 1'de izlenir.
VS	Güç Çıkış Aşamaları için Besleme Voltajı. Bu pin ile toprak arasına endüktif olmayan bir 100nF kapasitör bağlanmalıdır.
Input 1; Input 2	A Köprüsünün TTL Uyumlu Girişleri.
Enable A; Enable B	TTL Uyumlu Enable Giriş: L durumu, A köprüsünü (enable A) ve / veya B köprüsünü (enable B) devre dışı bırakır.
GND	Toprak.
VSS	Mantık Blokları için Besleme Voltajı. Bu pin ile toprak arasına bir 100nF kapasitör bağlanmalıdır.
Input 3; Input 4	B Köprüsünün TTL Uyumlu Girişleri.
Out 3; Out 4	B Köprüsünün Çıktıları; Bu iki pin arasına bağlanan yükten geçen akım pin 15'de izlenir.
N.C.	Not Connected (Bağlı değil)

L298N Entegresi H-Köprü devresi ve soğutucudan oluşmaktadır. İki adet ikili konektör motor kontrolü için, bir adet üçlü konektör ise güç kontrolü için kullanılmaktadır (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. L298N Kart Pinleri İşlevleri.

L298N, aynı anda iki DC motorun hız ve yön kontrolüne izin veren çift H-Köprü motor sürücüsüdür. Modül, 5 ile 35V arasında voltajlara ve 2A'ya kadar tepe akımına sahip DC motorları sürebilmektedir. Modül üzerinde L298 motor sürücü entegresi kullanılmıştır. Modül bir soket kullanılarak etkinleştirilen veya devre dışı bırakılabilen yerleşik 5V regülatöre sahiptir (7805). Motor besleme voltajı en yüksek 12V'a kadar kullanıldığında 5V regülatör etkinleşmekte ve bu durumda 5V pinin örneğin Arduino kartına güç sağlamak için çıkış olarak kullanılabilmesini sağlamaktadır. 5V'luk regülatör nedeniyle 7V altında voltaj uygulandığında 5V çıkışı kullanılamamaktadır. Ancak motor voltajı 12V'dan büyük ise soket bağlantısı kesilmelidir. Yüksek voltajlar yerleşik 5V regülatörde hasara neden olmaktadır. Bu durumda IC'nin (entegre devre) düzgün çalışması için 5V pin giriş olarak kullanılmalı ve 5V'luk bir güç kaynağına bağlanmalıdır. Ayrıca IC'nin yaklaşık ~2V'luk bir voltaj düşüşü yaptığı bilinmelidir. Örneğin 12V güç kaynağı kullanılıyorsa, motor terminallerindeki voltaj ~10V olmaktadır. Bu durumda 12V DC motor kullanılıyorsa maksimum hız alınamayacaktır.

Enable A ve Enable B pinleri, motorun hızını etkinleştirmek ve kontrol etmek için kullanılmaktadır. Bu pin üzerinde bir soket varsa, motor devreye girecek ve maksimum hızda çalışacaktır, enable pinleri 5V ile birbirine bağlanmış demektir. Soket çıkartıldığında bu pine bir PWM girişi bağlanabilmekte ve bu şekilde motor hızı kontrol edilebilmektedir. Bu pin toprağa bağlandığında ise motor devre dışı kalmaktadır.

Giriş 1 (IN1) ve Giriş 2 (IN2) pinleri A köprüsünün/motorunun dönüş yönünü kontrol etmek için kullanılmakta ve B köprüsünün/motorunun dönüş yönü için ise Giriş 3 (IN3) ve Giriş 4 (IN4) kullanılmaktadır. Bu pinler kullanıldığında aslında L298N IC içindeki H-Köprüsü anahtarları kontrol edilmektedir. Giriş 1 "DÜŞÜK" (LOW) ve giriş 2 "YÜKSEK" (HIGH) olduğunda, motor ileri hareket etmekte, Giriş 1 "YÜKSEK" ve Giriş 2 "DÜŞÜK" olduğunda ise motor geri hareket etmektedir. Her iki girişin aynı olması durumunda da (DÜŞÜK veya YÜKSEK) motor durmaktadır (Tablo 3.8.). Aynı durum Giriş 3 - 4 ve B köprüsü için de geçerli olacaktır (Tablo 3.9.).

Tablo 3.8. Motor A Doğruluk Tablosu.

ENA	IN1	IN2	TANIM
0	X	X	MOTOR A KAPALI
1	0	0	MOTOR A DURUR
1	0	1	MOTOR A AÇIK, GERİ HAREKET
1	1	0	MOTOR A AÇIK, İLERİ HAREKET
1	1	1	MOTOR A DURUR

Tablo 3.9. Motor B Doğruluk Tablosu.

ENB	IN3	IN4	TANIM
0	X	X	MOTOR B KAPALI
1	0	0	MOTOR B DURUR
1	0	1	MOTOR B AÇIK, GERİ HAREKET
1	1	0	MOTOR B AÇIK, İLERİ HAREKET
1	1	1	MOTOR B DURUR

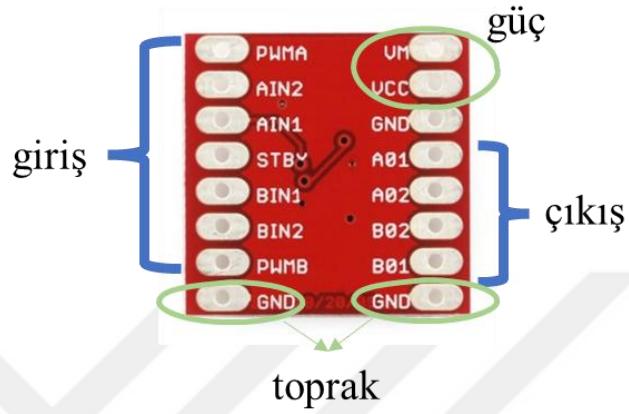
- TB6612FNG:

TB6612FNG Toshiba firması tarafından üretilmiş, büyük akım MOSFET - H köprü yapısına sahip DC motorlar için sürücü entegre devredir (Şekil 3.19.). İki giriş sinyali ile saat yönü (CW), saat yönü tersi (CCW), kısa fren ve durma modu gibi dört moddan biri seçilebilmektedir. Sonuç olarak iki bağımsız DC motoru aynı anda veya bir adet bipolar step motoru çalıştırabilmektedir. PWM, 100 kHz'e kadar frekansı desteklemektedir. Geleneksel sürücü modülleriyle karşılaştırıldığında, MOSFET-H köprü yapısından oluşan sürücü modülü, uygun fiyat, küçük boyut ve iyi ısı tüketimi performansı gibi avantajlara sahiptir.

Genel Özellikler

- Güç kaynağı voltajı; $V_M = 4.5V - 13.5V$ (Maks)
- Çıkış akımı; $I_{OUT}=1.2 A$ (orta) / $3.2 A$ (tepe)

- Bekleme (Güç tasarrufu) sistemi
- Sağa / sola / kısa fren / durdurma fonksiyon modları
- Dahili termal kapatma devresi ve düşük voltaj algılama devresi
- Küçük paket (SSOP24: 0,65 mm kablo aralığı)



Şekil 3.19. TB6612FNG Modüle Genel Bakış.

TB6612FNG modülünde temel olarak üç tip pin bulunmaktadır: güç, giriş ve çıkış. Her pin ve işlevi aşağıdaki tabloda ele alınmıştır (Tablo 3.10.).

Tablo 3.10. TB6612FNG Pin Fonksiyonları ve Açıklamaları.

Pin Etiketi	Fonksiyon	Güç / Giriş / Çıkış	Açıklama
V _M	Motor Voltajı	Güç	Motorlara güç sağlanan pin (2,2V - 13,5V)
V _{CC}	Lojik Voltaj	Güç	Çipe güç sağlamak ve mikrodenetleyiciyle iletişim için kullanılan pin (2,7V - 5,5V)
GND	Toprak	Güç	Hem motor voltajı hem de lojik voltajı için ortak toprak (tüm GND pinleri bağlanmıştır)
STBY	Standby	Giriş	H-köprüleri STBY pini YÜKSEK/HIGH olduğunda çalışır (bir pull-down direnci vardır, bu nedenle aktif olarak HIGH yapılmalıdır)
AIN1/BIN1	A/B kanalları için Giriş 1	Giriş	Yönü belirleyen iki girişten biri.
AIN2/BIN2	A/B kanalları için Giriş 2	Giriş	Yönü belirleyen iki girişten biri.
PWMA/PWMB	A/B kanalları için PWM girişi	Giriş	Hızı kontrol eden PWM girişi
A01/B01	A/B kanalları için Çıkış 1	Çıkış	Motoru bağlamak için kullanılan iki çıkıştan biri.
A02/B02	A/B kanalları için Çıkış 2	Çıkış	Motoru bağlamak için kullanılan iki çıkıştan biri.

Çıkışlar Yüksek/Düşük (H/L) olarak ayarlandığında motor çalışmaktadır. Düşük/Yüksek olarak ayarlandığında ise motor ters yönde çalışmaktadır. Her iki durumda da hız, PWM girişi tarafından kontrol edilmektedir (Tablo 3.11.).

Tablo 3.11. T6612FNG Kontrol Fonksiyonları.

GİRİŞ				ÇIKIŞ		
IN1	IN2	PWM	STBY	OUT1	OUT2	MOD
H	H	H/L	H	L	L	Kısa Fren
L	H	H	H	L	H	CCW
L	H	L	H	L	L	Kısa Fren
H	L	H	H	H	L	CW
H	L	L	H	L	L	Kısa Fren
L	L	H	H	OFF	OFF	Dur
H/L	H/L	H/L	L	OFF	OFF	Standby

TB6612FNG ve L298N H-Köprülerinin Karşılaştırılması:

TB6612FNG H-köprüsü L298N'nin ısı tüketimi ve diyot devresi ile karşılaştırıldığında, ek soğutucuya ihtiyaç duymaz, bu nedenle çevresel devresi basittir. Ayrıca TB6612FNG, L298N gibi BJT H-Köprülerine göre motorların daha fazla akım çekmesine izin vermektedir. Tipik bir BJT “Açık” olduğunda ~0.7 V’luk bir voltaj düşüşüne sahip olmaktadır. H-köprüsü akımın iki adet BJT’den geçmesini gerektirdiğinden toplam voltaj düşüşü 1.4 V olmaktadır. Kaybedilen voltajdan gelen enerji ise ısı olarak dağılmaktadır. Sonuç olarak BJT tabanlı çoğu H-Köprüsü soğutucu gerektirmektedir. Bu durumun aksine MOSFET ile sabit bir voltaj düşüşü gerçekleşmemektedir. MOSFET “Açık” olduğunda çok küçük bir dirence sahiptir. Sonuç son derece düşük, neredeyse ihmal edilebilir bir voltaj düşüşü olmaktadır. Bu durum güç kaynağından gelen neredeyse tüm voltajın motora iletildiği anlamına gelmektedir. Çok az voltaj düşüşü ile dağılan çok az ısı olmaktadır.

Yeterlik, güvenlik, çalışma gerilimi, çalışma akımı, yükleme performansı gibi faktörlerin yanı sıra ısı performansı, devre tasarımı ve çipin hacmi de modülleri seçerken kullanılmakta olan parametrelerdir. Tablo 3.12.’de bu çalışmada kullanılmış iki farklı H-köprüsünün özelliklerinin karşılaştırılması görülmektedir. Isı performansı sıralaması

L298N<TB6612FNG'dir. Soğutucu L298N için gerekmektedir. TB6612 modülleri, L298N'lerden çok daha küçüktür. L298N, TB6612FNG'den daha ucuzdur.

Tablo 3.12. TB6612FNG ile L298N H-Köprü Karşılaştırılması.

TB6612FNG	L298N
Motor Voltajı: 2.5V-13.5Vdc	Motor Voltajı: 4.5V-46Vdc
Kanal başına 1.2 A akım	Kanal başına 2 A akım
3.2 A tepe akımı	3 A tepe akımı
Küçük modül, soğutucu bulunmaz.	Büyük modül, soğutucu bulunur.
Verim %91-95	Verim %40-70
Voltaj düşüşü 0.05-0.13 Vdc	Voltaj düşüşü 1.4 Vdc
Düşük akım bekleme modu	Bekleme modu bulunmaz

- BTS7960:

BTS7960, motor sürücü uygulamaları için entegre yüksek akım yarım köprüsüdür. Tek bir entegre bir p-kanallı yüksek taraf MOSFET ve bir n-kanallı düşük taraf MOSFET içermektedir. P-kanallı yüksek taraf anahtarı sayesinde bir şarj pompasına olan ihtiyaç ortadan kalkmaktadır. Mantık seviyesi girişleri, akım algılama ile teşhis, dönüş hızı ayarı, etkin olmayan zaman oluşturma ve aşırı sıcaklık, aşırı gerilim, düşük gerilim, aşırı akım ve kısa devreye karşı koruma özelliklerine sahip entegre sürücü devresi bir mikrodenetleyiciye arayüz oluşturmayı kolaylaştırmaktadır. Ayrıca BTS7960, yüksek akımlı PWM motor sürücüleri için maliyeti optimize edilmiş bir çözüm sağlamaktadır (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20. BTS7960 Modüle Genel Bakış.

Genel Özellikler:

- Giriş Voltajı: 6 ~ 27Vdc.
- Sürücü: Çift BTS7960 H Köprü Yapılandırması.
- Tepe akımı: 43 A.
- 25 kHz'e kadar PWM kapasitesi.
- Kontrol Giriş Seviyesi: 3,3~5V.
- Kontrol Modu: PWM veya seviye
- Çalışma Görev Döngüsü: %0 ~100.
- Aşırı Gerilim Kilitleme
- Düşük voltaj Kapatma
- Kart Boyutu (U x G x Y): 50 mm x 50 mm x 43 mm.
- Ağırlık: ~66 gr.

Bu modül, DC motorları PWM tekniğini kullanarak kontrol etmeyi sağlamaktadır. Ayrıca, motor için sabit bir giriş gerilimini değişken bir gerilime dönüştürmektedir. DC motor voltajı değiştirilerek hız kontrol edilebilmektedir. Modüle ait kontrol pin fonksiyonları Tablo 3.13.'de verilmiştir.

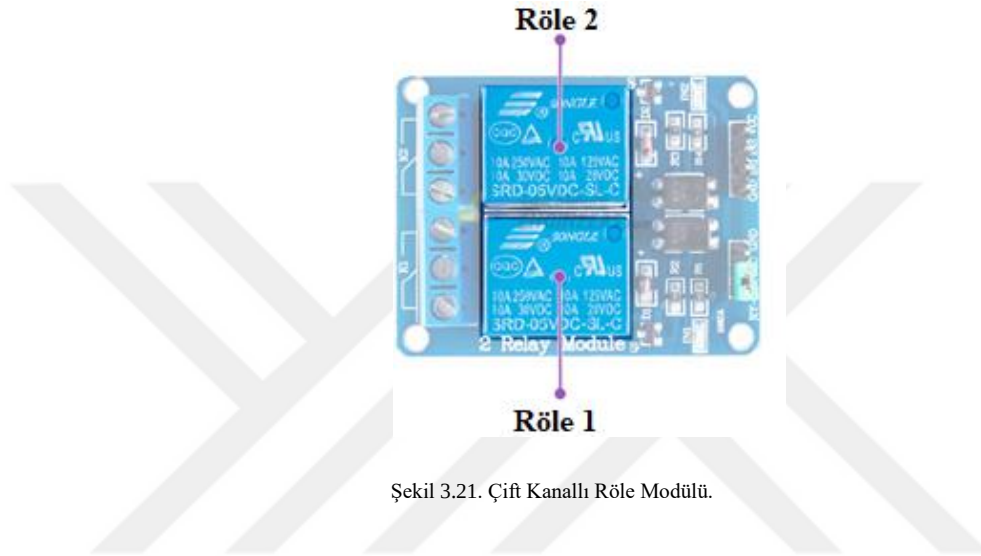
Tablo 3.13. BTS7960 Kontrol Pin Fonksiyonları ve Açıklamaları.

Pin Numarası	Fonksiyon	Tanım
1	RPWM	Giriş PWM İleri Seviye, Aktif Yüksek
2	LPWM	Giriş PWM Ters Seviye, Aktif Yüksek
3	R_EN	Giriş Sürücüyü Etkinleştir, Aktif Yüksek
4	L_EN	Giriş Ters Sürücüyü Etkinleştir, Aktif Yüksek
5	R_IS	İleri Sürüş, Yan akım alarm çıkışı
6	L_IS	Ters Sürüş, Yan akım alarm çıkışı
7	Vcc	+5 V Güç Kaynağı Mikrodenetleyici
8	GND	Gnd Güç Kaynağı Mikrodenetleyici

3.3.7. Röle

Çalışmada uygulamaya göre 1 veya 2 kanallı 5V ve 12V röle modülü kullanılmıştır (Şekil 3.21.). Kullanılan röle modülü kontrol edilen cihaza bağlanan üçü yüksek voltaj

terminalleri (NC, COM ve NO) olan beş pine sahiptir. Cihazın normalde açık veya kapalı kalması gerektiğine bağlı olarak, cihaz modülün COM (ortak) terminali ile NC (normalde kapalı) veya NO (normalde açık) terminali arasına bağlanmaktadır. Kalan iki pin arasında elektromıknatıs görevi gören bir bobin bulunmaktadır. Çift kanallı röle modülü, röleleri mikrodnetleyici tarafından desteklenen bir projeye entegre etmeyi kolaylaştırmak için anahtarlama röleleri ve ilgili sürücü devresini içermektedir.

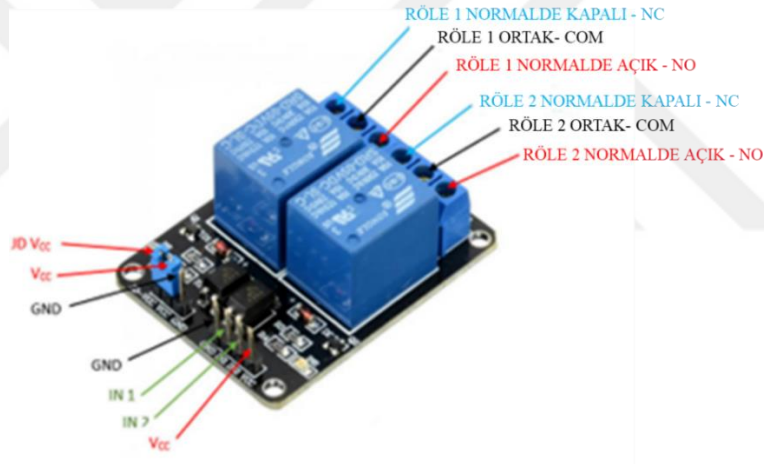


Şekil 3.21. Çift Kanallı Röle Modülü.

İki kanallı röle modülü, mikrodnetleyiciyi iki yüksek güçlü cihazı kontrol etmesine izin vermek için tasarlanmıştır. Her bir kanal 250V_{AC} veya 30V_{DC}'de maksimum 10A akım derecesine sahip iki röle içermektedir. Modülün bir tarafında röleyi kontrol etmek için IN1 ve IN2 olmak üzere iki adet giriş pini bulunmaktadır. Bu pinler 5V lojik uyumludur. Bu durumda Arduino gibi bir mikrodnetleyici yoluyla herhangi bir dijital çıkış pini ile röle sürülebilmektedir. Rölenin diğer tarafında bulunan yüksek gerilim terminallerine (NC, COM ve NO) kontrol etmek istenilen cihaz bağlanmaktadır. Ayrıca röle modülünde, rölenin durumunu gösteren iki LED bulunmaktadır. Bir röle etkinleştirildiğinde ilgili LED yanmaktadır. Modül 5V ile çalışır ve her iki röle de etkinleştirildiğinde, her biri 70 mA olmak üzere, yaklaşık 140 mA çekmektedir. Jumper kablosu çıkartıldığında ise, röle modülü fiziksel olarak mikrodnetleyiciden izole edilmektedir. Ancak bu durumda JD-V_{CC} ve GND'ye ayrı bir 5V güç kaynağı voltajı sağlanması gerekmektedir. Çift kanallı röle modülü bağlantıları Tablo 3.14. ve Şekil 3.22.'de verilmiştir.

Tablo 3.14. Çift Kanallı Röle Modülü Bağlantıları.

Pin No	Pin Adı	Açıklama
1	JD-V _{CC}	Röle bobinleri için izole edilmiş güç kaynağı girişi
2	V _{CC}	Röle bobinlerine doğrudan güç sağlamak için giriş
3	GND	Giriş toprak hattı
4	GND	Giriş Toprak hattı
5	IN1	Birinci röleyi etkinleştirmek için giriş
6	IN2	İkinci röleyi etkinleştirmek için giriş
7	V _{CC}	Optokuplörler, bobin sürücülerine ve ilgili devrelere güç sağlamak için V _{CC}



Şekil 3.22. Çift kanallı röle modülü bağlantıları.

3.3.8. Bluetooth Modülü

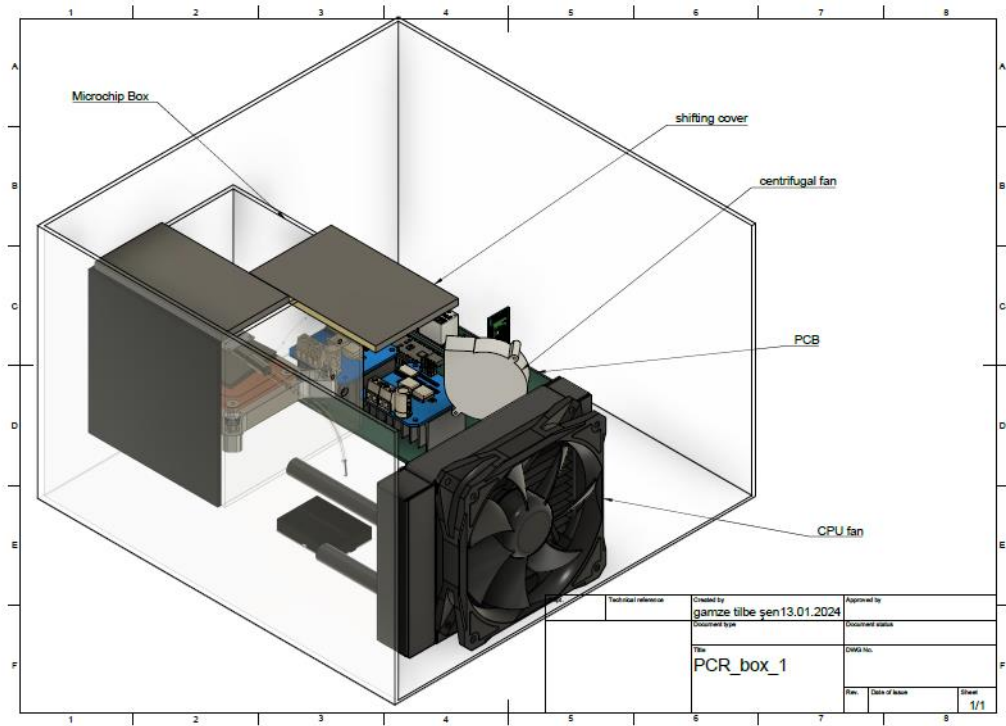
HC-06 Bluetooth Modülü, kablosuz iletişim sağlayan ve kablosuz iletişim için Bluetooth protokolünü kullanan kablosuz iletişim modülüdür. Bu modül Bluetooth 2.0'ı desteklemekte ve 2,4 GHz frekansında iletişim kurarak 10 metreye kadar iletişim mesafesi sağlamaktadır. Düşük voltajda (3.1V ~ 4.2V) çalışabilmektedir. Eşleştirmedeki akım 30 ~ 40 mA aralığında iken, iletişimdeki akım 8 mA'dir. 27 mm × 13 mm × 2 mm boyutundadır.

3.4.Mikro Sıcaklık Döngüleyici Kutu Tasarımı

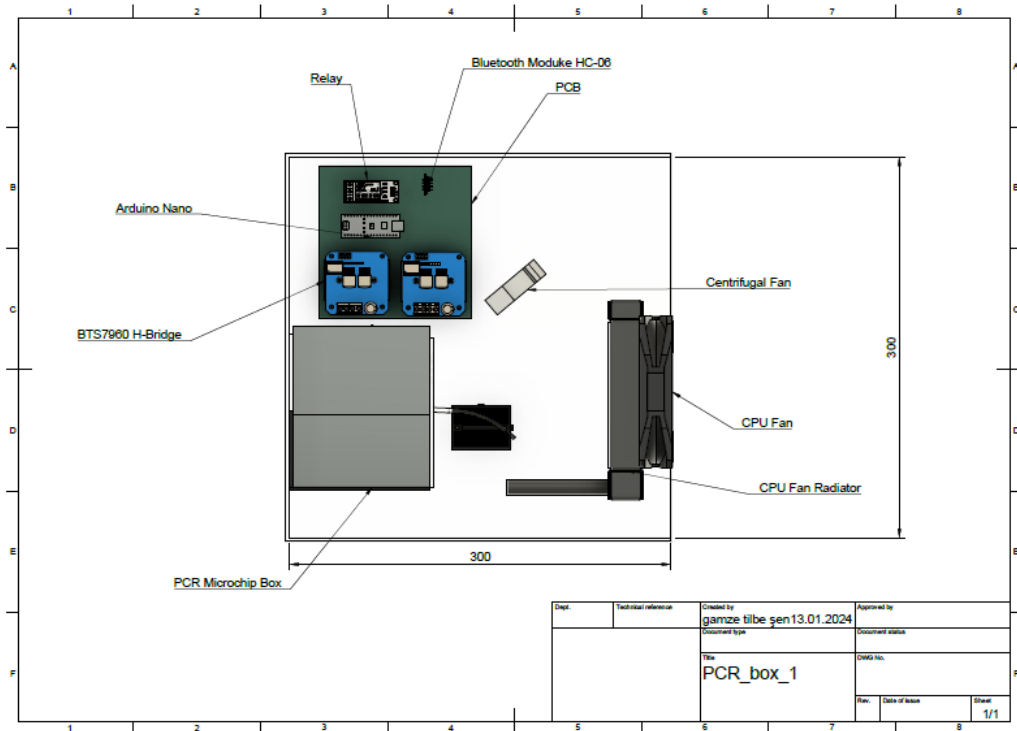
Kutu tasarımı yapılırken Peltier elemanın ısınan tarafını soğutmak için ilk denemelerde sıvı soğutmalı fan peltier yüzeyine temas edecek şekilde kullanılmıştır. Kullanılacak sıvı soğutmalı fanın veya kullanıma göre heat sink ve fanın soğuk yüzeye temas etmesi gerekmektedir. Eğer temas etmezse Peltier belli bir sıcaklığı aşacak ve PCR döngüsünde bozulmalara yol açacaktır. Bu şekilde olumsuz bir durumun ortaya çıkmaması için Peltier eleman ve fanın en ideal şartlarda çalışmasını sağlayacak bir devre ve sistem tasarlanmıştır. Devre elemanları Arduino Nano, H-köprüsü, sıcaklık sensörü ve Peltier elemandır. Kutu boyutu ilk denemeler için 300 mm x 300 mm x 150 mm olarak tasarlanmıştır, daha sonra tasarım değiştirilmiştir (Şekil 3.23.).

Kutu tasarımında PCR çipinin bulunacağı bölüm, kutu içerisinde ve kapaklı ayrı bir bölüm olarak tasarlanmıştır. Tek kullanımlık PCR çipine kapaklı bölüm ile kolaylıkla ulaşılabilmekte, PCR çipi kapaklı bölüme yerleştirilip işlem sonunda çıkartılabilmektedir. Ayrıca küçük hacim sayesinde istenilen sıcaklıklara ulaşmak daha kolay sağlanabilmektedir (Şekil 3.24., Şekil 3.25.). PCR döngüsü ile ilgili değişen sıcaklıklar, döngü sayısı, işlemin başladığı ve bittiği tasarıma eklenecek bluetooth modül sayesinde Android bir cihazda görülebilmektedir.

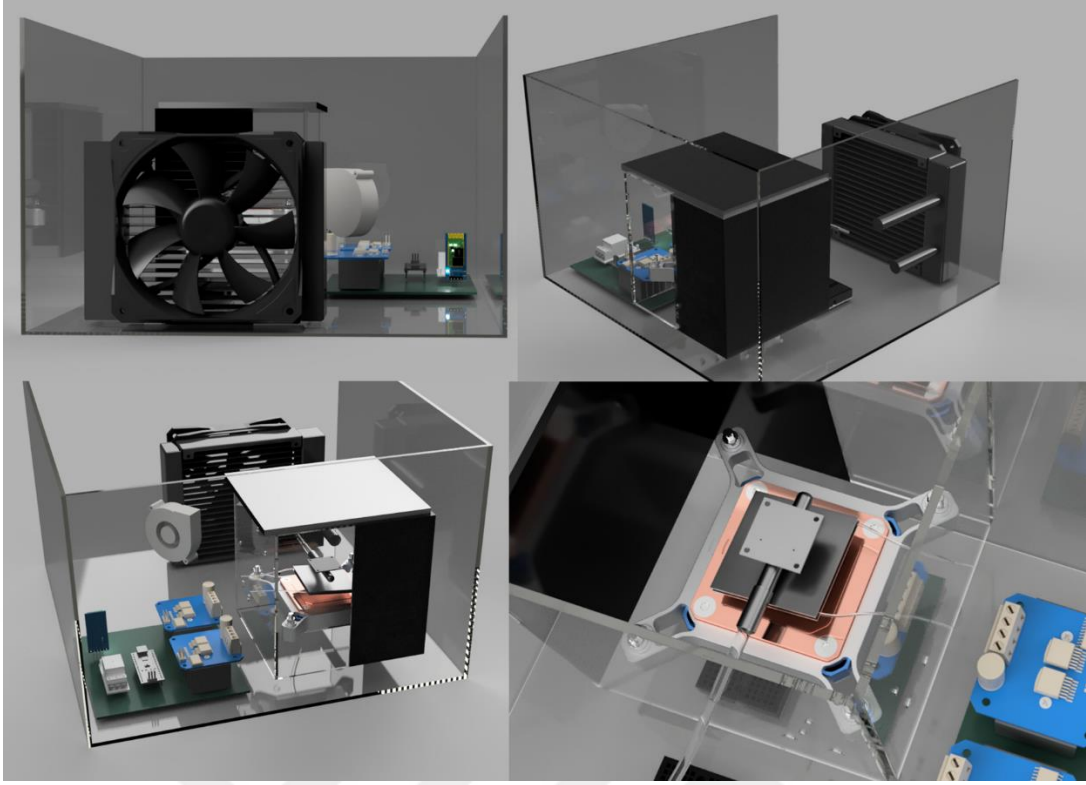
Kutu malzemesi olarak PMMA ve Alüminyum (Al) kompozit levha tercih edilmiştir. PMMA levhalar yan duvarları oluştururken, Al kompozit levhalar ile alt ve üst tabanlar oluşturulmuş, çipin bulunacağı bölüm malzemesi olarak da bu Al levhalar kullanılmıştır.



Şekil 3.23. Sıcaklık Döngüleyici Kutu Tasarımı.

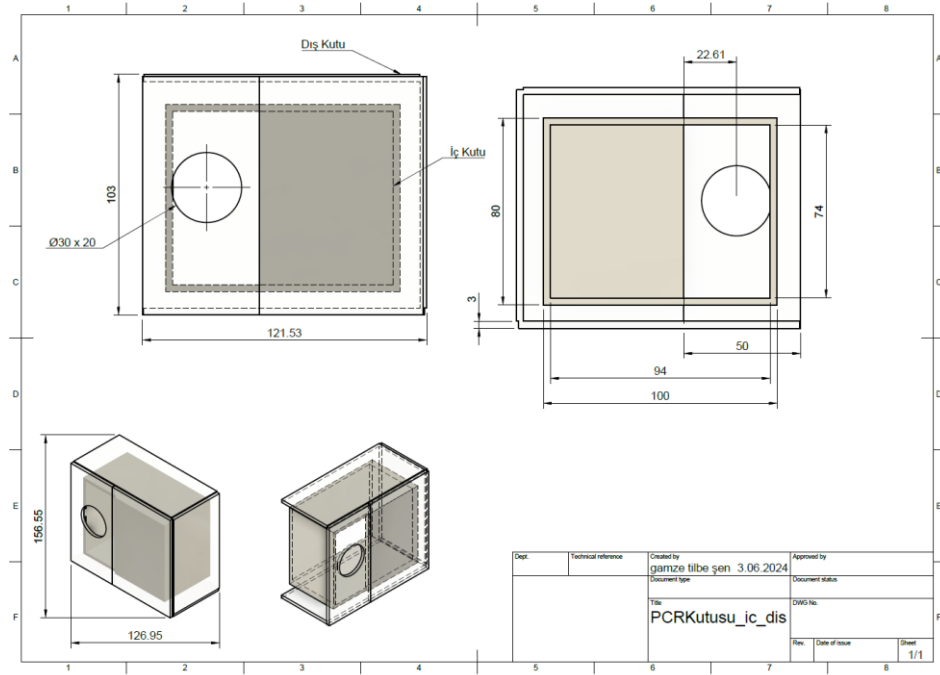


Şekil 3.24. Sıcaklık Döngüleyici Kutusu Devre Elamanları ve Kapaklı Mikroçip Kutusu Üstten Görünüm.

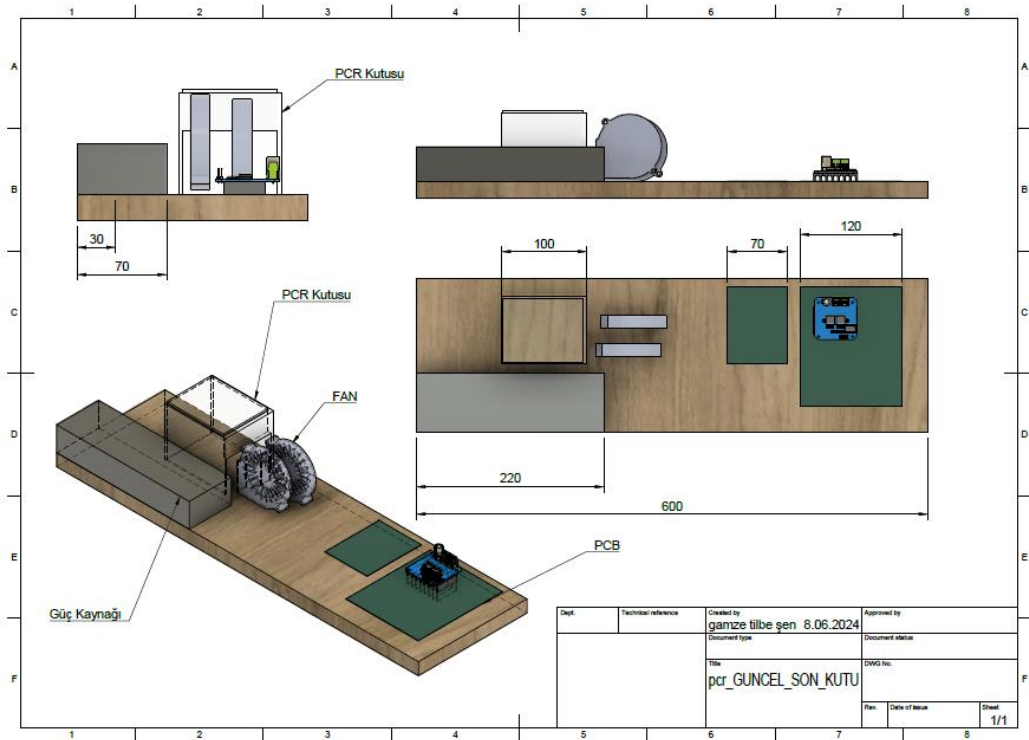


Şekil 3.25. PCR mikroçip Kutusu Tasarımı.

CPU fan kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde gen başarılı bir şekilde amplifiye edilemediği için tasarım değiştirilmiştir. PCR işleminin gerçekleşeceği, ince cidarlı amplifikasyon tüplerinin koyulacağı PCR kutusu iki katmanlı olarak tasarlanmıştır (Şekil 3.26.). Dış kutunun boyutu 100 mm x 80 mm, iç kutunun boyutu ise 94 mm x 74 mm'dir. İç ve dış kutu malzemesi PMMA ve kalınlığı 3 mm'dir. Kontrol devresi ve güç kaynağı bu kutunun dışına yerleştirilmiştir. Tasarımın son hali Şekil 3.27.'de verilmiştir.



Şekil 3.26. İç ve Dış katmanlardan oluşan PCR Kutusu tasarımı.



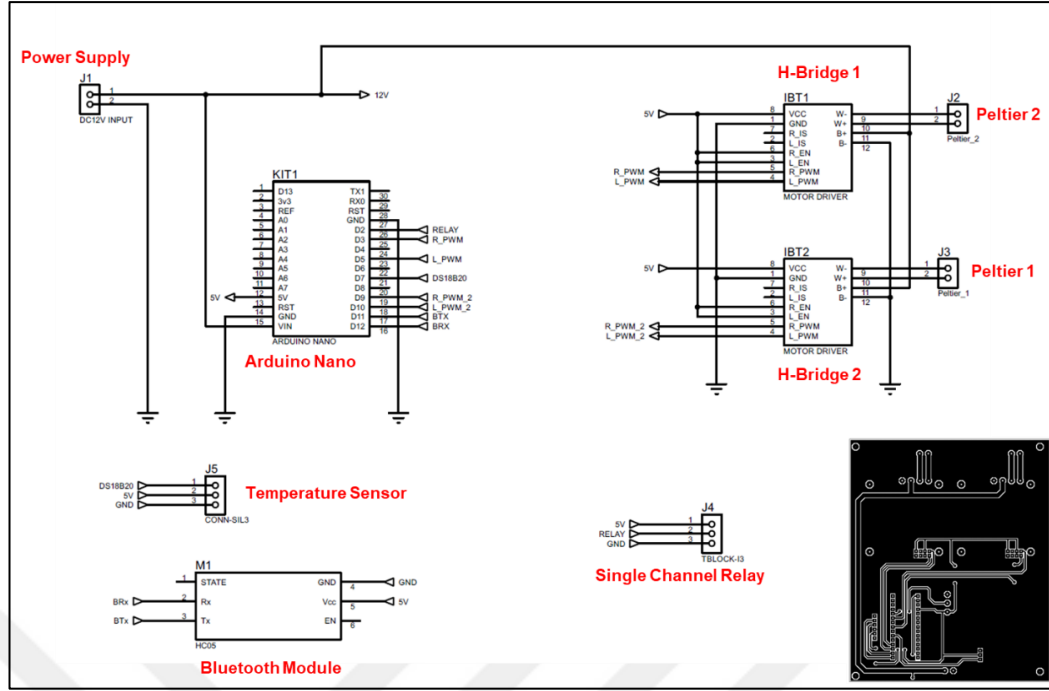
Şekil 3.27. PCR Sisteminin Güncel görüntüsü.

3.5.Sıcaklık Kontrol Devresi için Baskı Devre Tasarımı

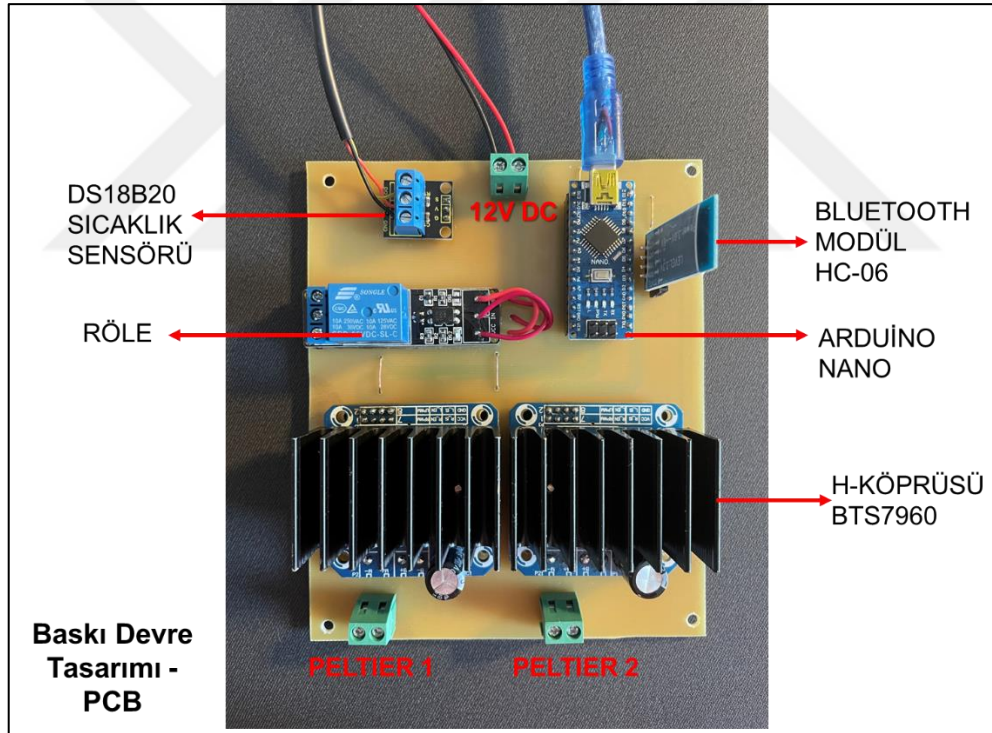
PCB, üzerine yarı iletken çipler ve kapasitörler gibi mikroelettronik bileşenlerin monte edildiği platformdur. Bileşenler arasındaki elektriksel ara bağlantıları sağlamaktadır ve neredeyse tüm elektronik ürünlerde bulunmaktadır. PCB'ler günümüzde giderek daha karmaşık hale gelmekte ve birçoğu yarı iletken endüstrisinin teknolojiyle rekabet etmeye başlayan çok katmanlı, yüksek hızlı ürünler olmaktadır. Tüm PCB'lerde ortak olan ana işlemler delme, görüntü aktarımı ve galvanik kaplamadır. Görüntü aktarımı, bir devre katmanı görüntüsünün filminden, camdan veya doğrudan görüntü veri dosyalarından PCB malzemesinin bakır folyosuna aktarılması işlemidir. Çift taraflı ve çok katmanlı devrelerde katmandan katmana ara bağlantılar sağlamak için PCB'lere delikler açılmaktadır [157].

Sıcaklık kontrol devresini taşınabilir, güvenilir ve daha az karmaşık hale getirmek için PCB tasarımı yapılmıştır (Şekil 3.28.a., Şekil 3.28.b.).

a)



b)

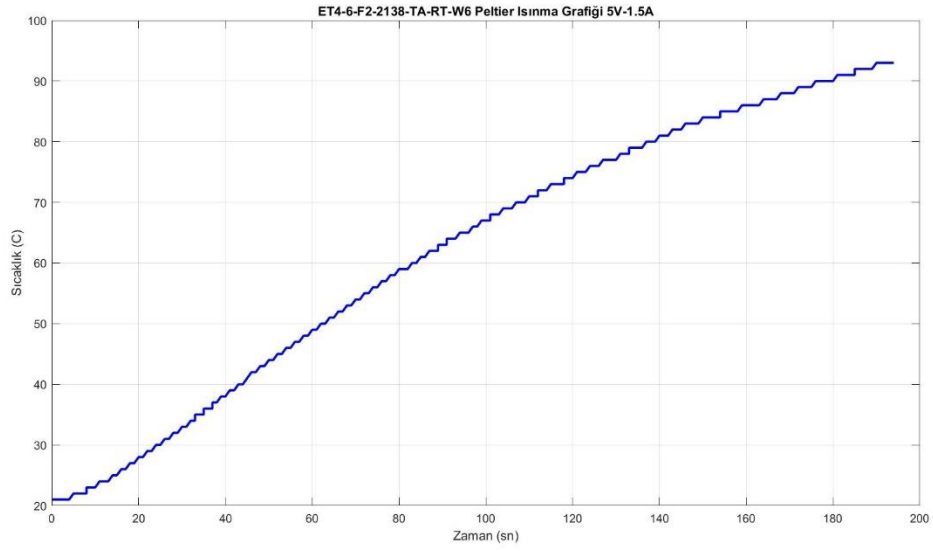


Şekil 3.28. a) Sıcaklık Döngüleyici Baskı Devre Tasarımı b) H-Köprü, Sıcaklık sensörü, Bluetooth Modülü, Röle ve Arduino Nano bileşenlerinden oluşan PCB Tasarımı.

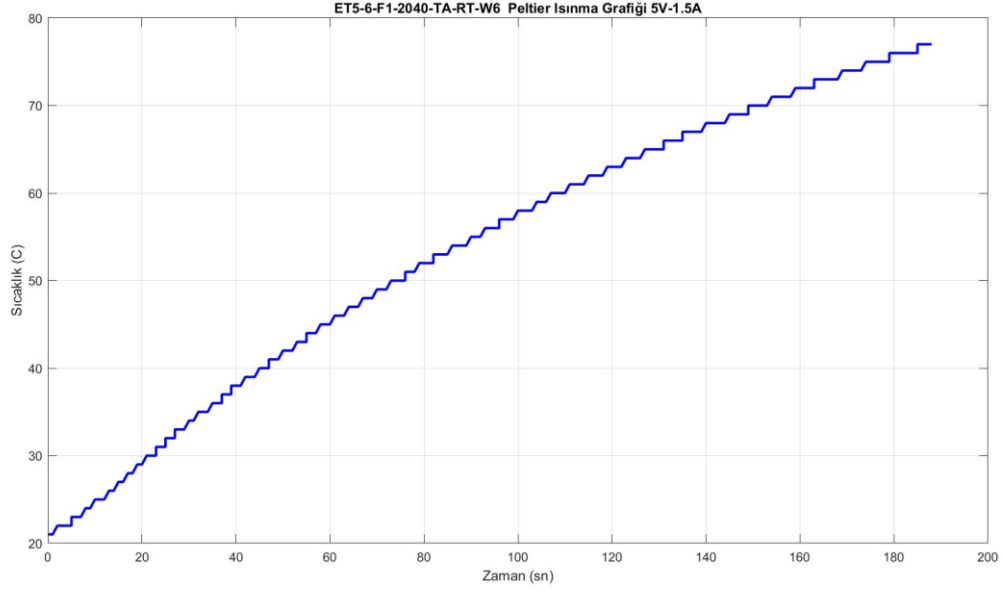
4. YAPILAN ÇALIŞMALAR

4.1. Peltier Modül Sıcaklık Testleri

Sıcaklık testleri MATLAB – Arduino UNO seri haberleşmesi kullanılarak gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Güç kaynağından uygulanan akım ile peltier modüllerinin ısınması sağlanmış ve sıcaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Her peltier modül için ayrı ayrı elde edilen sıcaklık-zaman grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).



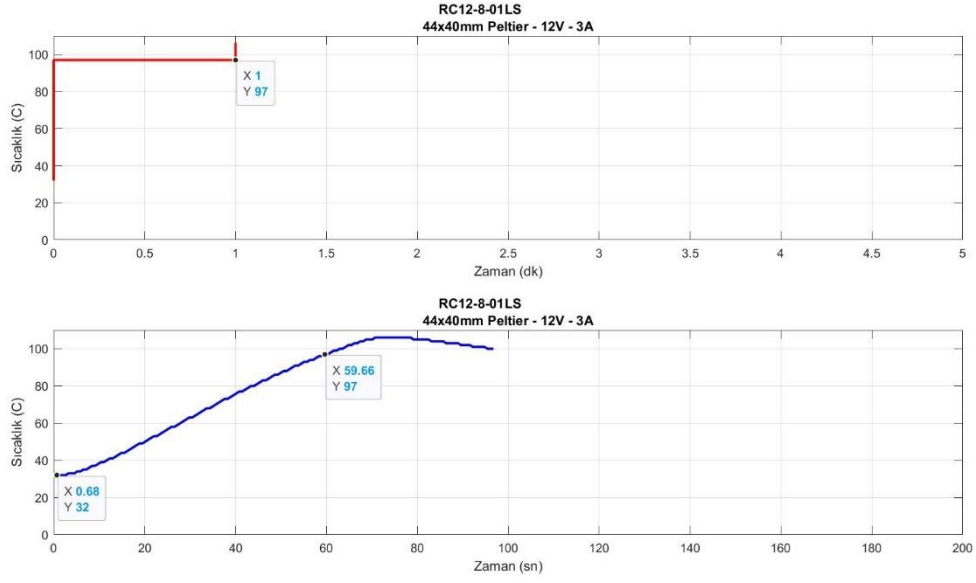
Şekil 4.1. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu peltier modülün uygulanan akım ile zamanla ısınma grafiği.



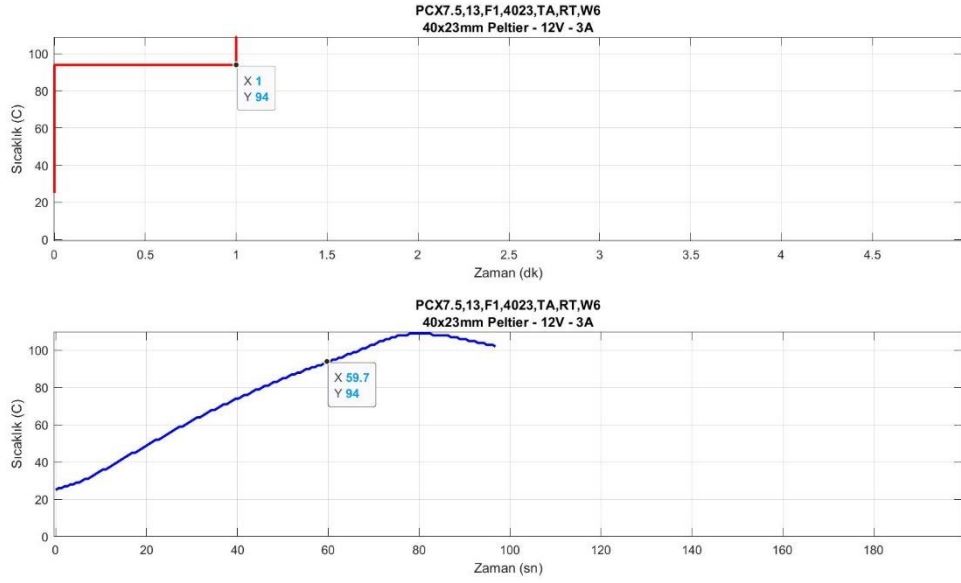
Şekil 4.2. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier modülün uygulanan akım ile zamanla ısınma grafiği.

Maksimum çalışma sıcaklığı 175°C olan peltier modül güç kaynağından 1.5A, 5V uygulandığında 3 dakika içerisinde 94°C'ye ulaşmıştır (Şekil 4.1.). Maksimum çalışma sıcaklığı 150°C olan peltier modül ise güç kaynağından 1.5A, 5V uygulandığında yaklaşık 3 dakika içerisinde 77°C'ye ulaşmıştır (Şekil 4.2.).

Maksimum çalışma sıcaklığı 130°C olan peltier modül güç kaynağından 3A, 12V uygulandığında 1 dakika içerisinde 97°C'ye ulaşmıştır (Şekil 4.3.). Maksimum çalışma sıcaklığı 130°C olan peltier modül ise güç kaynağından 3A, 12V uygulandığında yaklaşık 1 dakika içerisinde 94°C'ye ulaşmıştır (Şekil 4.4.).



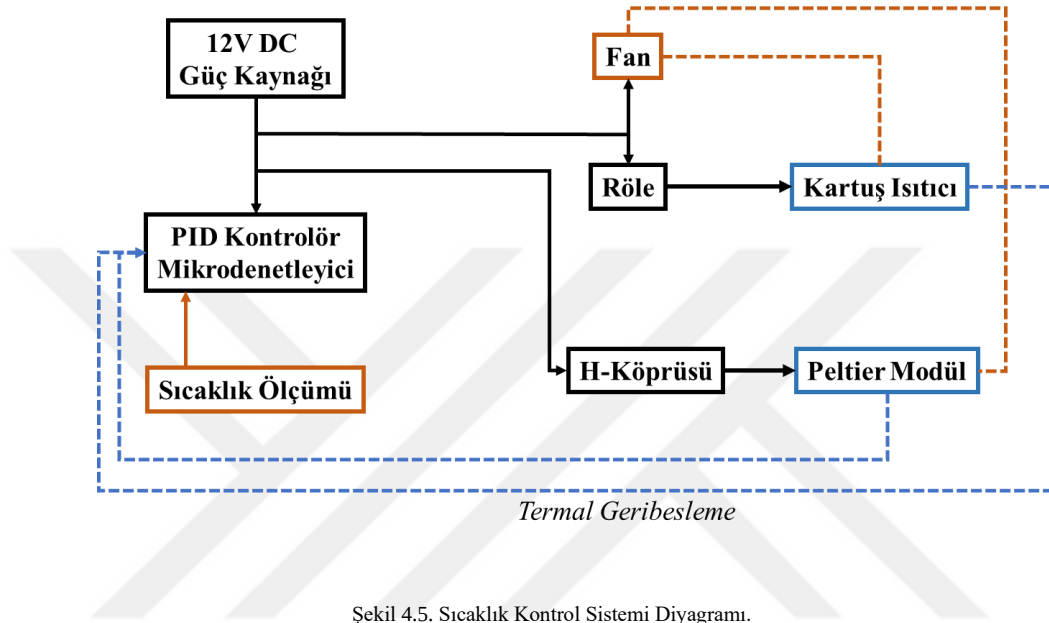
Şekil 4.3. RC12-8-01LS kodlu Peltier modülünün uygulanan akımla zaman içindeki ısınma grafiği.



Şekil 4.4. PCX7.5,13,F1,4023,TA,RT,W6 kodlu Peltier modülünün uygulanan akımla zaman içindeki ısınma grafiği.

4.2. Peltier Eleman ve Kartuş Isıtıcının PID Kontrolör ile Sıcaklık Kontrolü

Bu çalışmada 12V DC güç kaynağı, PID kontrolör, H-köprüsü ve röle kullanılarak hem ısıtma hem de soğutma sağlanmaya çalışılmıştır. Kapalı döngü sıcaklık kontrol sisteminin basitleştirilmiş bir blok şeması Şekil 4.5.'de gösterilmektedir.

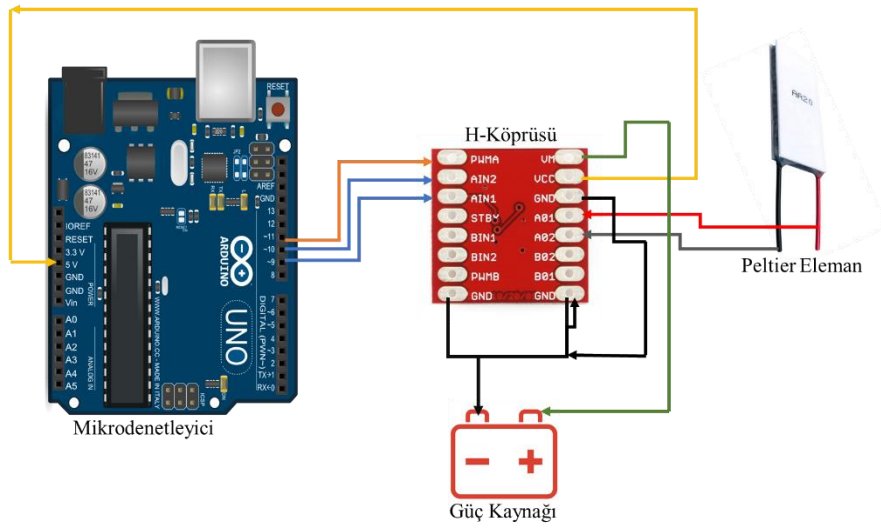


Şekil 4.5. Sıcaklık Kontrol Sistemi Diyagramı.

Sıcaklık kontrol sisteminde kullanılmak üzere TB6612FNG, L298N ve BTS7960 H-Köprü modülleri ayrı ayrı test edilmiştir. Ayrıca röle modülü ile kartuş ısıtıcı sıcaklık kontrolü de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.3, 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

4.3.TB6612FNG H-Köprü Modülü ve PID Kontrolör ile Peltier Sıcaklık Kontrolü

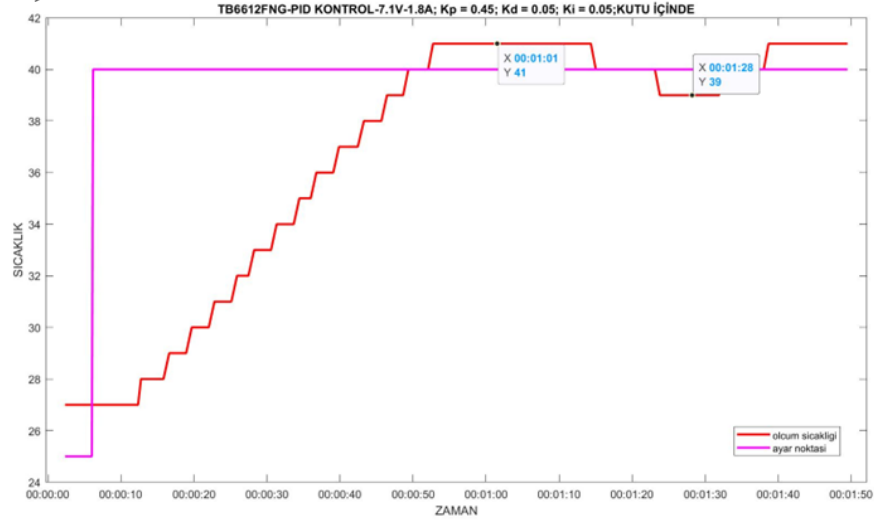
TB6612FNG H-Köprüsü modülü kullanılarak Şekil 4.6.’da görülen devre oluşturulmuş, sıcaklık sensörü için gerekli bağlantılar yapılmış, Peltier elemanın ulaştığı sıcaklıklar ölçülmüştür.



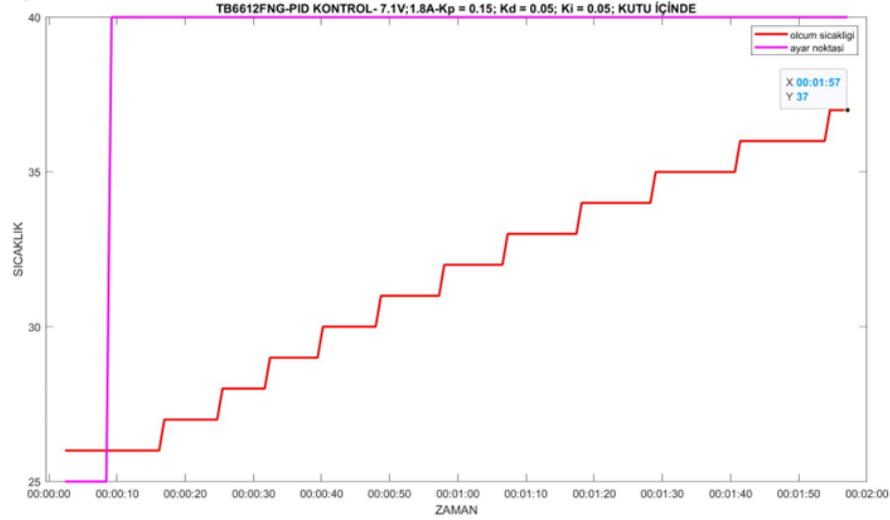
Şekil 4.6. Peltier eleman sıcaklık ölçümü için TB6612FNG H-Köprü Modülü ile oluşturulan devre.

PID kontrol ile TB6612FNG H-Köprüsü ve peltier sıcaklığı kontrolü için güç kaynağı 7.1V, 1.8A olarak ayarlanmıştır. Öncelikle ayar noktası sıcaklığı 40°C olarak belirlenmiş ve farklı PID kontrol parametreleri ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Sıcaklık ölçümleri kapalı bir kutu içerisinde gerçekleştirilmiştir. PID kontrol parametreleri K_p , K_d ve K_i sırasıyla 0.45, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlandığında istenilen ayar noktası sıcaklığına 50 saniye içerisinde ulaşılmıştır (Şekil 4.7.a). K_p , K_i ve K_d sırasıyla 0.15, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlandığında ise $\sim 37^\circ\text{C}$ 'ye ~ 2 dakika içerisinde ulaşılmıştır (Şekil 4.7.b).

a)

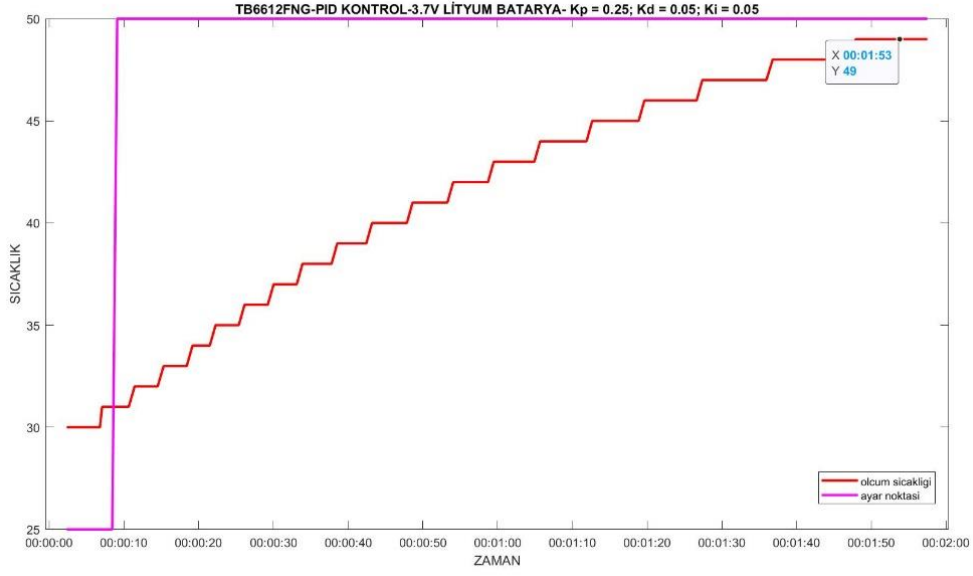


b)



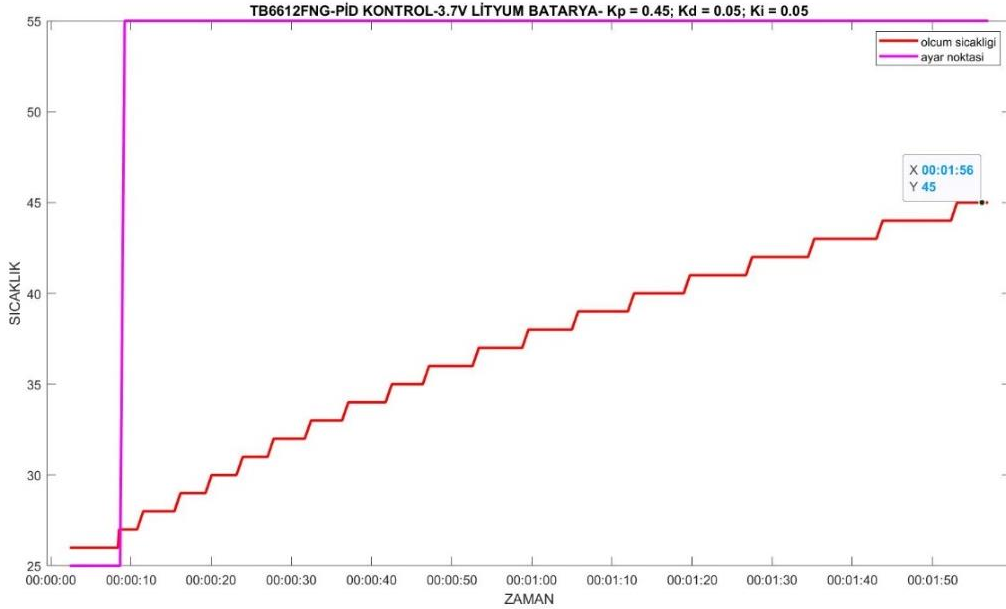
Şekil 4.7. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın a) $K_p=0.45$, $K_d=0.05$ ve $K_i=0.05$ iken, b) $K_p=0.15$, $K_d=0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği – (Kutu içinde 7.1V - 1.8A güç kaynağı).

Peltier elemanların TB6612FNG H-Köprüsü ile ne kadar sürede çalışmada kullanılacak en düşük sıcaklık olan 50°C'ye ulaşacağı üzerinde çalışılmıştır. İlk aşamada güç kaynağı olarak 3.7 V'luk iki adet Lityum batarya kullanılmıştır. Bu durumda Peltier eleman, PID kontrol parametreleri K_p , K_d ve K_i sırasıyla 0.25, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlandığında 30°C'den 2 dakikada 49°C'ye ulaşabilmiştir (Şekil 4.8.).



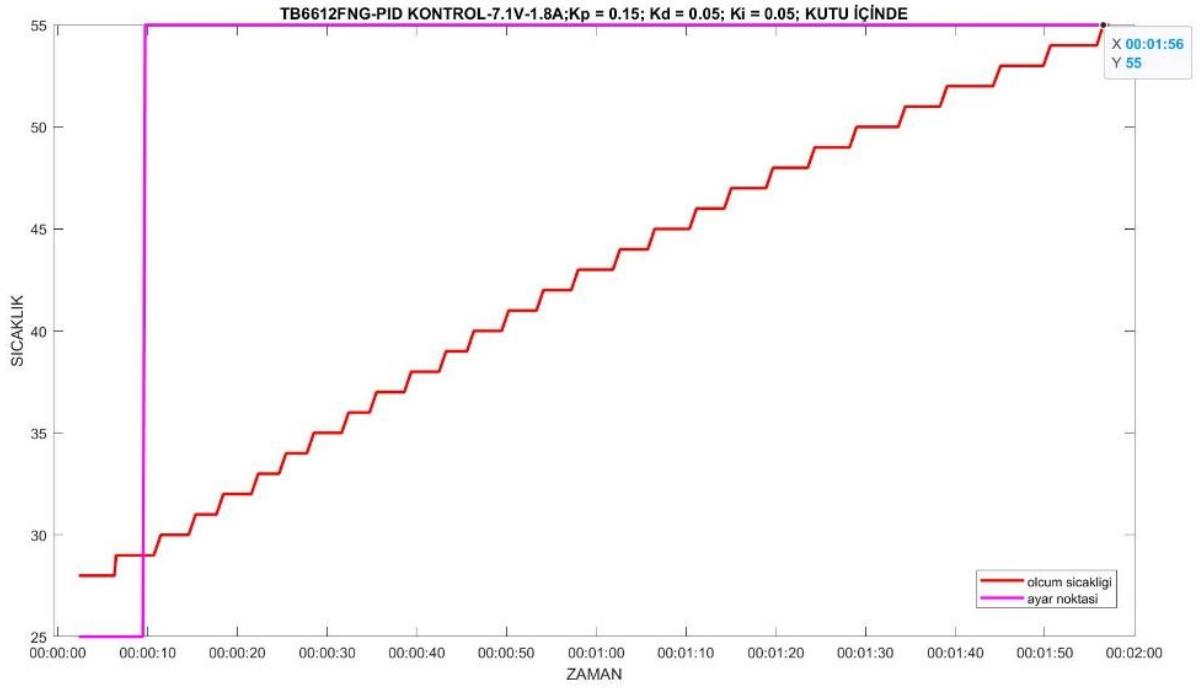
Şekil 4.8. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.25$, $K_d=0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği – kutu dışında (3.7V iki adet Lityum Batarya).

Ayar noktası sıcaklığı 55°C , PID kontrol parametreleri K_p , K_d ve K_i sırasıyla 0.45, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlandığında ise peltier sıcaklığı 2 dakikada 45°C 'ye ulaşabilmiştir (Şekil 4.9.).

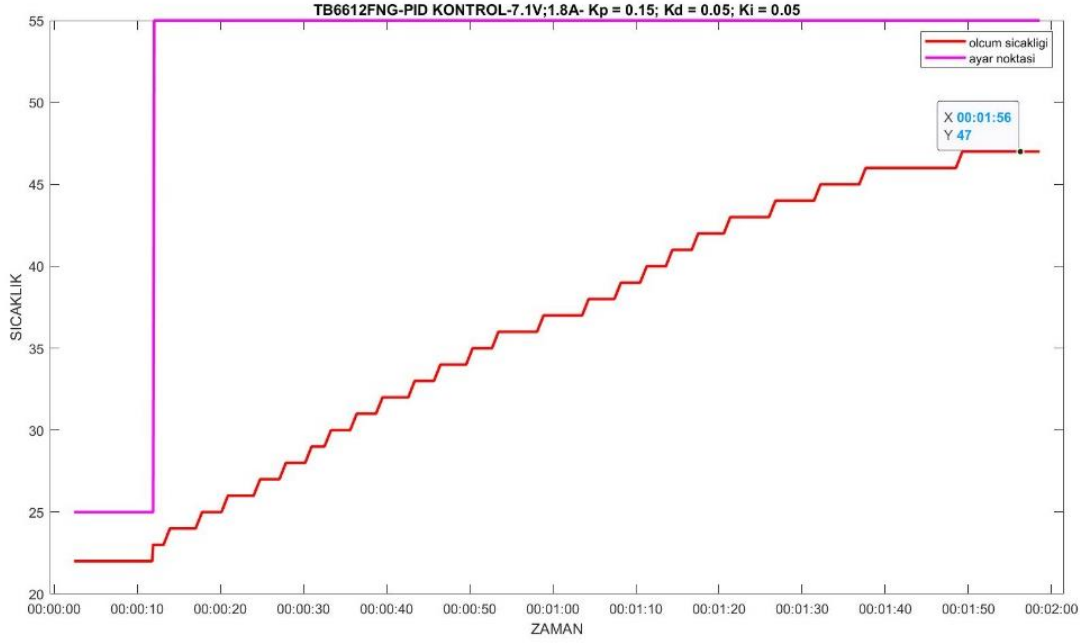


Şekil 4.9. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d=0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği – kutu dışında (3.7V iki adet Lityum Batarya).

55°C ayar noktası sıcaklığı için PID kontrol parametreleri K_p , K_i ve K_d sırasıyla 0.15, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmış ve sıcaklık ölçümü kapalı bir kutu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Güç kaynağı 7.1V, 1.8A olarak ayarlanmış bu durumda ise peltier sıcaklığı ~30°C'den 55°C'ye ~2 dakika içerisinde ulaşmıştır (Şekil 4.10.). Aynı ölçümler kutu dışında tekrarlandığında ise ~25°C'den 47°C'ye ~2 dakika içerisinde ulaşmıştır (Şekil 4.11.).

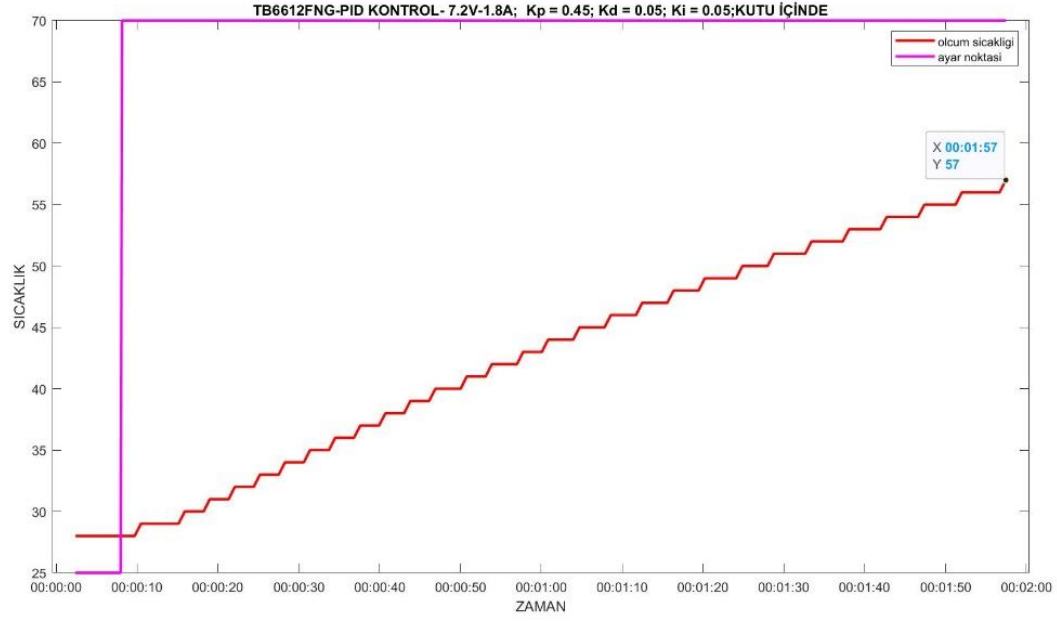


Şekil 4.10. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6kodlu peltier elemanın $K_p=0.15$, $K_d= 0.05$ ve $K_i= 0.05$ iken sıcaklık grafiği – kutu içinde (7.1V - 1.8A güç kaynağı).

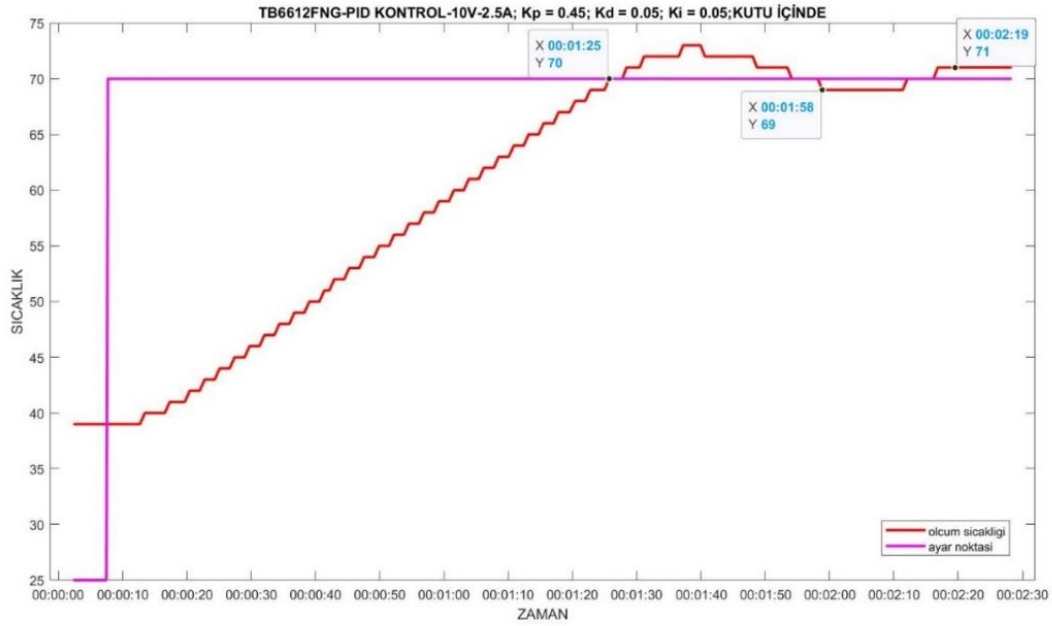


Şekil 4.11. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.15$, $K_d=0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği – kutu dışında (7.1V - 1.8A güç kaynağı).

70°C ayar noktası sıcaklığı için PID kontrol parametreleri K_p , K_i ve K_d sırasıyla 0.45, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmış ve sıcaklık ölçümü kapalı bir kutu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Güç kaynağı 7.1V, 1.8A olarak ayarlanmış bu durumda ise Peltier sıcaklığı ~30°C’den 57°C’ye ~2 dk içerisinde ulaşmıştır (Şekil 4.12.). Daha sonra aynı PID kontrol parametreleri kullanılmış, güç kaynağı 10V, 2.5A olarak ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlarda 70°C’ye 1 dk 25 sn içerisinde ulaşıldığı görülmüştür. PID kontrol sayesinde 70°C üzerindeki veya altındaki sıcaklıklara geçiş 1°C olmuştur (Şekil 4.13.).



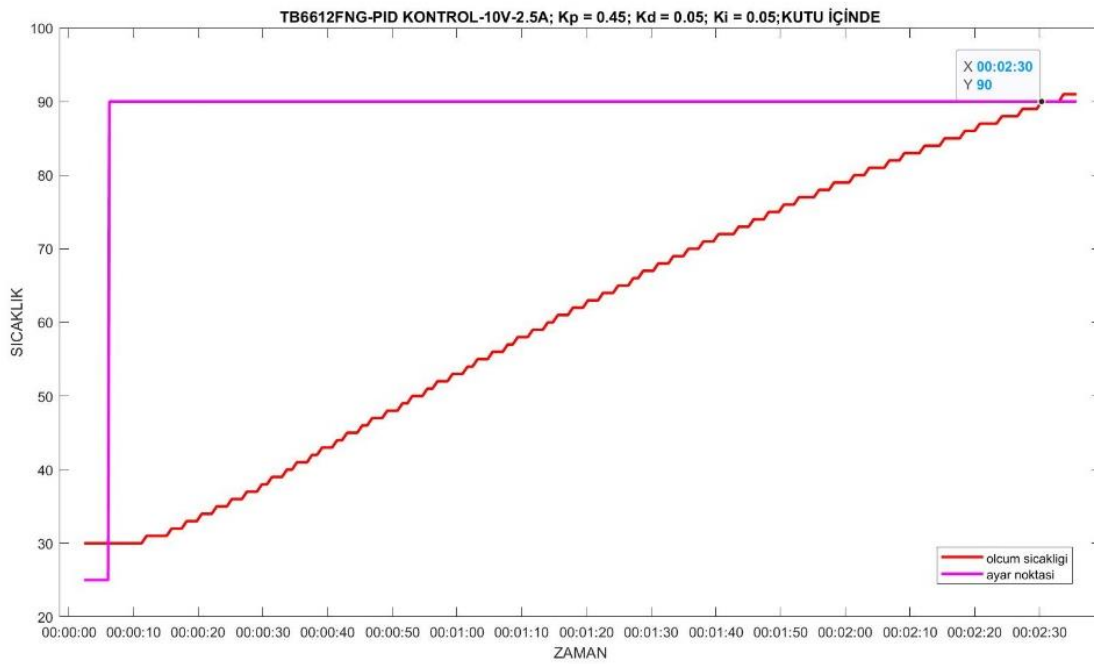
Şekil 4.12. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d=0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (7.1V - 1.8A güç kaynağı).



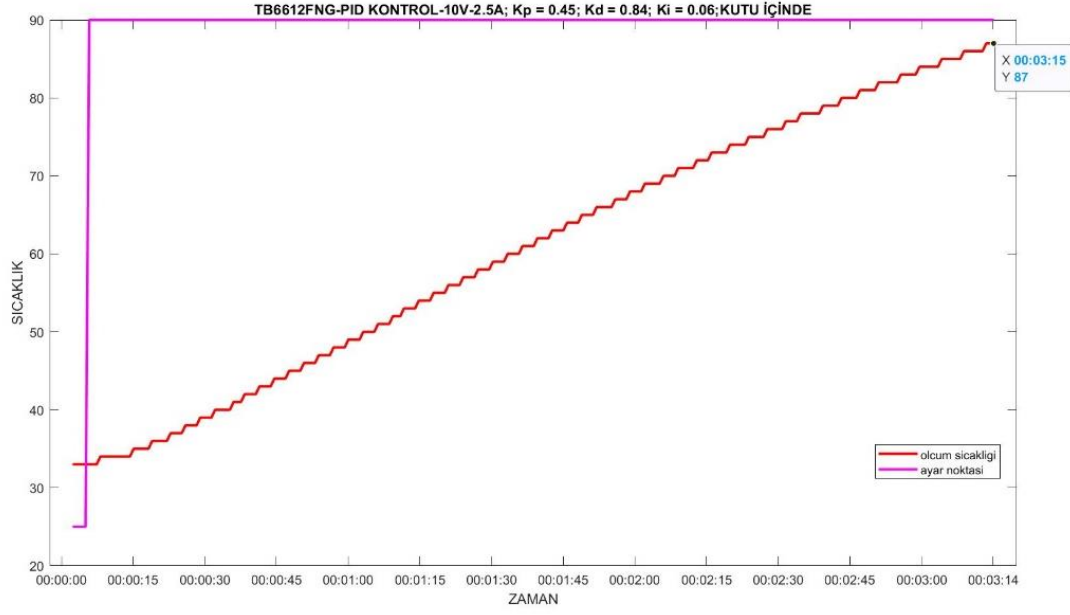
Şekil 4.13. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d=0.05$ ve $K_i=0.05$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).

90°C ayar noktası sıcaklığı için PID kontrol parametreleri K_p , K_i ve K_d sırasıyla 0.45, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmış ve sıcaklık ölçümü kapalı bir kutu içerisinde

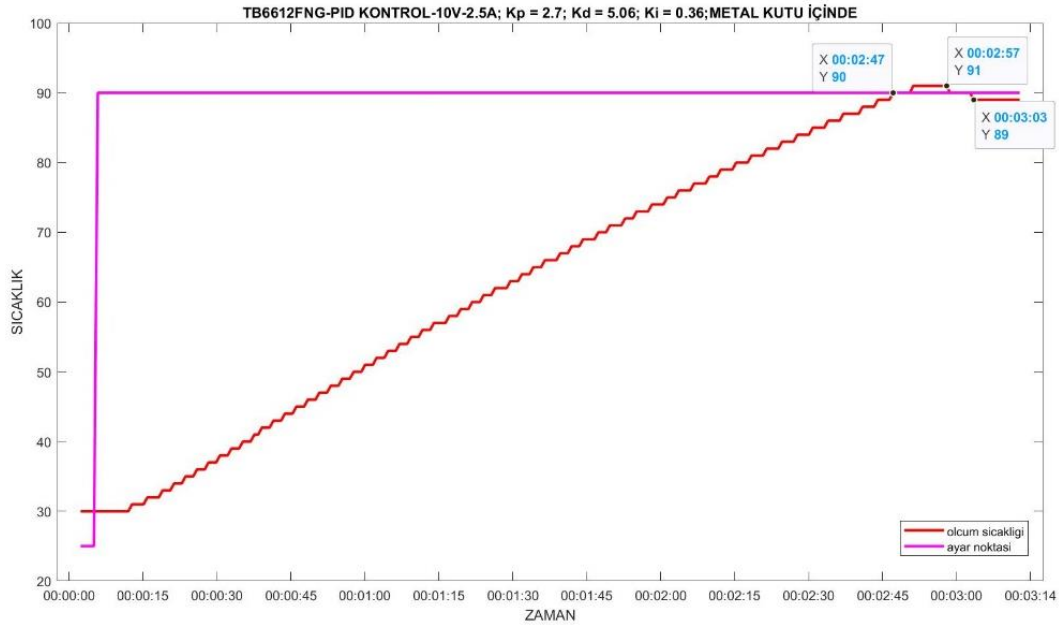
gerçekleştirilmiştir. Güç kaynağı 10V, 2.5A olarak ayarlanmış bu durumda ise peltier sıcaklığı $\sim 30^{\circ}\text{C}$ 'den 90°C 'ye ~ 2 dk içerisinde ulaşmıştır (Şekil 4.14.). Daha sonra farklı PID kontrol parametreleri (K_p , K_i ve K_d sırasıyla 0.45, 0.06 ve 0.84) kullanılmış, güç kaynağı 10V, 2.5A olarak ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlarda 87°C 'ye 3 dk 15 sn içerisinde ulaşıldığı görülmüştür (Şekil 4.15.). PID kontrol parametreleri ZN hesaplama yöntemine göre değiştirilip sırasıyla $K_p=2.7$, $K_d= 5.06$ ve $K_i= 0.36$ olarak ayarlanmış ve ölçümler metal bir kutu içinde tekrar edilmiştir. Bu durumda peltier sıcaklığı $\sim 30^{\circ}\text{C}$ 'den 90°C 'ye ~ 2 dk 47 sn içerisinde ulaşmıştır. PID kontrol sayesinde 90°C üzerindeki veya altındaki sıcaklıklara geçiş 1°C olmuştur (Şekil 4.16.).



Şekil 4.14. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d= 0.05$ ve $K_i= 0.05$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).



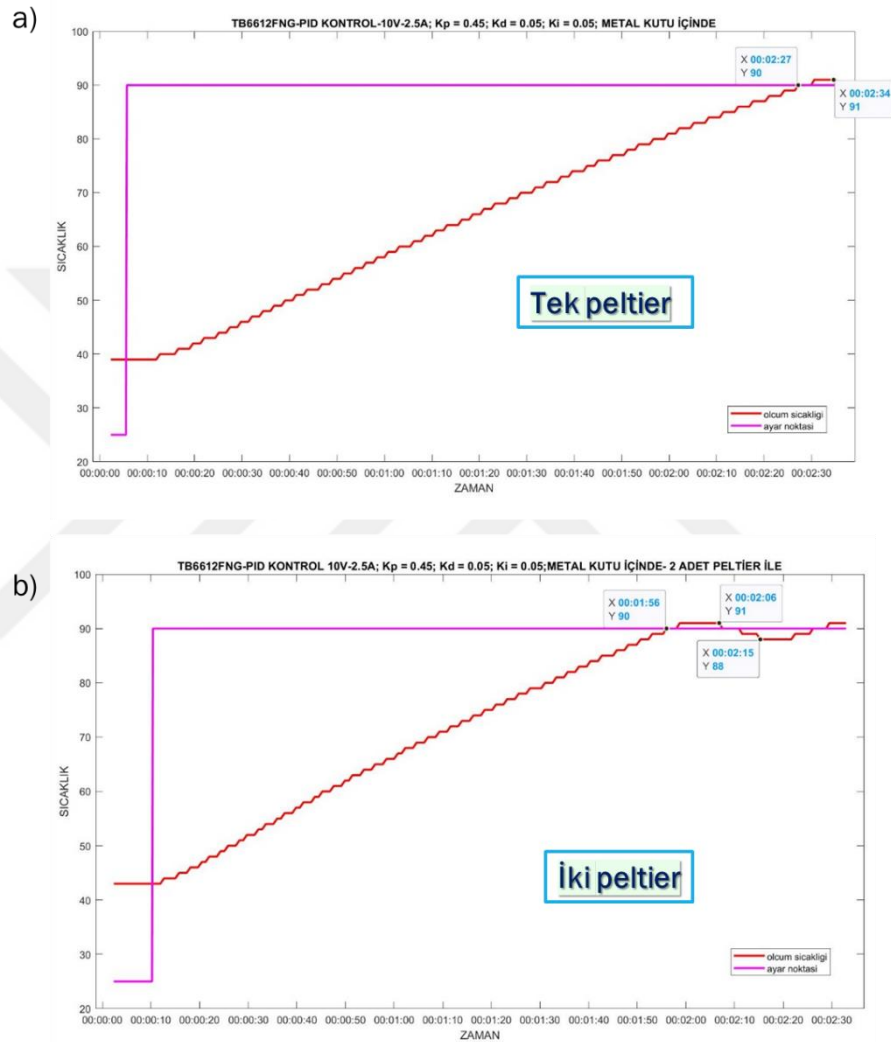
Şekil 4.15. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=0.45$, $K_d=0.84$ ve $K_i=0.06$ iken sıcaklık grafiği- kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).



Şekil 4.16. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu peltier elemanın $K_p=2.7$, $K_d=5.06$ ve $K_i=0.36$ iken sıcaklık grafiği- metal kutu içinde (10V - 2.5A güç kaynağı).

Daha sonra 90°C ayar noktası sıcaklığı için ölçümler iki adet peltier ile tekrar edilmiştir. Güç kaynağı 10V, 2.5A olarak ayarlanmıştır. PID kontrol parametreleri K_p , K_i

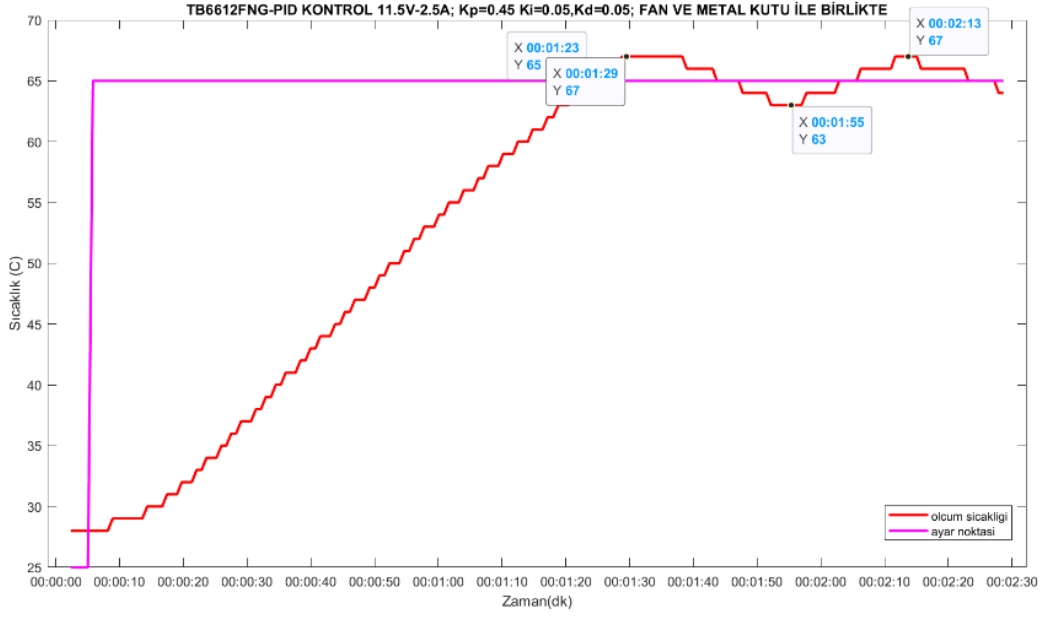
ve Kd sırasıyla 0.45, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmıştır. Bir adet peltier ile 40°C'den 90°C'ye 150 saniyede, iki adet peltier kullanıldığında ise 40°C'den 90°C'ye 110 sn'de ulaşılmıştır (Şekil 4.17.a, 4.17.b). Sonuç olarak iki adet Peltier ile istenilen ayar noktası sıcaklığına daha kısa sürede ulaşılmıştır.



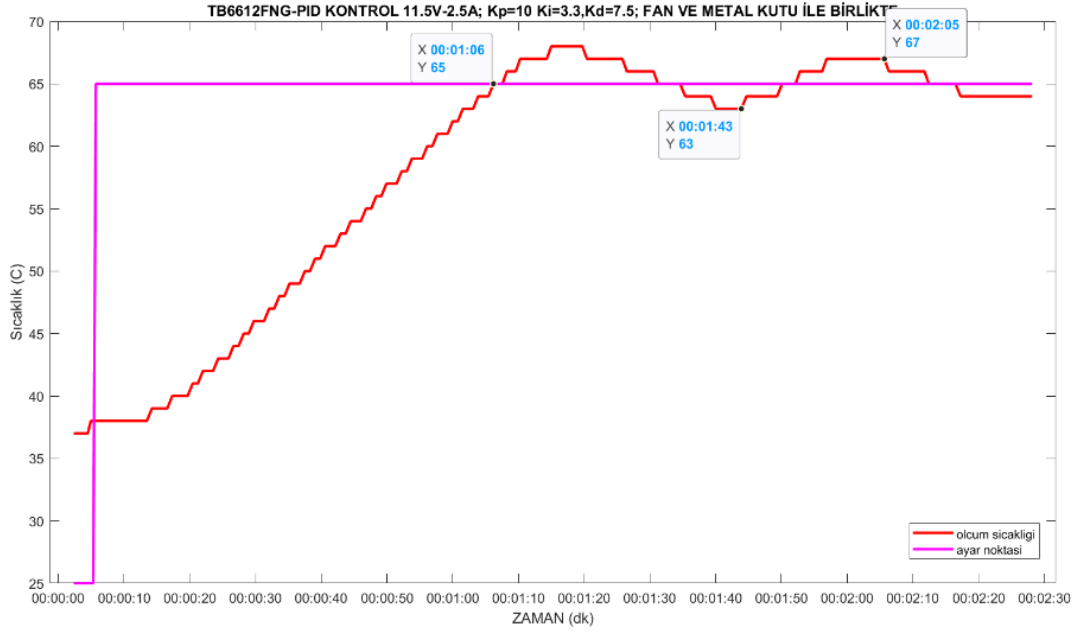
Şekil 4.17. Peltier elemanların 90°C'ye ulaşma grafiği. a) Tek Peltier kullanıldığında 90 °C'ye ulaşma grafiği, b) İki Peltier birlikte kullanıldığında °C'ye ulaşma grafiği.

İzotermal amplifikasyon sıcaklığı olan 65°C ayar noktası sıcaklığı için ölçümler iki adet Peltier ile tekrar edilmiştir. Güç kaynağı 11.5V, 2.5A olarak ayarlanmış, Peltier elemanlar metal kutu içerisine yerleştirilmiştir. PID kontrolör parametreleri Kp, Ki ve Kd sırasıyla 0.45, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmıştır. Bu durumda 27°C'den 65°C'ye 83 sn içerisinde ulaşılmıştır (Şekil 4.18.). Daha sonra PID kontrolör parametreleri Kp, Ki ve Kd

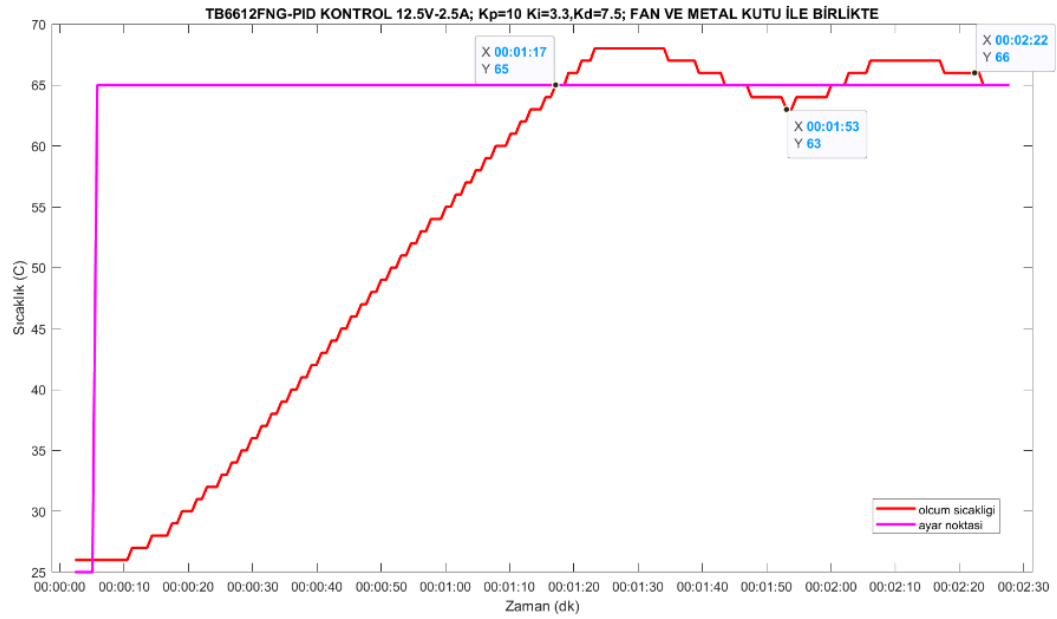
sırasıyla 10, 3.3 ve 7.5 olarak değiştirilmiş ve ölçümler tekrarlanmıştır. Bu durumda 37°C'den 65°C'ye 70 sn'de ulaşılmıştır (Şekil 4.19.). Aynı ayar noktası sıcaklığı için ölçüm güç kaynağı 12.5V-2.5A'e ayarlanarak ve PID kontrolör parametreleri Kp, Ki ve Kd sırasıyla 10, 3.3 ve 7.5 olarak ayarlanmış ve tekrarlanmıştır. Bu durumda 26°C'den ayar noktası sıcaklığına 77 sn'de ulaşılmıştır (Şekil 4.20.).



Şekil 4.18. İki adet Peltier elemanın 65°C'ye ulaşma grafiği (Maksimum aşma oranı $\pm 2^{\circ}\text{C}$).



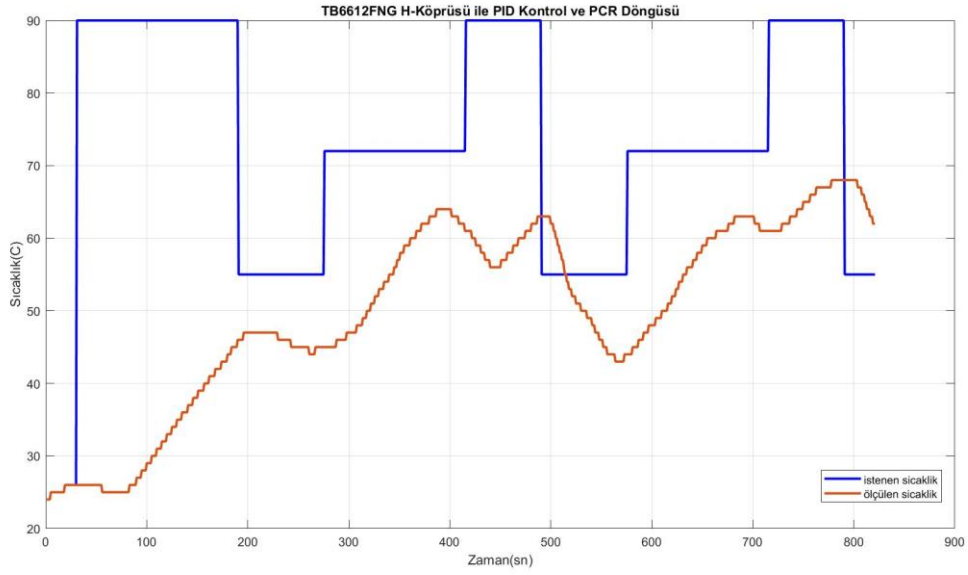
Şekil 4.19. İki adet Peltier elemanın 65°C'ye farklı PID parametreleri ile ulaşma grafiği (Maksimum aşma oranı $\pm 2^\circ\text{C}$).



Şekil 4.20. İki adet Peltier elemanın 65°C'ye farklı besleme durumunda ulaşma grafiği (Maksimum aşma oranı $+1^\circ\text{C}$ ve -2°C).

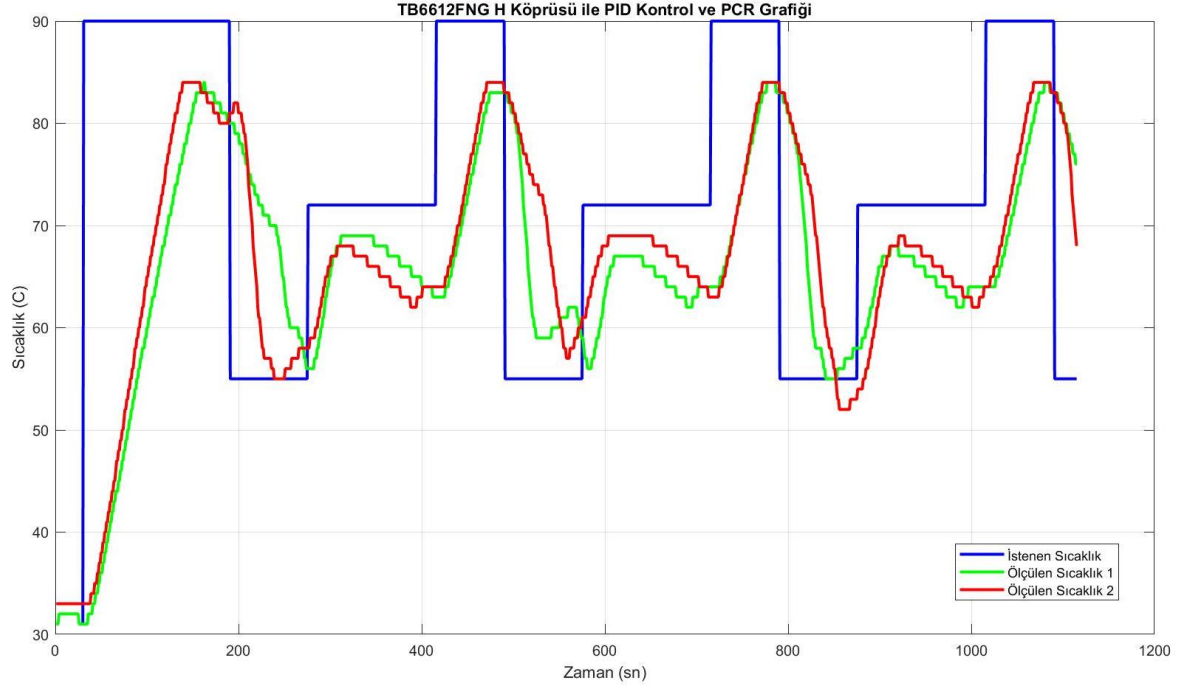
Tam bir PCR döngüsü için ölçüm alındığında Şekil 4.21.'deki grafik elde edilmiştir. Tam bir PCR döngüsü için güç kaynağı ilk aşamada 7V olarak ayarlanmıştır. PID kontrol parametreleri K_p , K_d ve K_i sırasıyla 10, 0 ve 0 olarak değiştirilmiştir. Grafiğe göre 55°C

olması istenilen sıcaklıkta ölçülen sıcaklık 47°C olmuştur, 72°C olması istenilen sıcaklıkta ise ölçülen sıcaklık 63°C olmuştur.



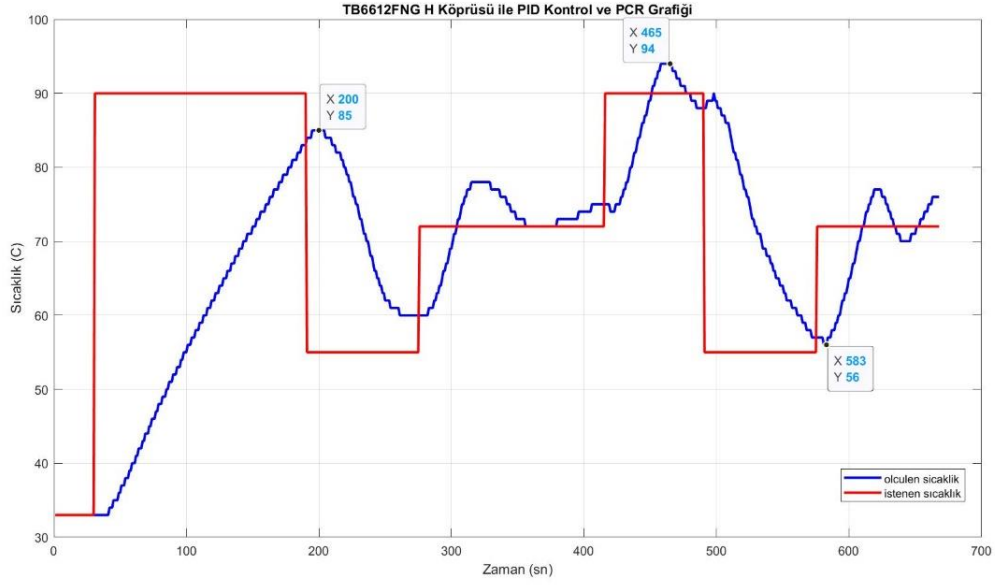
Şekil 4.21. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın PCR döngüsü grafiği.

Tam bir PCR döngüsü için daha sonra güç kaynağı ölçülen ilk sıcaklık verileri için 11.2V - 2.57A ve ölçülen ikinci sıcaklık verileri için 11.9V - 2.85A olarak ayarlanmıştır. PID kontrol parametreleri K_p , K_d ve K_i sırasıyla 10, 0.05 ve 0.05 olarak değiştirilmiştir. Farklı akım ve voltaj değerleri ile istenilen PCR döngüsü sıcaklıklarına daha yakın bir grafik elde edilebilmiştir (Şekil 4.22.).



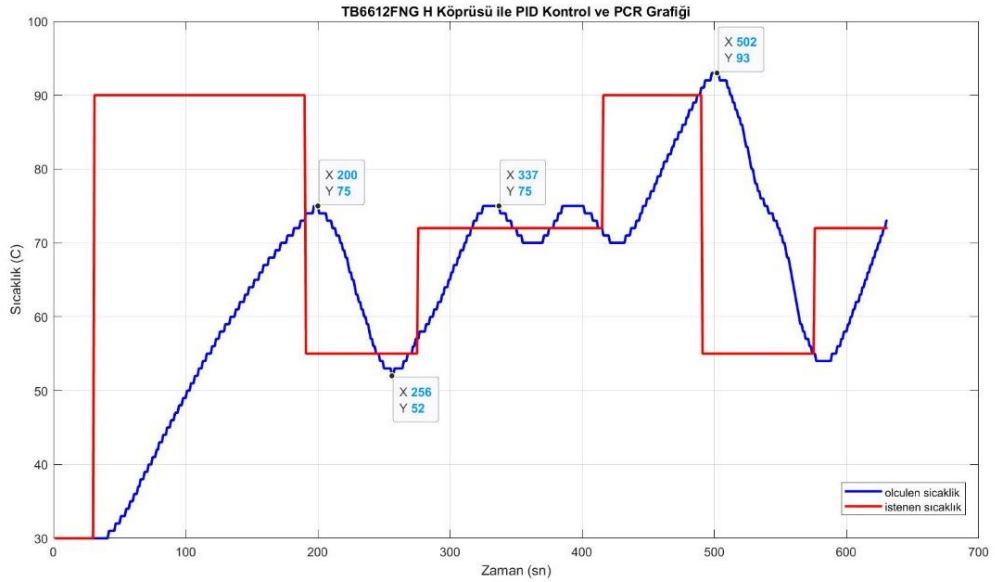
Şekil 4.22. ET5-6-F1-2040-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın PCR döngüsü grafiği (farklı akım ve voltajlar ile).

Daha sonra ölçümler iki adet Peltier modül yüzeyleri temas edecek şekilde bağlanarak gerçekleştirilmiştir. Farklı parametreler ile ölçümler tekrar edilmiştir. Öncelikle iki adet Peltier soğuyan yüzeyleri temas edecek şekilde bağlandıktan sonra ölçümler 12V – 3A batarya kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kp, Kd ve Ki sırasıyla 10, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmıştır. Elde edilen PCR grafiği Şekil 4.23.'de verilmiştir.



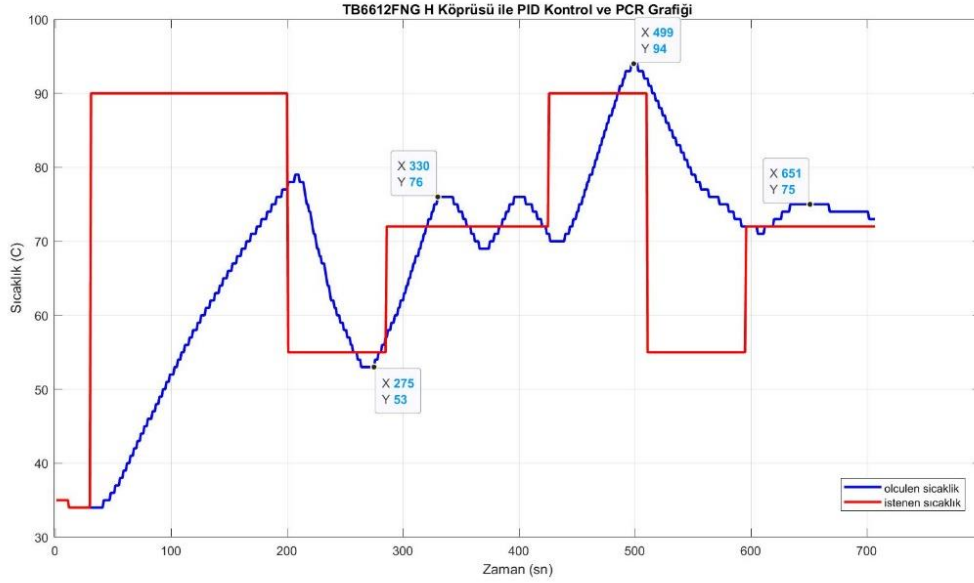
Şekil 4.23. İki adet Peltier eleman, 12V-3A batarya ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.

Ardından iki adet Peltier sıcak ve soğuk yüzeyleri temas edecek şekilde bağlandıktan sonra ölçümler 12V – 3A batarya kullanılarak gerçekleştirilmiştir. K_p , K_d ve K_i sırasıyla 10, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmıştır. Elde edilen PCR grafiği verilmiştir (Şekil 4.24.).



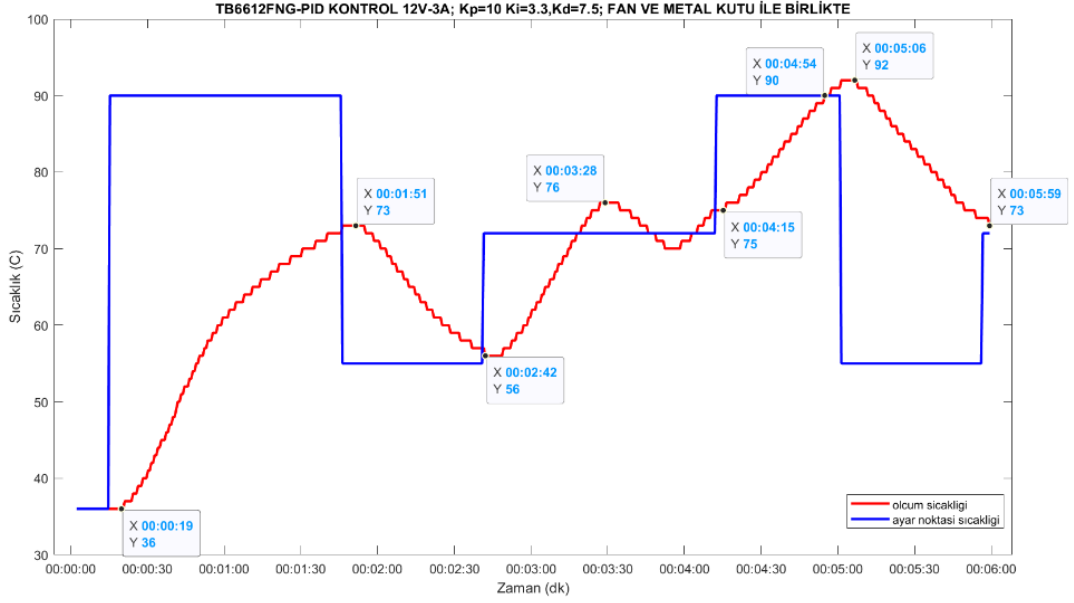
Şekil 4.24. İki adet Peltier elemanın farklı yüzeyleri temas halinde iken, 12V-3A batarya ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.

Daha sonra iki adet Peltier sıcak ve soğuk yüzeyleri temas edecek şekilde bağlandıktan sonra ölçümler 12V – 3A güç kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kp, Kd ve Ki sırasıyla 10, 0.05 ve 0.05 olarak ayarlanmıştır. İlk denatürasyona ulaşma süresi arttırılmış, ölçümler tekrar edilmiştir. Elde edilen PCR grafiği Şekil 4.25.’de verilmiştir.



Şekil 4.25. İki adet Peltier elemanın farklı yüzeyleri temas halinde iken, 12V-3A güç kaynağı ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.

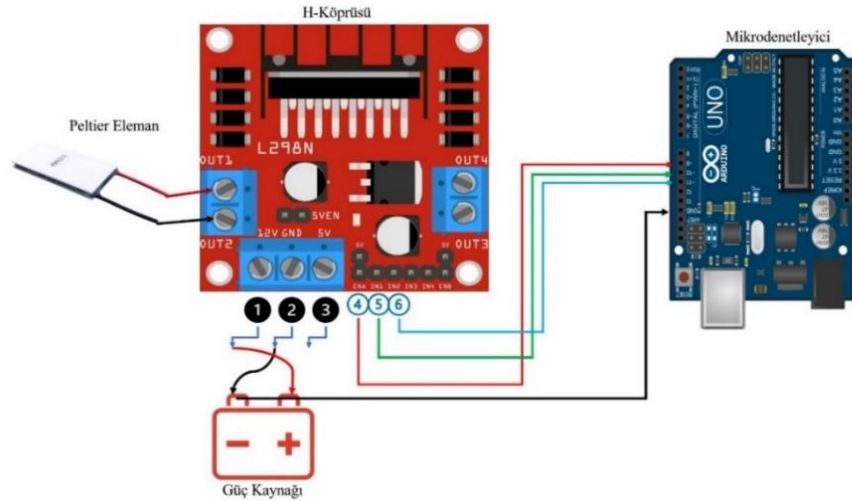
Son olarak iki adet Peltier sıcak ve soğuk yüzeyleri temas edecek şekilde bağlandıktan sonra ölçümler 12V – 3A güç kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kp, Kd ve Ki değiştirilmiş ve sırasıyla 10, 3.3 ve 7.5 olarak ayarlanmıştır. Elde edilen PCR grafiği Şekil 4.26.’da verilmiştir.



Şekil 4.26. İki adet Peltier elemanın farklı yüzeyleri temas halinde iken, 12V-3A güç kaynağı ile elde edilen PCR döngüsü grafiği.

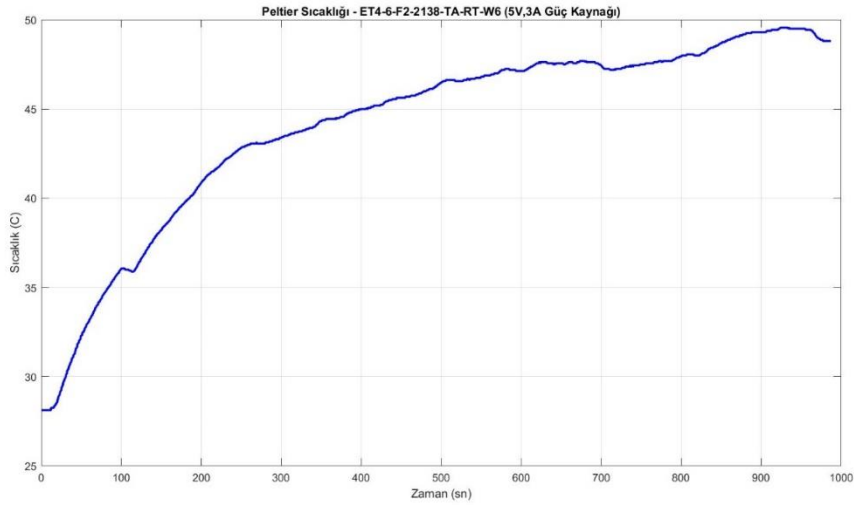
4.4. L298N H-Köprü Modülü ve PID Kontrolör ile Peltier Sıcaklık Kontrolü

L298N H-Köprüsü modülü kullanılarak Şekil 4.27.'de görülen devre oluşturulmuş, sıcaklık sensörü için gerekli bağlantılar yapılmış, Peltier elemanın ulaştığı sıcaklıklar ölçülmüştür.

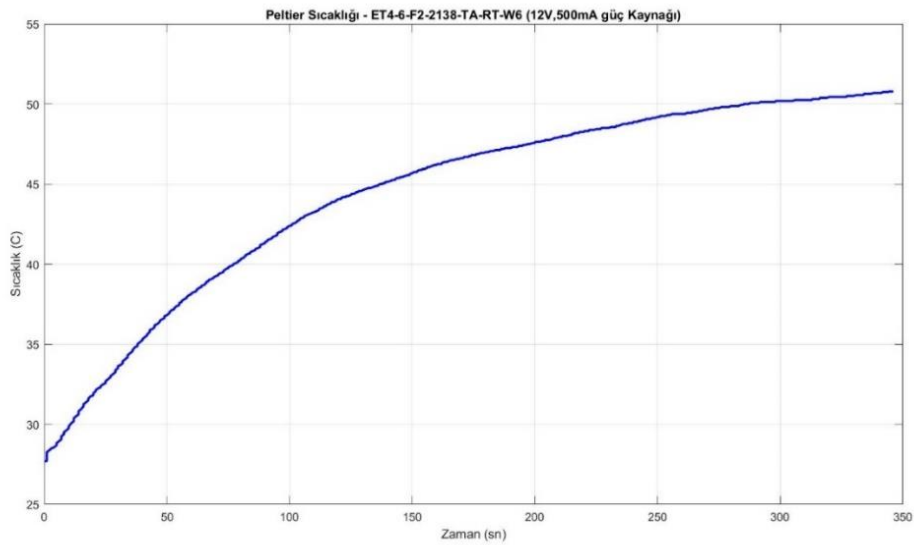


Şekil 4.27. Peltier eleman sıcaklık ölçümü için H-Köprü Modülü ile oluşturulan devre.

Peltier elemanların L298N H-Köprüsü ile ne kadar sürede çalışmada kullanılacak en yüksek sıcaklık olan 90°C'ye ulaşacağı üzerinde çalışılmıştır. İlk aşamada güç kaynağı olarak 5V 3A'lık adaptör kullanılmıştır. Peltier eleman (ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier) bağlı olduğu çıkıştan yaklaşık ~1,60 Voltluk çıkış gözlenmiştir. Ayrıca bu durumda Peltier eleman 25°C'den 15 dk'da 49°C'ye ulaşabilmiştir (Şekil 4.28.). Aynı Peltier eleman ve güç kaynağı olarak 12V, 500mA'lık adaptör kullanıldığında ise 6 dk'da 50,81°C'ye ulaşılabilmiştir (Şekil 4.29.).

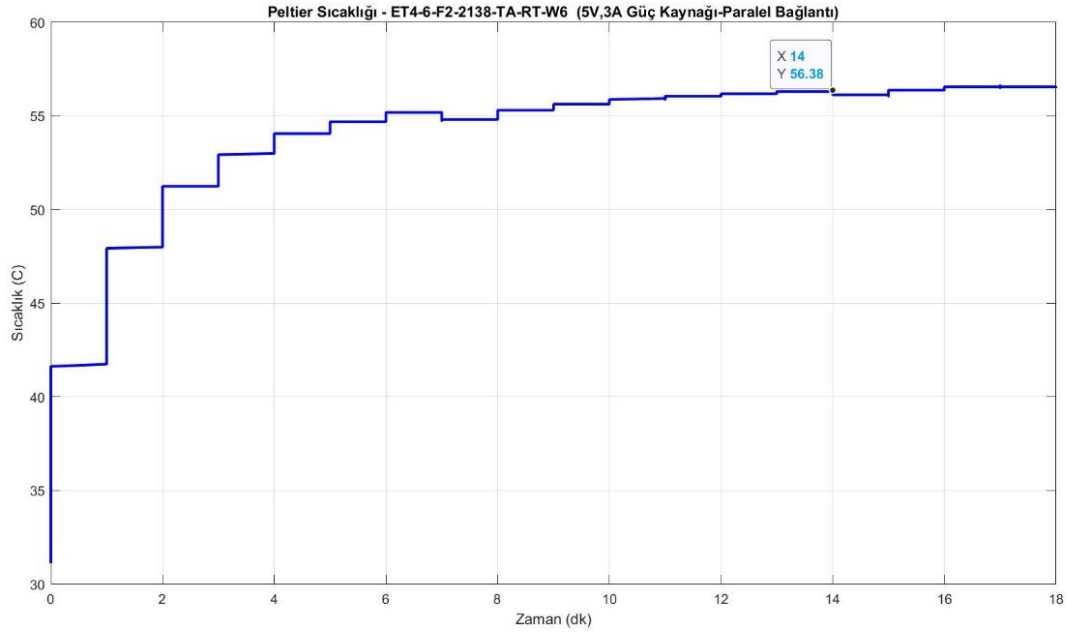


Şekil 4.28. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (5V 3A güç kaynağı ile).



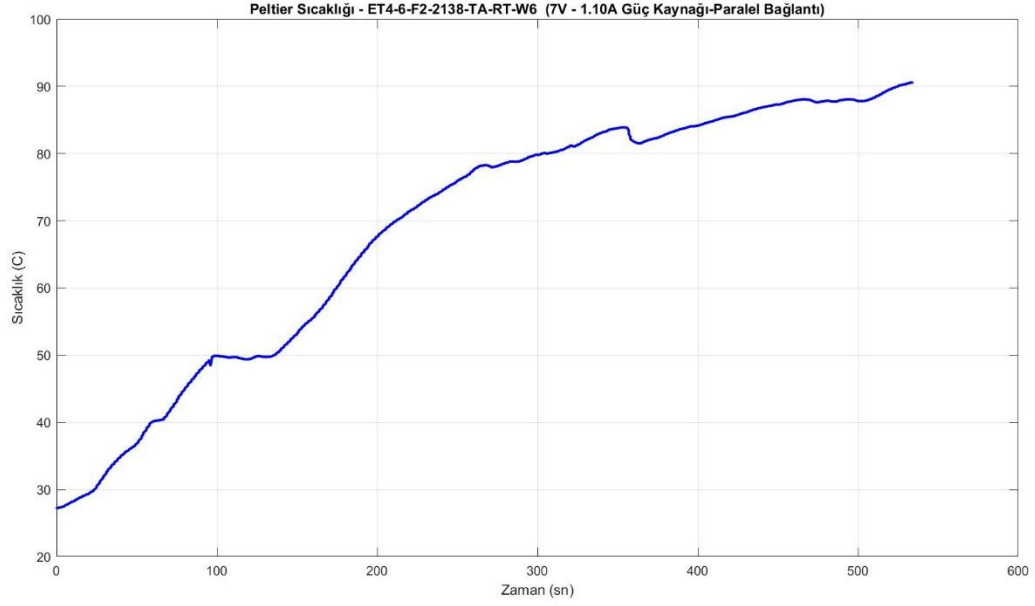
Şekil 4.29. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (12V 500mA güç kaynağı ile).

L298N H-Köprüsü modülüne ait iki adet çıkış birbirine paralel bağlanarak Peltier eleman sıcaklık testleri tekrar edilmiştir. H-Köprüsünde IN4 ile IN1 ve IN3 ile IN2 paralel bağlanmıştır. Bu durumda Peltier eleman yaklaşık $\sim 30^{\circ}\text{C}$ 'den $55,88^{\circ}\text{C}$ 'ye 10 dk ve $56,38^{\circ}\text{C}$ 'ye 15 dk'da ulaşmıştır (Şekil 4.30.). Paralel bağlantı sayesinde daha yüksek akımlar elde edilebileceği düşünülmüştür.



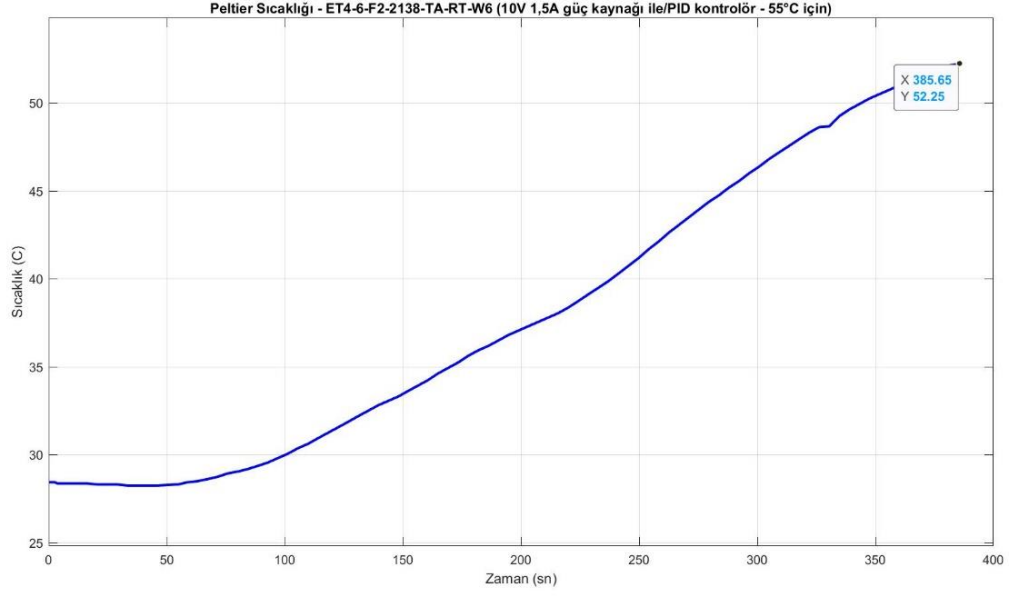
Şekil 4.30. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (5V 3A güç kaynağı ile/Paralel bağlanmış çıkışlar).

Aynı test güç kaynağı 7V ve 1,15A iken tekrar edilmiştir. Bu durumda paralel olarak bağlanan çıkışlardan birincisinin (OUT1) çıkış voltajı 3,80V, diğerinin (OUT2) ise 3,74V olarak ölçülmüştür. Peltier eleman üzerindeki voltaj ise 3,48V olarak ölçülmüştür. Ayrıca eleman modül sıcaklığı yaklaşık $\sim 27^{\circ}\text{C}$ 'den 55°C 'ye 2 dk, $\sim 90^{\circ}\text{C}$ 'ye ise 9 dk'da ulaşmıştır (Şekil 4.31.).

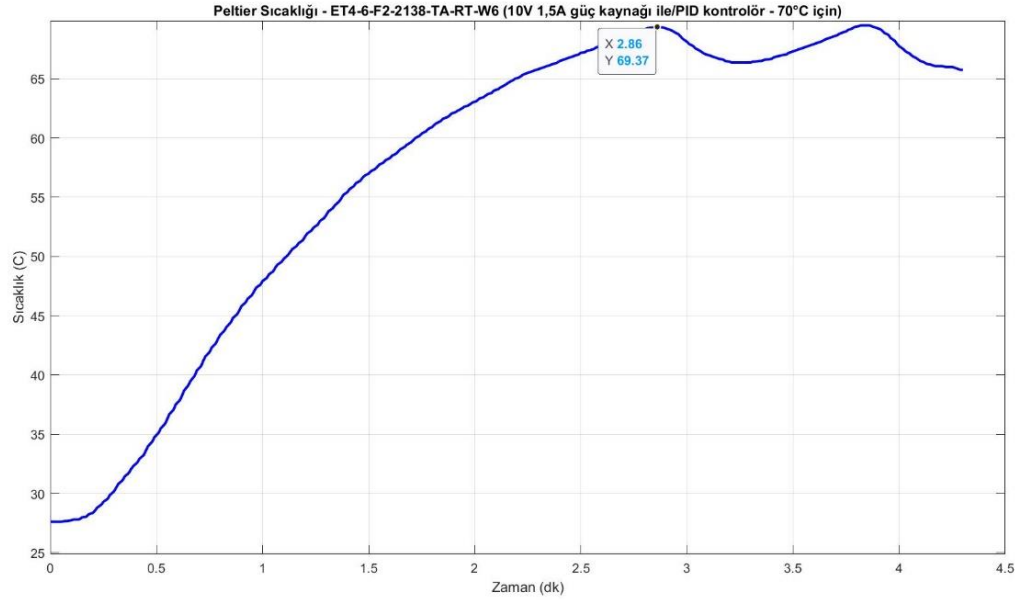


Şekil 4.31. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (7V 1,10A güç kaynağı ile/Paralel bağlanmış çıkışlar).

Güç kaynağı 10V ve 1,5A iken Peltier eleman üzerindeki voltaj ise 3,6V olarak ölçülmüştür. Ulaşılması istenilen sıcaklık değeri ilk olarak 55°C daha sonra 70°C olarak ayarlanmıştır. $K_p = 0.015$; $K_i = 0.00041$; $K_d = 0.00005$ olarak ayarlanan PID kontrolör parametreleri ile 55°C olarak belirlenen ayar noktasına 5 dk içerisinde ancak 52,25°C olacak şekilde ulaşılmıştır (Şekil 4.32.). $K_p = 0.015$; $K_i = 0.00041$; $K_d = 0.00005$ olarak ayarlanan PID kontrolör parametreleri ile 70°C olarak belirlenen ayar noktasına 3 dk içerisinde ancak 69,37°C olacak şekilde ulaşılmıştır (Şekil 4.33.).

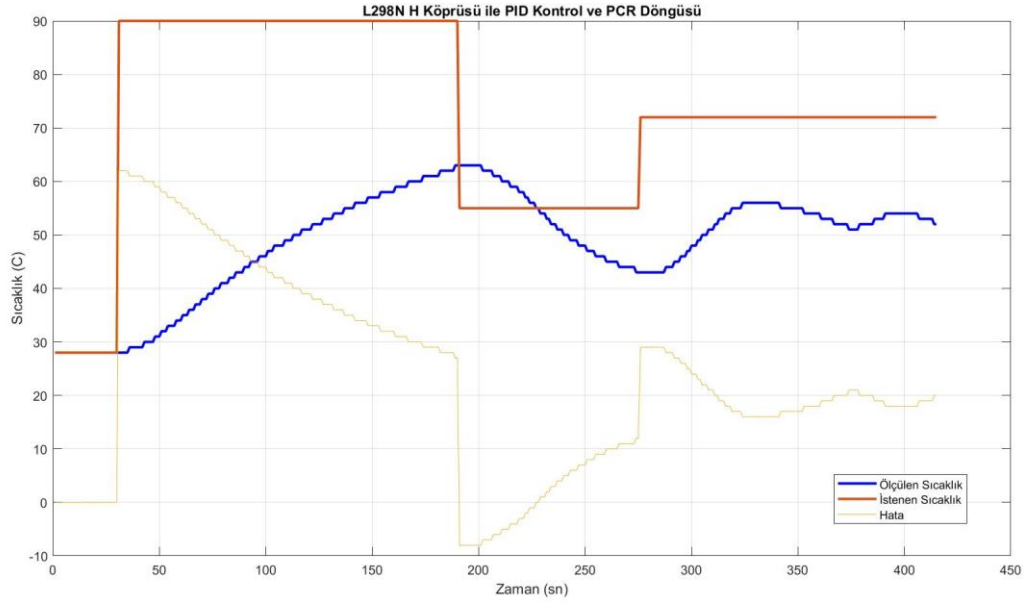


Şekil 4.32. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (10V 1,5A güç kaynağı ile/PID kontrolör).



Şekil 4.33. ET4-6-F2-2138-TA-RT-W6 kodlu Peltier elemanın sıcaklık grafiği (10V 1,5A güç kaynağı ile/PID kontrolör).

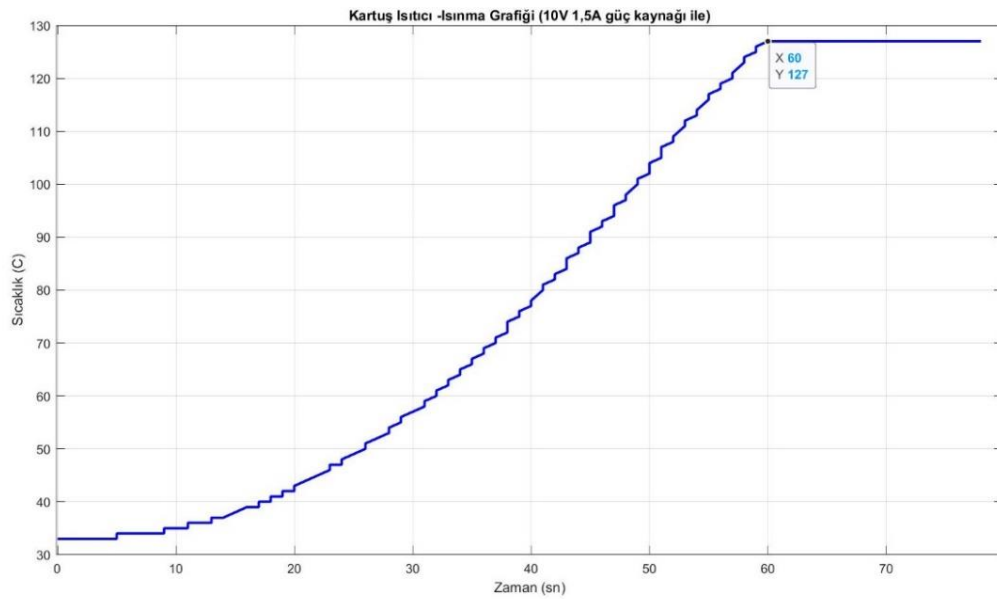
Güç kaynağı 10V ve 1,5A iken $K_p = 5$; $K_i = 0.017$; $K_d = 0.5$ olarak ayarlanan PID kontrolör parametreleri ile Şekil 4.34.'deki grafik elde edilmiştir. İstenilen sıcaklıklar ile ölçülen sıcaklıklar arasında önemli ölçüde farkların olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.34. Ayarlanan PID kontrol parametreleri ile elde edilen PCR grafiği çıktısı.

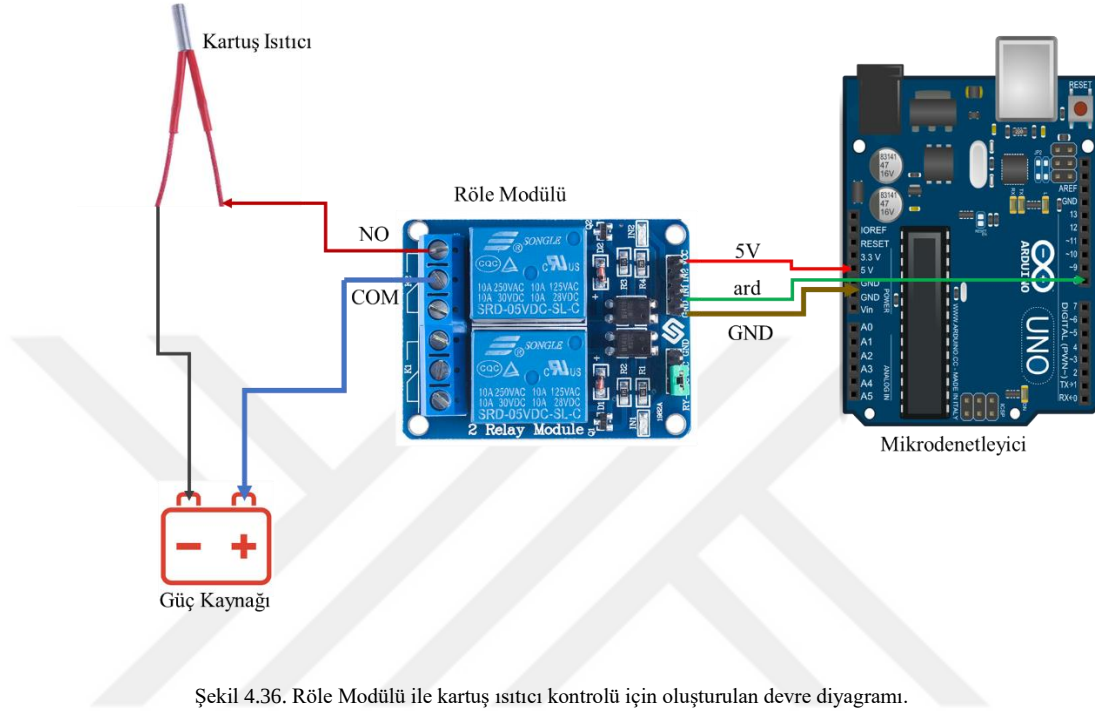
4.5.Röle Modülü ile Kartuş Isıtıcı Sıcaklık Kontrolü

Güç kaynağından uygulanan voltaj ve akım ile kartuş ısıtıcının ısınması sağlanmış ve sıcaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kartuş ısıtıcı kullanılan 10V, 2.5A güç kaynağı ile ~1dk içerisinde 127°C'ye ulaşmıştır (Şekil 4.35.).



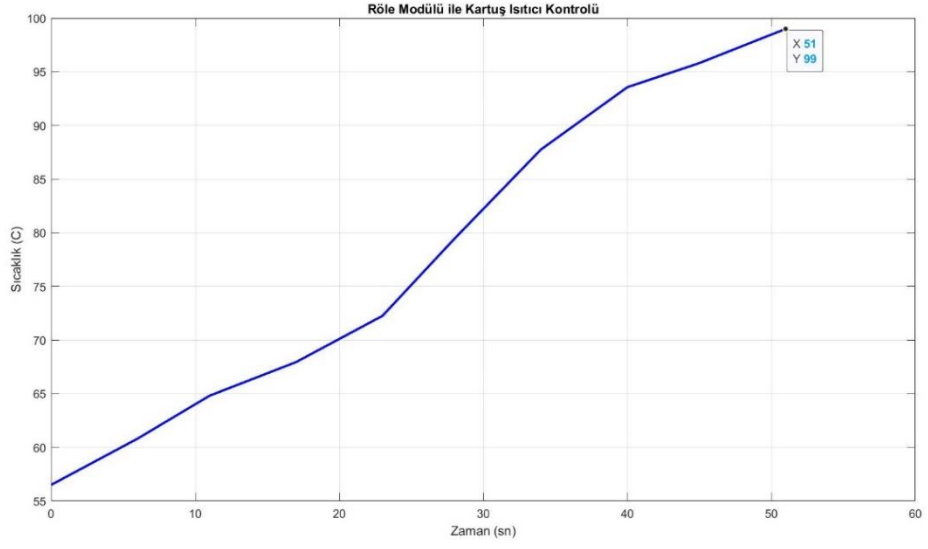
Şekil 4.35. Kartuş Isıtıcı ısınma grafiği.

5V iki kanal röle modülü kullanılarak Şekil 4.36.'da görülen devre oluşturulmuş, sıcaklık sensörü için gerekli bağlantılar yapılmış, kartuş ısıtıcı ve Al kartuş ısıtıcı elemanın ulaştığı sıcaklıklar ölçülmüştür.

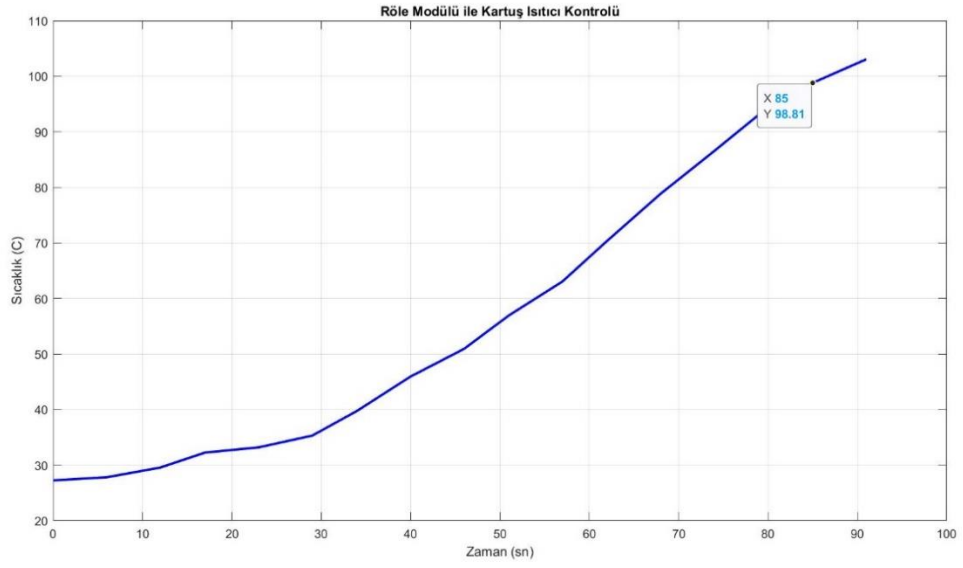


Şekil 4.36. Röle Modülü ile kartuş ısıtıcı kontrolü için oluşturulan devre diyagramı.

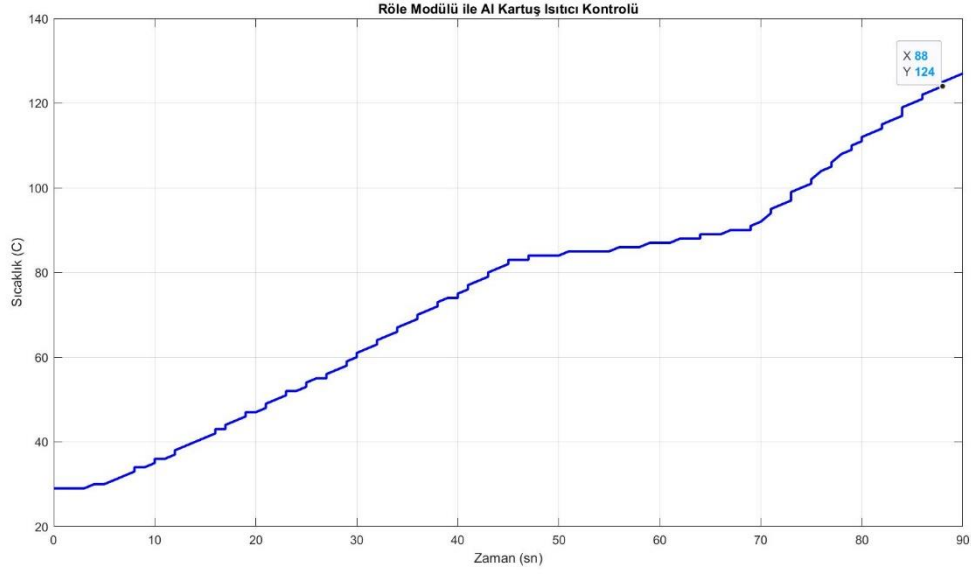
5V iki kanal role modülü ile ilk olarak kartuş ısıtıcı test edilmiştir, Şekil 4.37.'deki ısınma grafiği elde edilmiştir. 8V 1.5A güç kaynağı ile kartuş ısıtıcı ~50 sn içerisinde 50°C'den 100°C'ye ulaşmıştır. Aynı ölçüm kartuş ısıtıcı sıcaklığı 27°C iken başlatılmış, bu durumda kartuş ısıtıcının ~85 sn içerisinde 100 °C'ye ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.38.). Al kartuş ısıtıcı ise aynı ölçüm tekrarlandığında ~90 sn içerisinde 100 °C'ye ulaşmıştır (Şekil 4.39.).



Şekil 4.37. Röle Modülü ile kartuş ısıtıcı kullanımı.



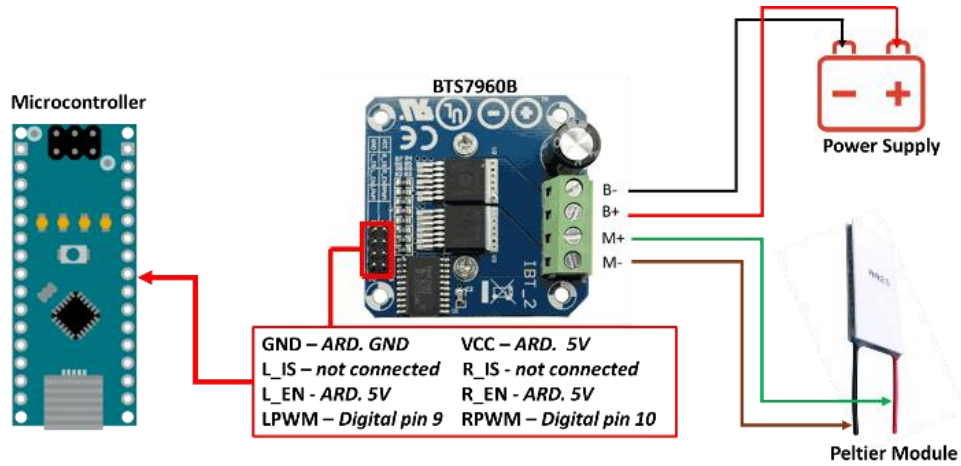
Şekil 4.38. Röle Modülü ile kartuş ısıtıcı kullanımı.



Şekil 4.39. Röle Modülü ile AI kartuş ısıtıcı kullanımı.

4.6.BTS7960 H-Köprü Modülü ve PID Kontrolör ile Peltier Sıcaklık Kontrolü

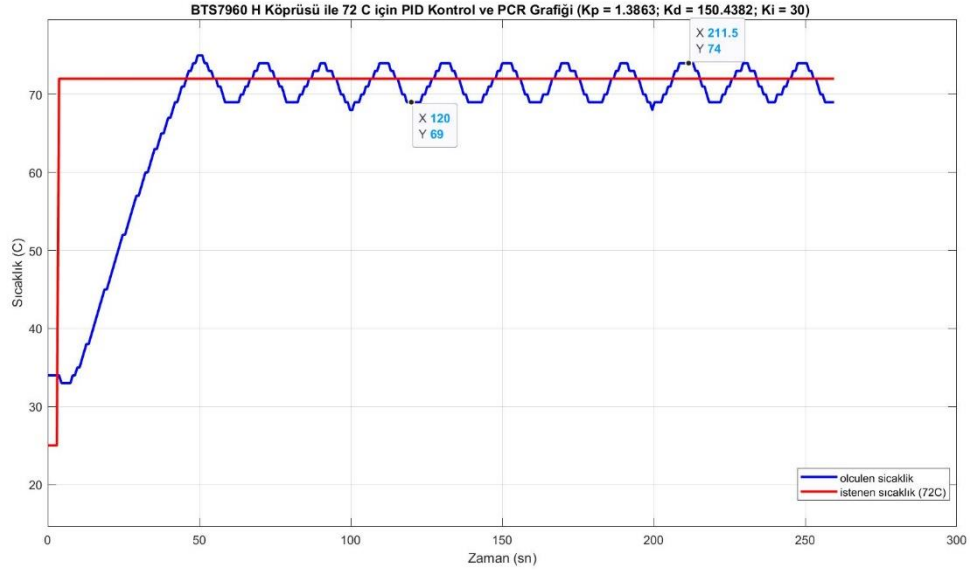
BTS7960 20A H-Köprüsü modülü kullanılarak Şekil 4.40.'da görülen devre oluşturulmuş, sıcaklık sensörü için gerekli bağlantılar yapılmış, Peltier elemanın ulaştığı sıcaklıklar ölçülmüştür.



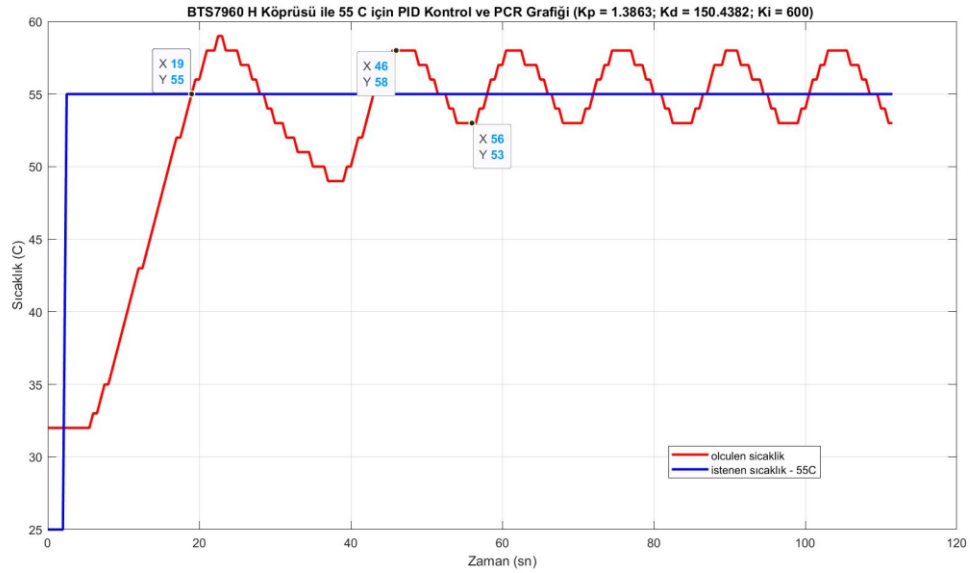
Şekil 4.40. BTS7960B H-köprü modülü ile Peltier eleman kontrolü için oluşturulan devre diyagramı.

İlk olarak Peltier elemanların BTS7960 H-Köprüsü ile ne kadar sürede çalışmada kullanılacak uzama sıcaklığı olan 72°C'ye ve 55°C'ye ulaşacağı üzerinde çalışılmıştır. Güç kaynağı 12V – 5A ayarlanmıştır. MATLAB – PID Tuner Toolbox kullanılarak PID kontrolör

parametreleri bulunmuştur. Bu parametreler kullanılarak sıcaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Peltier elemanın ~45 sn içerisinde 72°C'ye, 20 sn içerisinde 55°C'ye ulaştığı ve aşmaların 3°C ve -3°C arasında olduğu görülmüştür (Şekil 4.41., Şekil 4.42.).



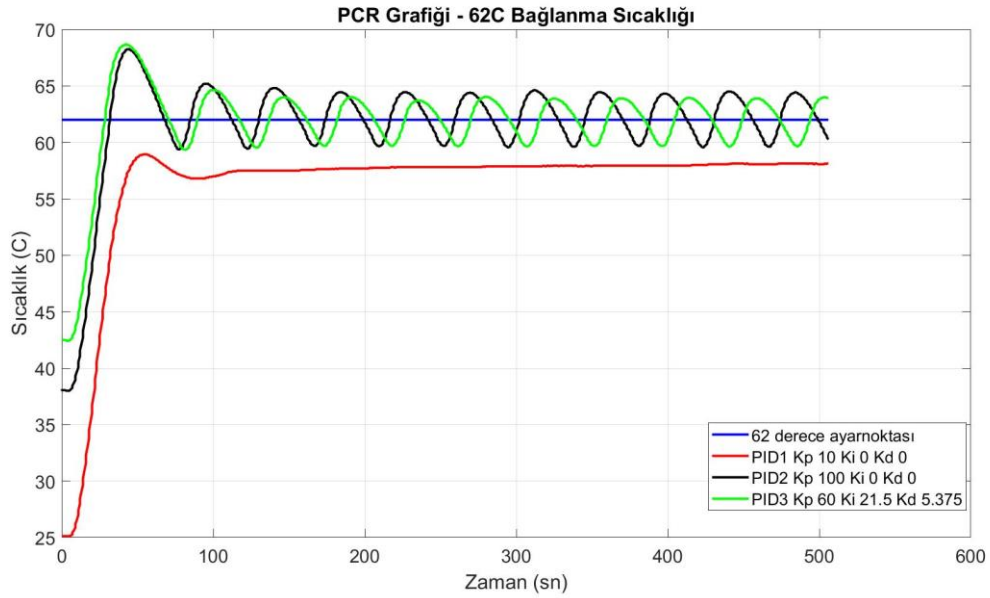
Şekil 4.41. PID kontrolör ve BTS7960 H - Köprüsü ile uzama sıcaklığı kontrolü.



Şekil 4.42. PID kontrolör ve BTS7960 H - Köprüsü ile 55°C bağlanma sıcaklığı kontrolü.

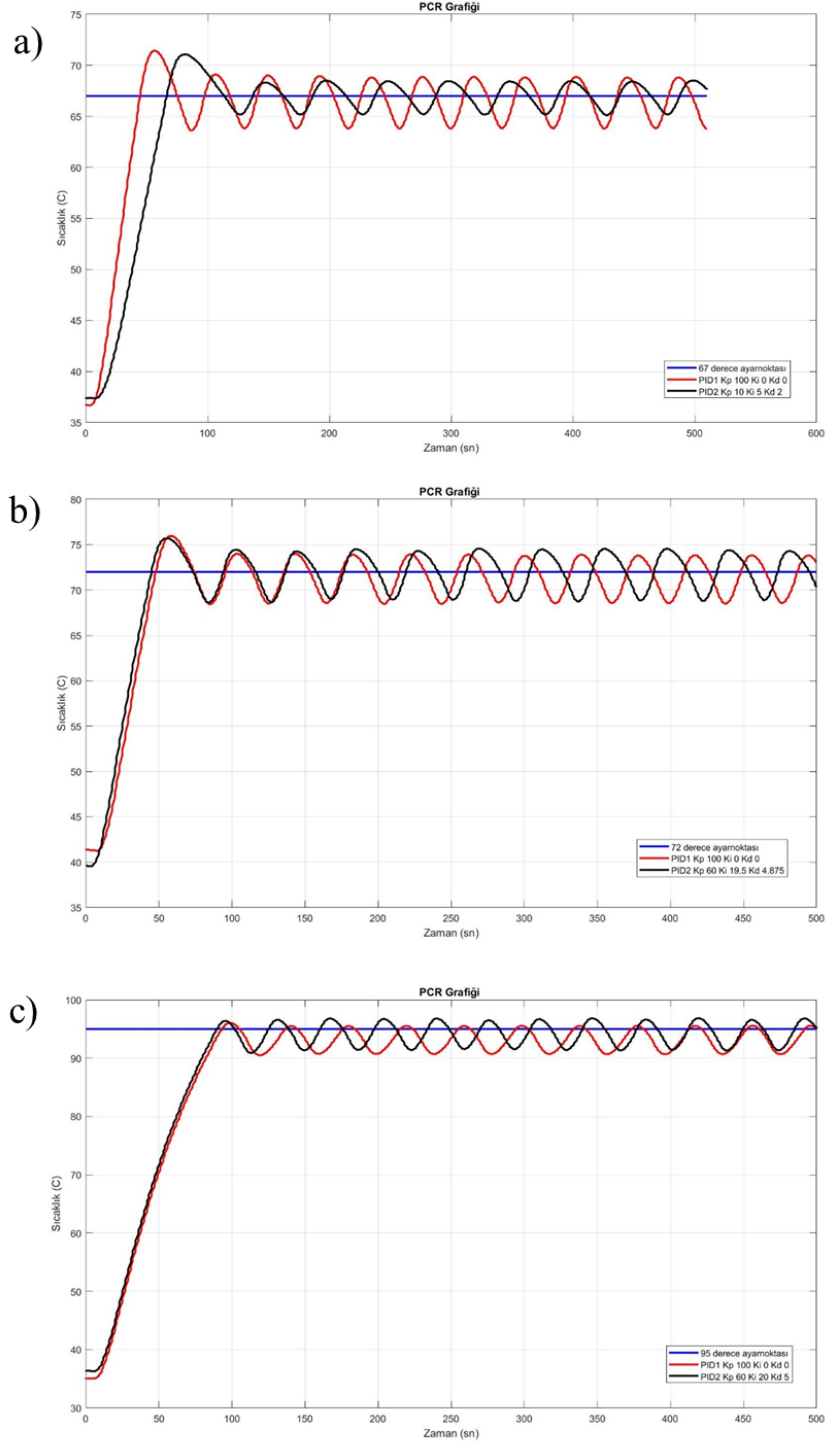
Arduino PID_v1 kütüphanesi kullanılarak ölçümler 62°C bağlanma sıcaklığı için gerçekleştirilmiştir. PID parametreleri Kp, Ki, Kd ilk olarak sırasıyla 10, 0, 0 olarak

ayarlanmıştır. Bu durumda ayar noktası sıcaklığına ulaşılammış, 59 °C'lik sıcaklıkta sabit kalınmıştır. Kp, Ki, Kd sırasıyla 100, 0, 0 olarak ayarlanmış düzenli osilasyon elde edildikten sonra Z-N ayar yöntemi kullanılarak parametreler hesaplanmıştır. Hesaplanan parametreler ile elde edilen grafik Şekil 4.43.'de verilmiştir.



Şekil 4.43. PIDV1 kütüphanesi ve farklı PID parametreleri kullanılarak elde edilen grafik.

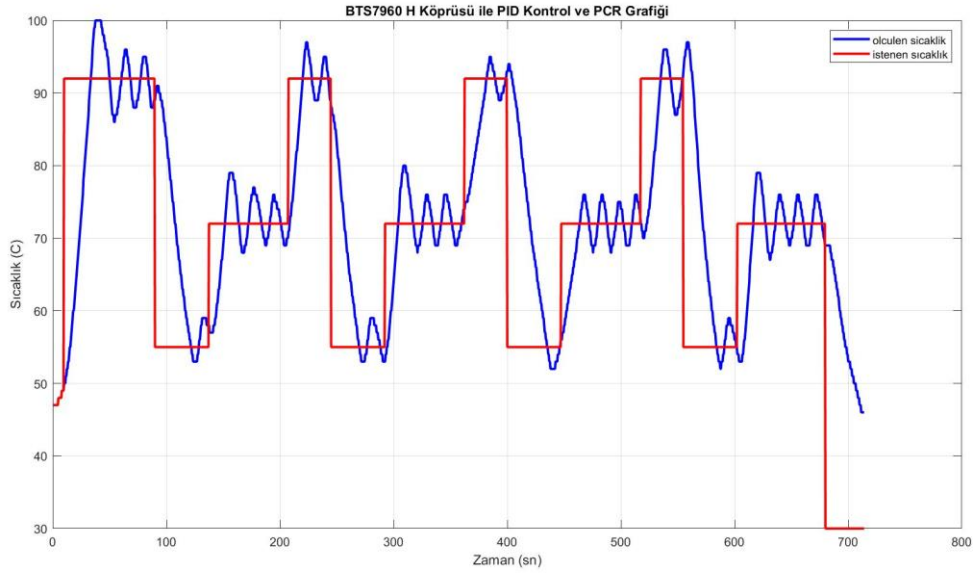
Daha sonra Arduino PID_v1 kütüphanesi kullanılarak ölçümler 67°C, 72 °C ve 95 °C için tekrarlanmıştır. İlk olarak PID parametreleri her sıcaklık için Kp, Ki ve Kd sırasıyla 100, 0 ve 0 olarak ayarlanmış, grafikler elde edilmiştir. Elde edilen grafiklerde düzenli osilasyon elde edildikten sonra periyot hesaplanmış ve Z-N hesaplama yöntemiyle PID parametreleri bulunmuştur. Elde edilen ikinci parametreler ile ölçümler tekrarlanmıştır (Şekil 4.44.a, b, c).



Şekil 4.44. PIDV1 kütüphanesi ve farklı PID parametreleri kullanılarak elde edilen grafikler. a) 67°C bağlanma sıcaklığı, b) 72°C uzama sıcaklığı, c) 95°C denatürasyon sıcaklığı.

Şekil 4.45.'de 2 adet BTS7960B H-Köprüsü kullanılarak elde edilen PCR döngüsü gösterilmiştir. 2 adet peltier tek bir H-köprüsü yerine 2 ayrı H-köprüsüne bağlanarak sıcaklık kontrolü sağlanmıştır. Ölçümler gerçekleştirilirken 12V – 3A güç kaynağı kullanılmıştır. PID kontrolör parametreleri ise sırasıyla Kp 50, Ki 35, Kd 150 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kartuş ısıtıcı ve santrifüjlü fan kontrolü röle modülü aracılığıyla sağlanmıştır. Bu durumda elde edilen PCR grafiğinin diğer H-köprüleriyle elde edilen grafiklere göre daha iyi olduğu görülmüştür. Bu nedenle sıcaklık döngüleyici devresinde BTS7960B H- Köprüsü kullanılmıştır.

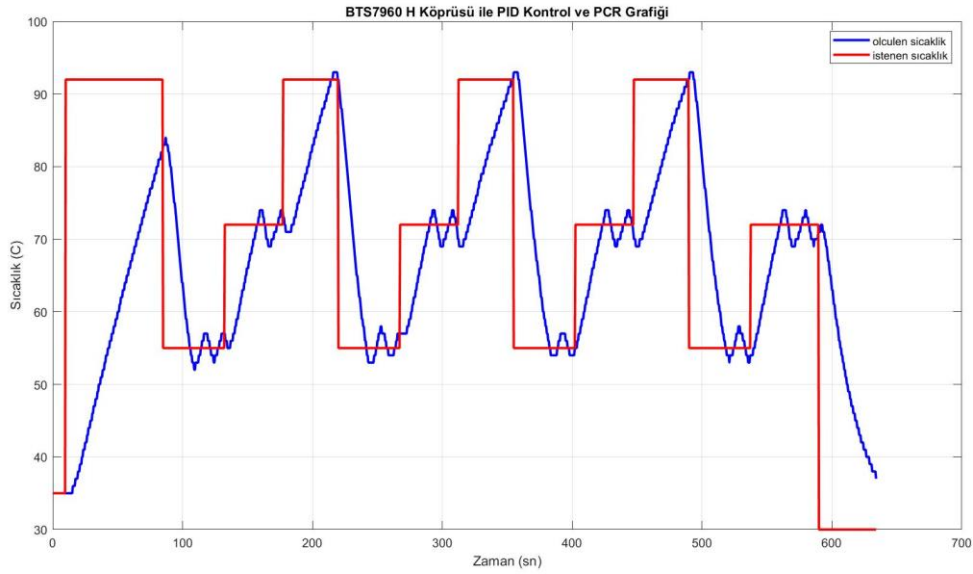


Şekil 4.45. 2 adet peltier elemanın h-köprüleri aracılığı ile kontrol edilmesiyle oluşan PCR grafiği.

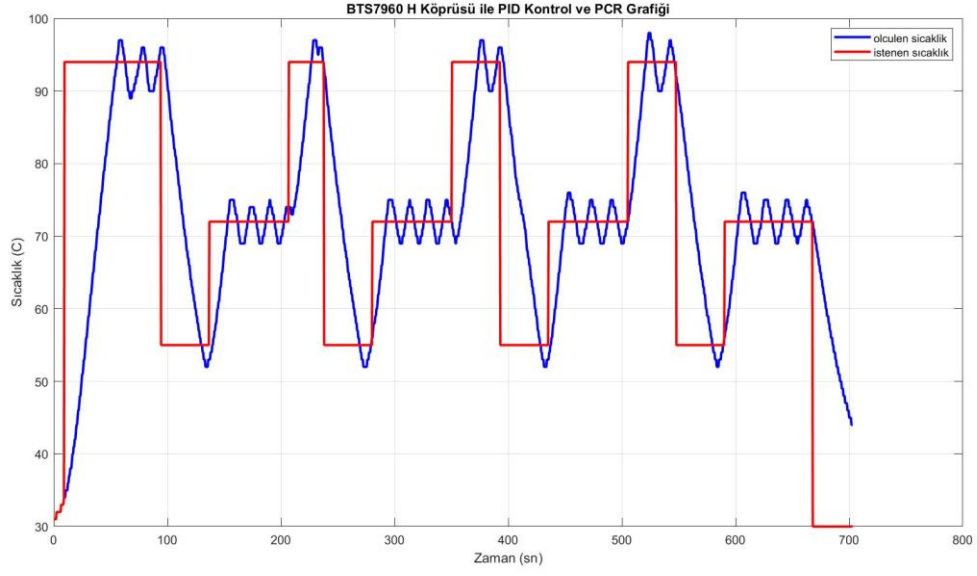
4.7. Sıcaklık Döngüleyici Devresi

Sıcaklık döngüleyici devresinde daha iyi sonuçlar elde edildiği için bundan sonraki çalışmalarda H-Köprüsü olarak BTS7960 kullanılmıştır. Elektronik elemanlardan ise, röle modülü, Peltier elemanlar, kartuş ısıtıcı ve mikrodenetleyici kullanılmıştır. Güç kaynağı olarak 12V – 20A adaptör kullanılmıştır. Hassas sıcaklık kontrolü sağlayabilmek için PID kontrolör kullanılmıştır. Soğumaya yardımcı olması amacıyla Peltier elemanlar yanında santrifüjlü ve sıvı soğutmalı fan kullanılmıştır. Ayrıca Peltier elemanların daha iyi ısıtma ve soğutma sağlaması amacıyla heat sink - soğutucu da kullanılmıştır. Tüm elemanlar bir araya getirilerek sıcaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bazı ölçümler gerçekleştirilirken 12V – 2.5A güç kaynağı da kullanılmıştır. PID kontrolör parametreleri ise ilk denemelerde sırasıyla K_p 10, K_i 3.5, K_d 7.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kartuş ısıtıcı ve santrifüjlü fan kontrolü röle modülü aracılığıyla sağlanmıştır. Peltier elemanların iki farklı H-köprüsü aracılığıyla akım kontrolü sağlanmıştır, her bir H-köprüsü için elde edilen sonuçlar ayrı olarak grafiklerde verilmiştir.

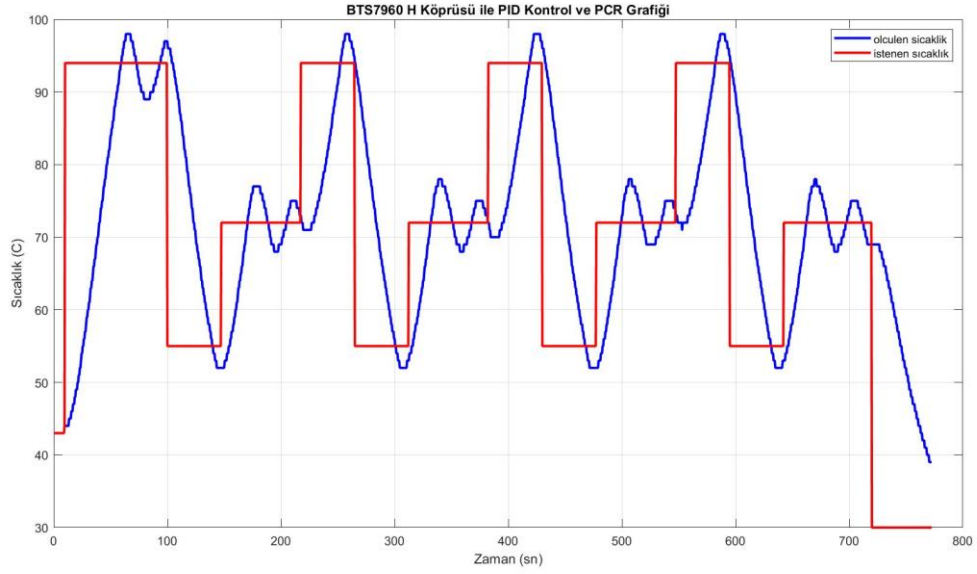
Sıcaklık döngüleyici koşulları dentürasyon, bağlanma, uzama ve dinlenme sıcaklığı olmak üzere dört farklı sıcaklıktan oluşmaktadır. Ayrıca başlangıçta 20 saniyelik ve son uzama adımından sonra 10 dakikalık bir dinlenme süresi de bulunmaktadır. Denatürasyon sıcaklığı 94°C, bağlanma sıcaklığı 55°C, uzama sıcaklığı 72°C ve dinlenme sıcaklığı 30°C olarak ayarlanmıştır. Denatürasyon süresi 60 sn, bağlanma süresi 55 sn, uzama süresi 120 sn olarak belirlenmiştir. Toplam 4 döngüden oluşan PCR süreci 14 dk 30 sn sürmüştür. Elde edilen farklı grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.46., Şekil 4.47., Şekil 4.48.). Kartuş ısıtıcı ve Peltier elemanlar farklı konumlandırıldıklarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.46.'de Peltier elemanlar mikroçip altına, kartuş ısıtıcı ise mikroçip üstüne yerleştirilmiştir. Şekil 4.47.'de ise bütün elemanlar mikroçip altına yerleştirilmiştir. Bu durumda istenilen sıcaklıklara ulaşmada ve bu sıcaklıklarda kalış süresinde önemli derecede artış olmuştur. Şekil 4.48.'de ise soğumaya yardımcı olması amacıyla heat sink eklenmiş bu durumda da daha hızlı sıcaklık düşüşü görülmüştür.



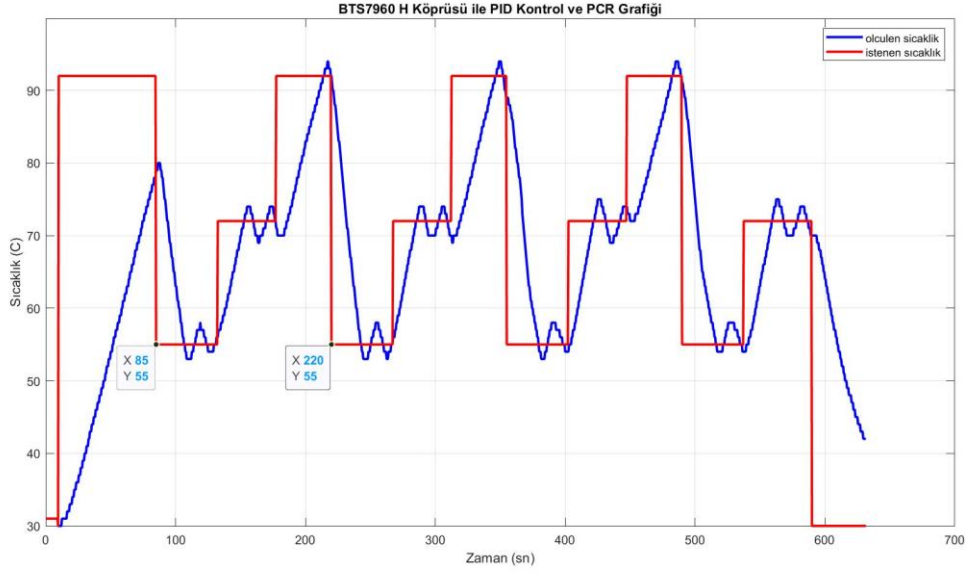
Şekil 4.46. Peltier elemanlar mikroçip altında, kartuş ısıtıcı mikroçip üzerinde konumlandırıldığında oluşan PCR grafiği.



Şekil 4.47. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında oluşan PCR grafiği.



Şekil 4.48. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında ve soğutma elemanı olarak fan-heat sink kullanıldığında oluşan PCR grafiği.



Şekil 4.51. Kartuş ısıtıcı ve peltier elemanlar mikroçip altında konumlandırıldığında ve soğutucu olarak fan ve heat sink kullanıldığında oluşan PCR grafiği (KP = 80; KI = 3.5; KD = 5.5).

4.8. Transfer Fonksiyonu Yöntemini ile Sistemin Modellenmesi ve İncelenmesi

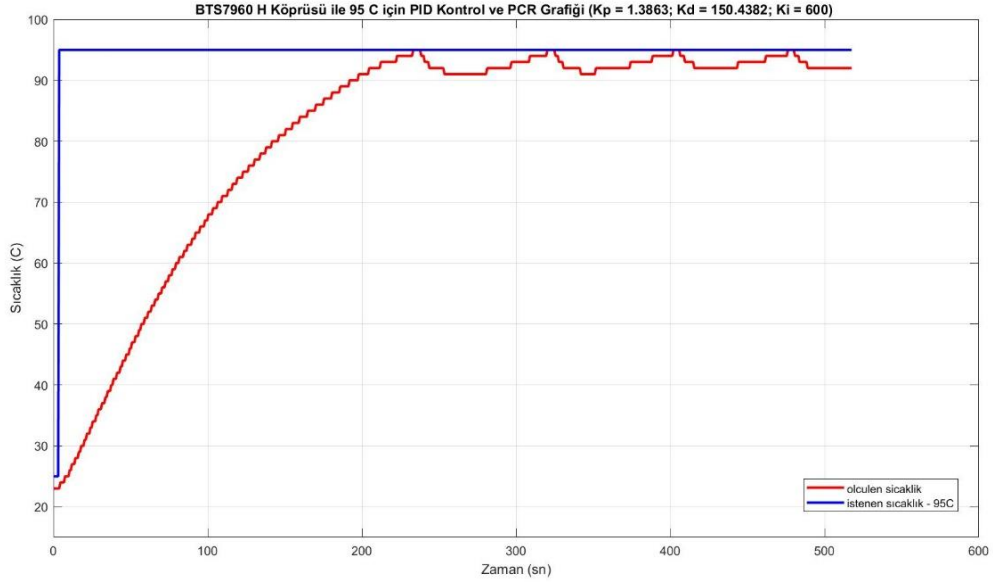
Transfer fonksiyonu yöntemi, otomatik bir sistemin matematiksel tanımıdır ve sistemin incelenmesini kolaylaştırmaktadır. Sistemin transfer fonksiyonu, matematiksel tanımlamanın bir durum denklemi formundan bir transfer fonksiyonu formuna dönüştürülmesiyle oluşturulmaktadır. Bu işlem MATLAB yazılım komutları kullanılarak yapılmıştır.

PID kontrolörler, birçok farklı dinamik "Plant" türünün zaman alanındaki davranışını düzenlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. "Plant" çıktısı kontrol edilen sistemi ifade eder. PID kontrolörünün transfer fonksiyonu ise şu şekilde verilmektedir:

$$G_{PID} = Kp + \frac{K_I}{s} + Kd s = \frac{Kd s^2 + Kp s + K_I}{s} = \frac{Kd [s^2 + \frac{Kp}{Kd} s + \frac{K_I}{Kd}]}{s} \quad (4.1)$$

Bu denklemde Kp, Ki ve Kd PID kontrolör parametreleridir. Bu parametreler istenilen gereksinimlere göre ayarlanabilmektedir. G_{PID} doğrudan sistem transfer fonksiyonuna bağlanabilmektedir [147].

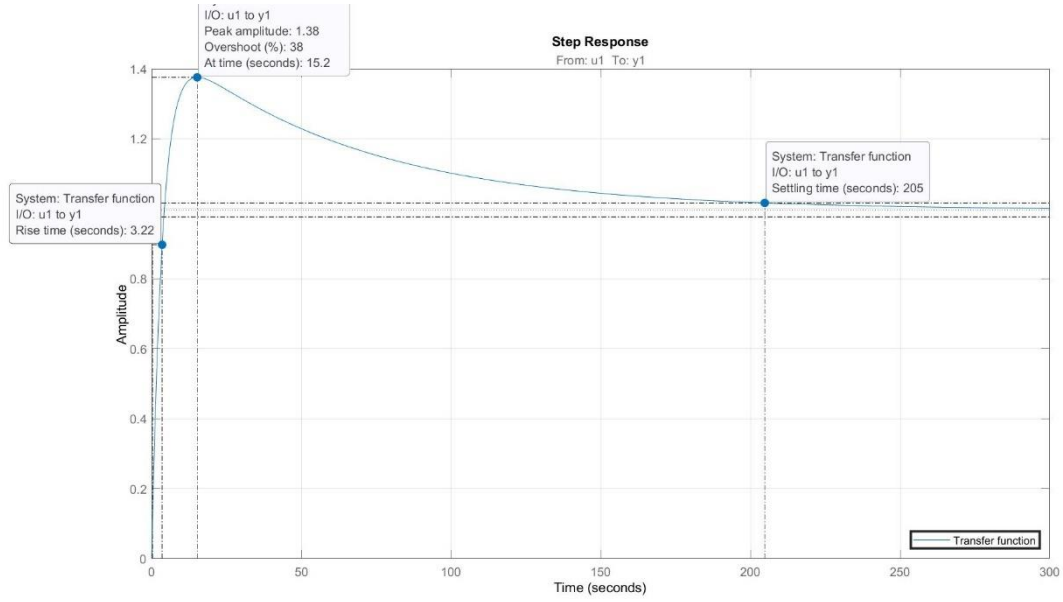
BTS7960 20A H-Köprüsü modülü ve PID kontrolör kullanılarak denatürasyon sıcaklığı olan 95°C'ye ulaşılmış ve bu sıcaklıkta -3 °C aşmalar ile sabit kalınabilmektedir. Elde edilen sıcaklık – zaman grafiği Şekil 4.52.'de verilmiştir.



Şekil 4.52. Denatürasyon sıcaklığının PID kontrolör kullanımı sonucunda elde edilen grafiği.

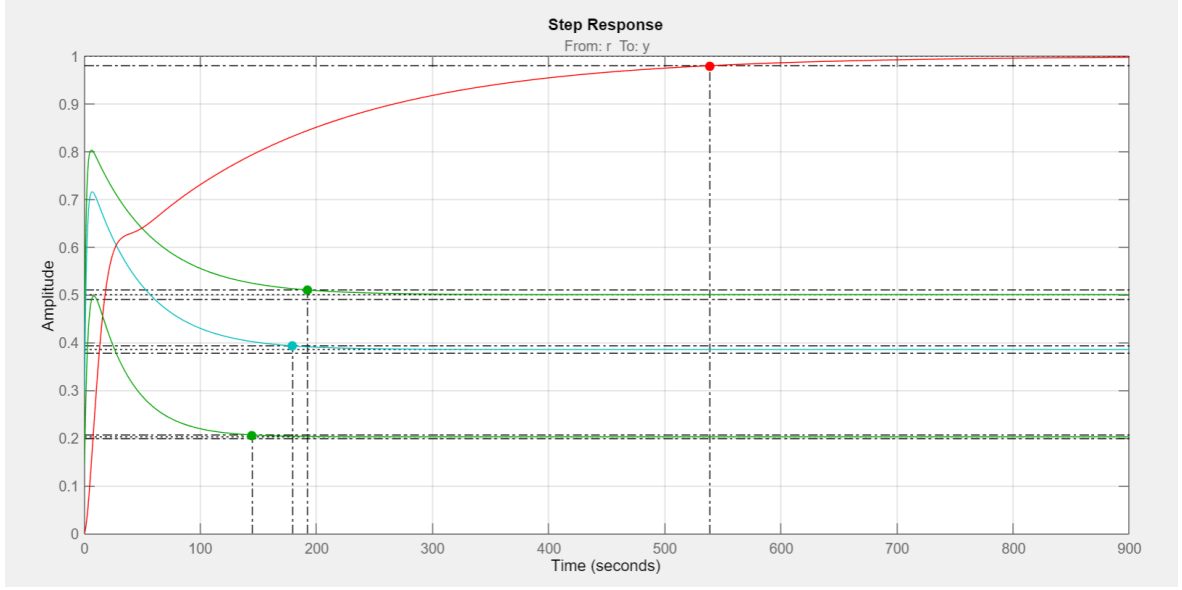
Daha sonra elde edilen veriler ile MATLAB yazılım komutları kullanılarak sistemin transfer fonksiyonu elde edilmiştir. Bu transfer fonksiyonun ($G1(s)$) adım tepkisi Şekil 4.53.'de verilmiştir.

$$G1(s) = \frac{0.4038s + 0.004314}{s^2 + 0.2888s + 0.004328} \quad (4.2)$$

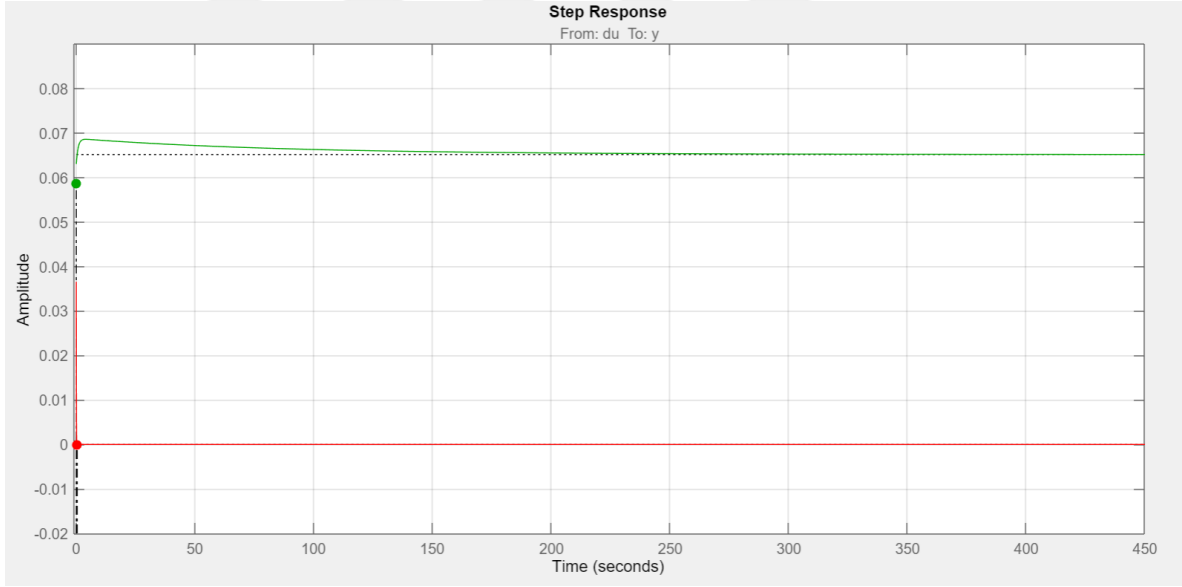


Şekil 4.53. Kapalı döngü sistemin $G1(s)$ transfer fonksiyonunun adım tepkisi. (Yükselme Süresi: 3.2181, Geçiş Süresi: 204.7715, Yerleşme Süresi: 204.7715, +Aşma: 38.0403, -Aşma: 0, Pik: 1.3757, Pik Süresi: 15.1866).

Elde edilen transfer fonksiyonu ile MATLAB yazılımında bulunan “Control System Designer Toolbox” kullanılarak farklı kontrolör parametreleri ile sonuçlar incelenmiştir. P kontrolör, PI kontrolör, PD kontrolör ve PID kontrolör kullanılarak elde edilen adım tepkisi grafiği karşılaştırmalı olarak Şekil 4.54.’de verilmiştir. En hızlı yükselme süresi PD kontrolör kullanıldığında elde edilmiştir. Ayrıca Z-N adım tepkisi formülleri kullanılarak da karşılaştırmalar yapılmıştır (Şekil 4.55.). Z-N formülleri kullanıldığında elde edilen adım tepkisi grafiklerinde PI kontrolör ve PID kontrolör arasında bir fark görülmemiştir. Sadece P kontrolör kullanıldığında ise daha yavaş yükselme süresi olduğu görülmüştür.

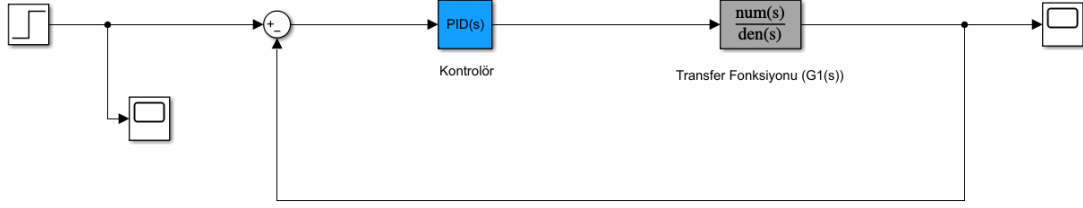


Şekil 4.54. Yeşil P kontrolör, Turkuaz PI kontrolör, Açık yeşil PD kontrolör ve kırmızı PID kontrolöre ait Adım tepkisi grafikleri.

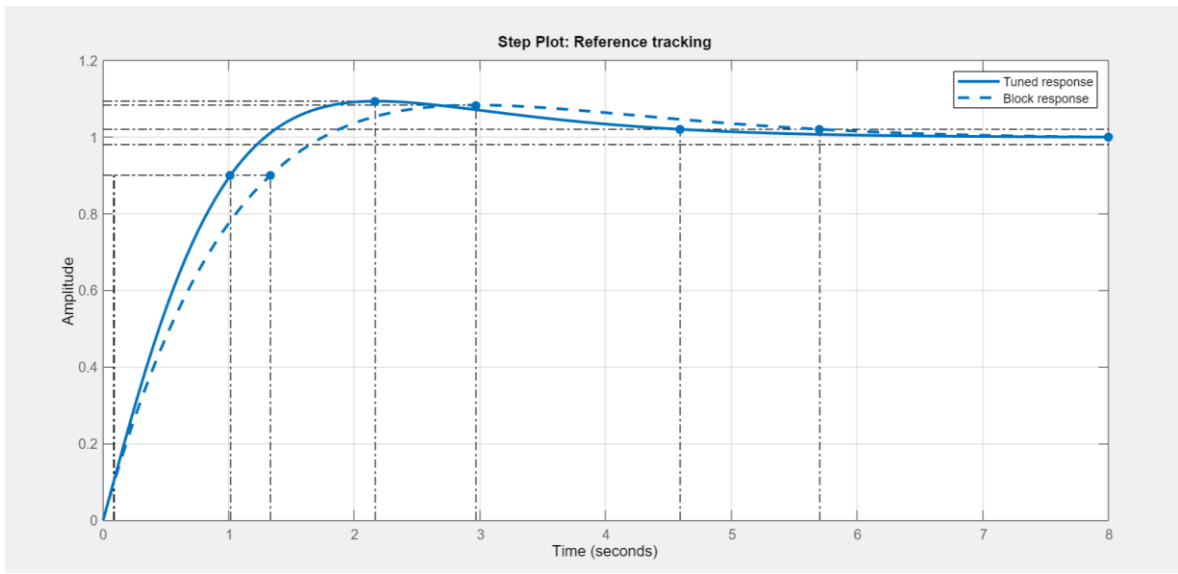


Şekil 4.55. P kontrolör (Yeşil), PI kontrolör (kırmızı), PID kontrolör (kırmızı) ve Ziegler – Nichols formülleri kullanılarak elde edilen adım tepkisi grafikleri.

Kontrol parametrelerini ayarlama işlemi MATLAB Simulink ve PID Tuner Toolbox kullanılarak da yapılabilmektedir. Aşağıda kapalı çevrim sistemin Simulink modeli verilmiştir (Şekil 4.56.). PID kontrolör parametreleri PID Tuner Toolbox kullanılarak ayarlanmıştır. Elde edilen adım tepkisi grafiği ise Şekil 4.57.’de verilmiştir.

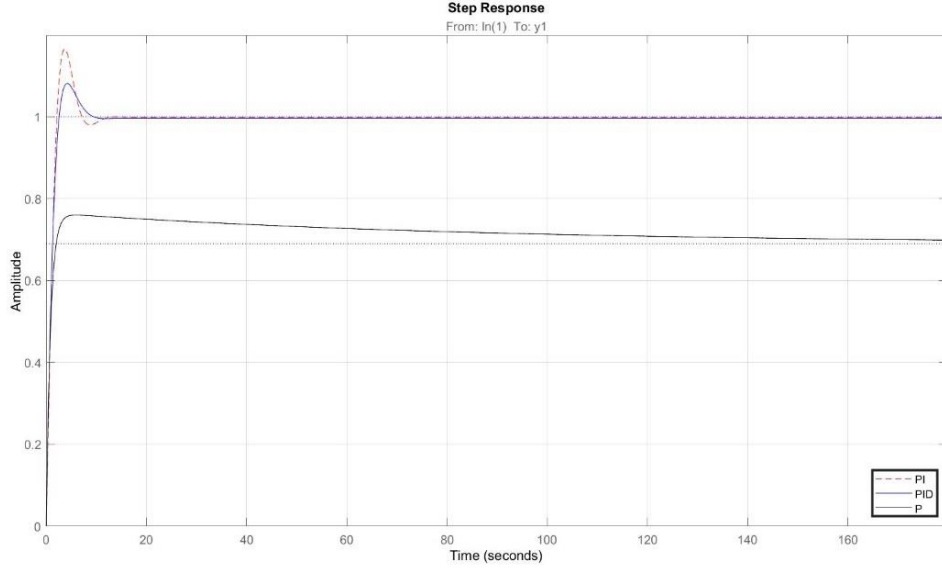


Şekil 4.56. Kapalı Çevrim Sistemin (95°C) PID Kontrolör ile Simulink Modeli.



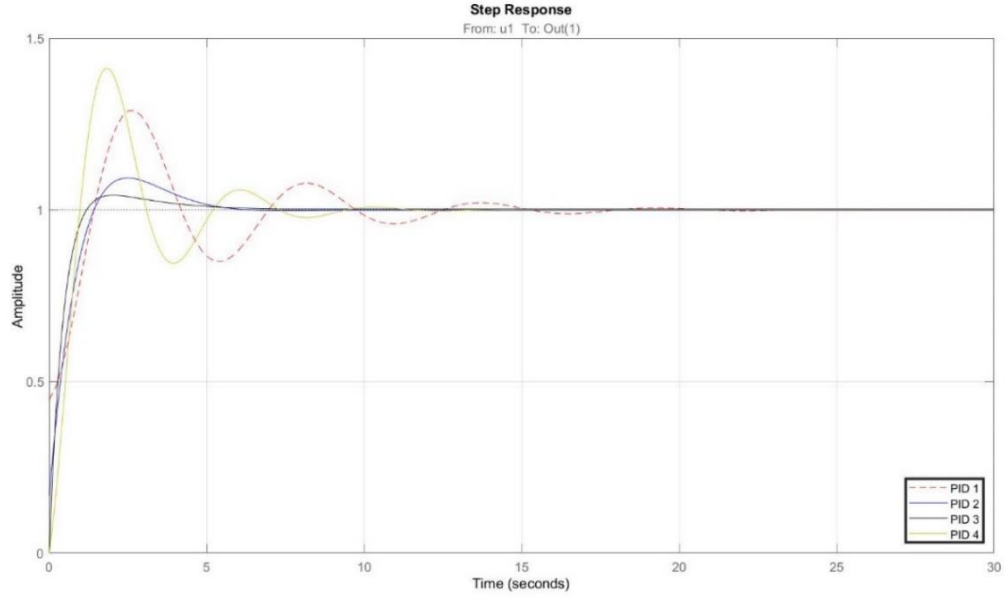
Şekil 4.57. MATLAB Simulink ve PID Tuner Toolbox kullanılarak elde edilen Adım tepkisi grafiği.

$G1(s)$ transfer fonksiyonunun MATLAB yazılımında “pidtune” fonksiyonu kullanılarak sistemin cevabı incelenmiştir. P kontrolörün K_p değeri 2,23, PI kontrolörün K_p değeri 1.49 ve K_i değeri 1.42 olmuştur. PID kontrolör parametreleri ise $K_p = 1.85$, $K_i = 1.07$ ve $K_d = 0$ olmuştur. Bu durumda elde edilen grafik Şekil 4.58.’de verilmiştir. PI kontrolör geçmişteki kontrolör hatalarından yararlanarak hesaplanmaktadır. Dolayısıyla gelecekteki hatalar için herhangi bir işlem gerçekleştirmemektedir. Bu durum sistemde salınımlar oluşturmaktadır. PID kontrolör kullanımının bu durumda önemi anlaşılmaktadır.

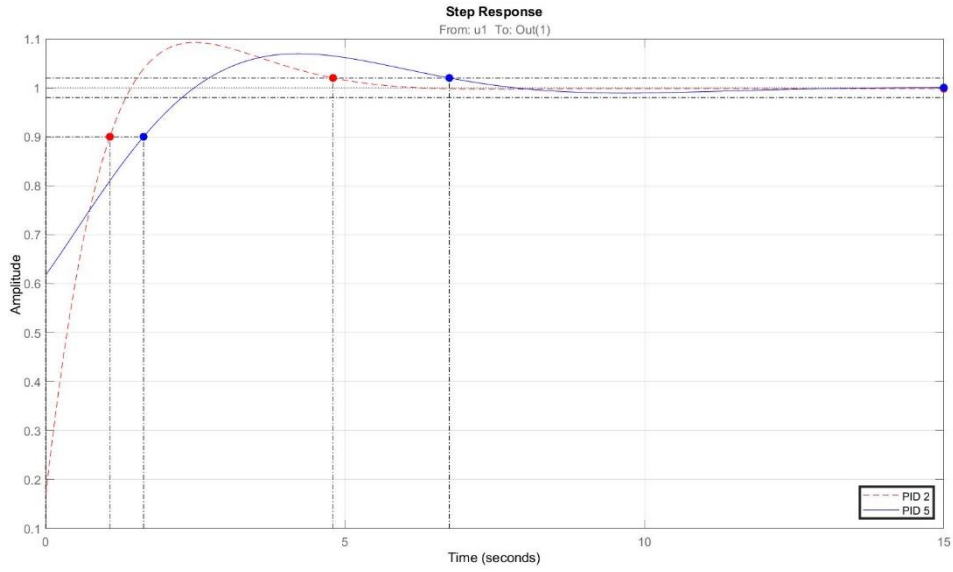


Şekil 4.58. Farklı kontrolör parametreleri ile elde edilen adım tepkisi grafiği.

Daha sonra PID kontrolör parametreleri manuel olarak “pid” ve “feedback” fonksiyonu kullanılarak kapalı çevrim sistemin adım tepkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.59.’da verilmiştir. Aşmaları azaltmak için türev kontrolörün mutlaka kullanılması gerektiği görülmüştür. Kararlı durum hatasını azaltabilmek için ise integral kontrolörün kullanılması gerekmiştir. Tablo 4.1.’e göre en yüksek aşma PID4’te görülmüştür. PID4 parametrelerinde türev kontrolör değeri sıfır olarak tanımlandığı için bu durum gözlenmiştir. En iyi sonuçlar PID2 kontrolör parametreleri ile elde edilmiştir. PID2’de aşmalar PID3’e göre fazla olsa da yükselme ve geçiş süreleri daha iyi elde edilmiştir. PID2’deki aşmalar kontrolör parametrelerinin değiştirilmesiyle azaltılabilmektedir (Şekil 4.60.).



Şekil 4.59. Adım tepkisi grafiği (PID 1 $K_p=1.43$; $K_i=6$; $K_d=2$, PID 2 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=0.5$, PID 3 $K_p=6$; $K_i=3$; $K_d=0$, PID 4 $K_p=1.6$; $K_i=6$; $K_d=0$).



Şekil 4.60. PID2 ve PID5' e ait adım tepkisi grafikleri (PID2 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=0.5$ ve PID5 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=4$).

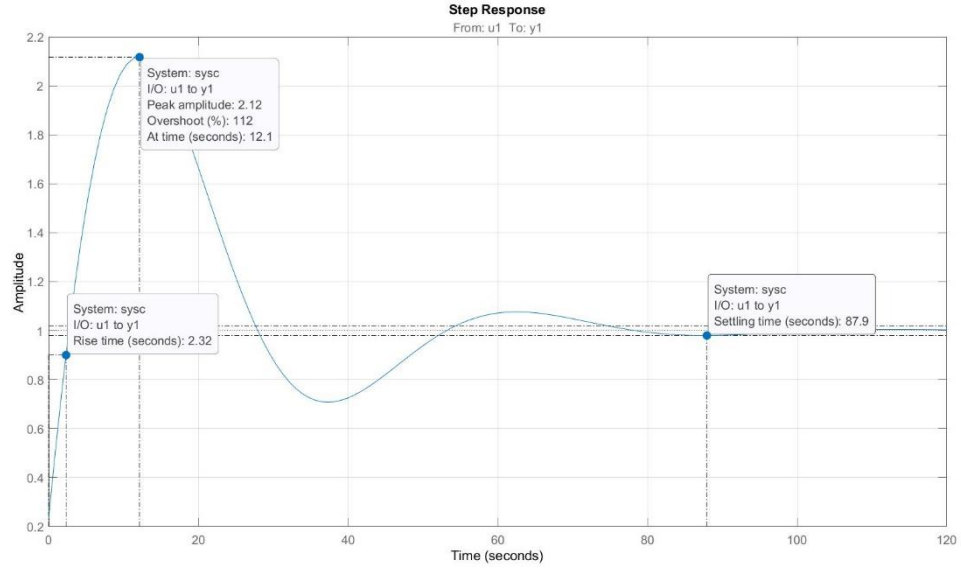
Tablo 4.1. Farklı PID kontrolör parametreleri kullanılarak elde edilen sonuçlar (95°C).

	PID 1	PID 2	PID 3	PID 4	PID 5
Yükselme Süresi (sn)	1.2054	1.0723	0.7514	0.7439	1.6340
Geçiş Süresi (sn)	16.6931	4.9438	3.8114	8.4955	11.1152
Yerleşme Süresi (sn)	13.9019	4.7986	3.8114	8.4955	6.7406
Aşma (%)	28.8857	9.2564	4.2324	41.2245	6.9736
Pik Süresi (sn)	2.5298	2.5141	2.0303	1.7939	4.1982

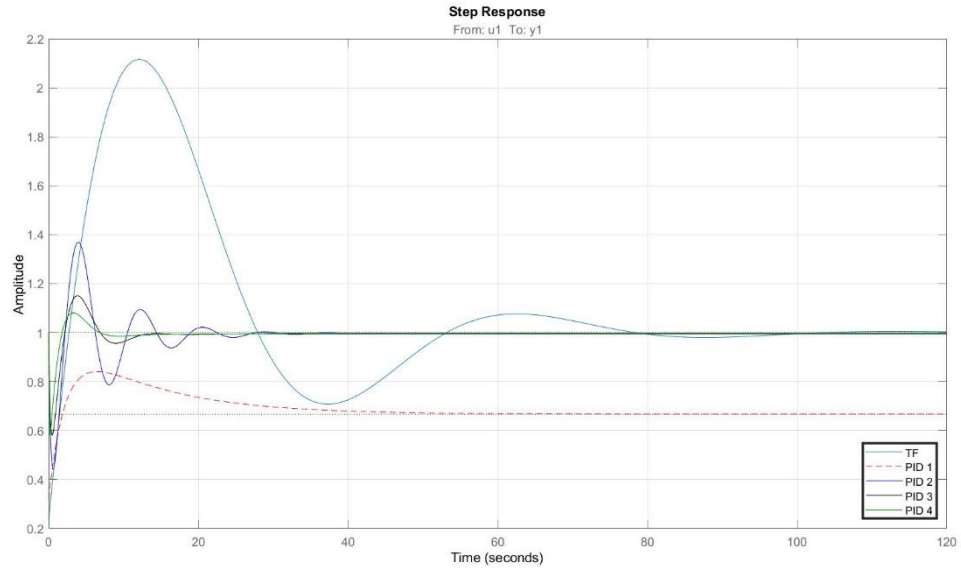
Transfer fonksiyonu yöntemi uzama sıcaklığı (72°C) için kullanılmış ve analizler MATLAB yazılımı kullanılarak tekrarlanmıştır. Sürekli zaman $G2(s)$ transfer fonksiyonu aşağıda verilmiştir:

$$G2(s) = \frac{0.2388s^2 + 0.337s + 0.01834}{s^2 + 0.1063s + 0.01834} \quad (4.3)$$

$G2(s)$ transfer fonksiyonun adım tepkisi Şekil 4.61.'de verilmiştir. Daha sonra PID kontrolör parametreleri manuel olarak "pid" fonksiyonu ile ayarlanmış ve kapalı çevrim sistemin adım tepkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.62.'de verilmiştir. Aşmaları azaltmak için türev kontrolörün kullanılmış, kararlı durum hatasını azaltabilmek için ise integral kontrolör kullanılmıştır. Oransal kontrolörün sıfır olduğu durumda ise aşmalar ve salınımlar önemli ölçüde artmıştır. En yüksek K_p değeri PID 4 kontrolörde olduğu için en düşük aşma bu kontrolör ile sağlanmıştır (Tablo 4.2.).



Şekil 4.61. Kapalı döngü sistemin $G_2(s)$ transfer fonksiyonunun adım tepkisi. (RiseTime: 2.3154 TransientTime: 74.1830 SettlingTime: 87.9423 Overshoot: 111.6647 PeakTime: 12.1347).

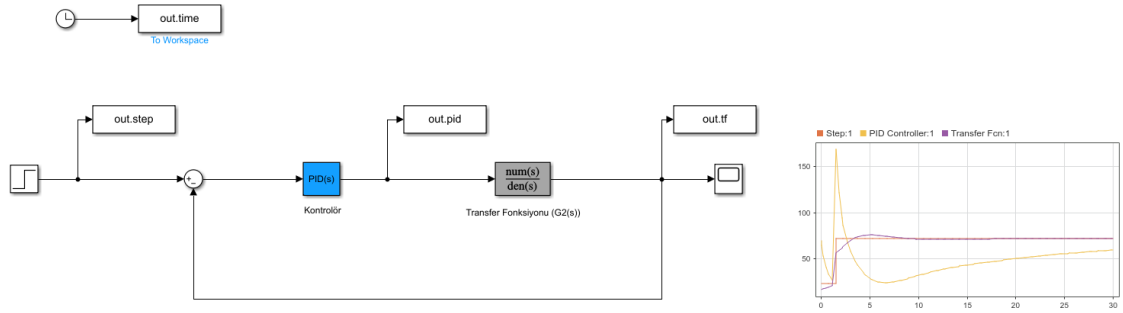


Şekil 4.62. Adım tepkisi grafiği (PID 1 $K_p=2$; $K_i=0$; $K_d=0$, PID 2 $K_p=0$; $K_i=2.5$; $K_d=1.5$, PID 3 $K_p=2$; $K_i=2.5$; $K_d=1.5$, PID 4 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=0.5$)(TF; Transfer Fonksiyonu).

Tablo 4.2. Farklı PID kontrolör parametreleri kullanılarak elde edilen sonuçlar (72°C).

	TF G2(s)	PID 1	PID 2	PID 3	PID 4
Yükselme Süresi (sn)	2.3154	1.3189	0	0	0
Geçiş Süresi (sn)	74.1830	47.5211	26.1960	12.6364	13.8004
Yerleşme Süresi (sn)	87.9423	39.6068	21.0254	11.3885	5.8513
Aşma (%)	111.6647	26.1187	36.9257	15.0443	8.1090
Pik Süresi (sn)	12.1347	6.4276	3.9424	3.8518	3.2652

Kapalı çevrim sistemin Simulink modeli aşağıda verilmiştir (Şekil 4.63.).

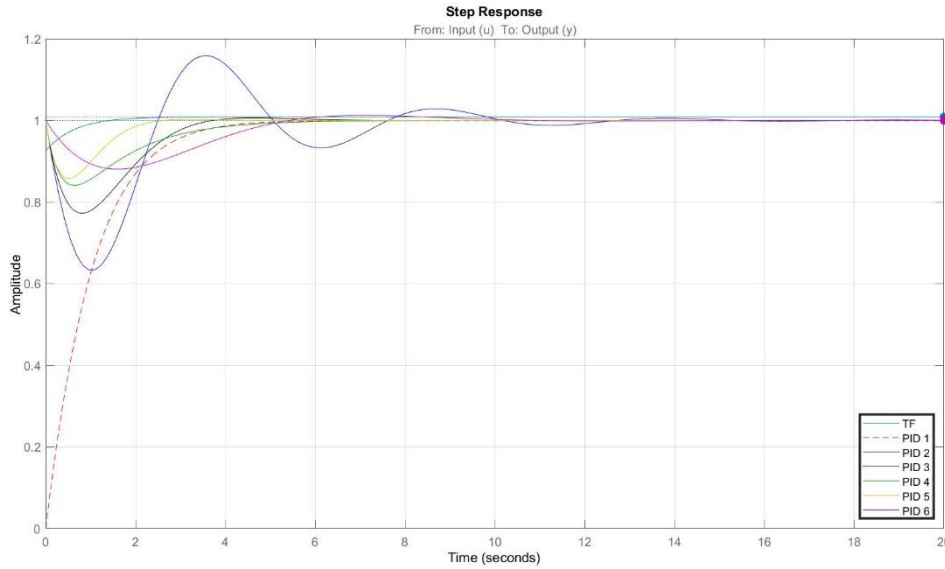


Şekil 4.63. Kapalı Çevrim Sistemin (72°C) PID Kontrolör ile Simulink Modeli.

Transfer fonksiyonu yöntemi bağlanma sıcaklığı (55°C) için kullanılmış ve analizler MATLAB yazılımı kullanılarak tekrarlanmıştır. Sürekli zaman G3(s) transfer fonksiyonu aşağıda verilmiştir. G3(s) transfer fonksiyonu tek kutup ve tek sifra sahiptir.

$$G3(s) = \frac{0.5966s+1.009}{0.6447s+1} \quad (4.4)$$

PID kontrolör parametreleri manuel olarak “pid” fonksiyonu ile ayarlanmış ve kapalı çevrim sistemin adım tepkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.64.’de verilmiştir. En yüksek aşma yüzdesi K_p oransal kontrolör değeri sıfır olduğunda gözlenmiştir. En düşük yükselme süresi ise K_p ve K_d değerleri sıfır olarak ayarlandığında gözlenmiştir.



Şekil 4.64. Adım tepkisi grafiği (PID 1 $K_p=0$; $K_i=1$; $K_d=0$, PID 2 $K_p=0$; $K_i=2.5$; $K_d=1.5$, PID 3 $K_p=2$; $K_i=2.5$; $K_d=1.5$, PID 4 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=1.5$, PID 5 $K_p=4$; $K_i=6$; $K_d=1.5$, PID 6 $K_p=4$; $K_i=3$; $K_d=6$;) .

4.9.DNA Amplifikasyonu için PCR Protokolü

Tablo 4.3.’de konvansiyonel PCR cihazı ve çip üzerinde gerçekleştirilen PCR işleminde kullanılan PCR örneğine ait bileşim oranları verilmiştir. Bax primerine ait sentetik DNA örneği amplifiye edilmek için kullanılmıştır. 31,5 μ l’lik 24 mm x 50 mm boyutlarındaki 25 μ l’lik örnek PCR çipi ve konvansiyonel PCR cihazına ait reaksiyon tüpüne yerleştirilmiş, PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. DNA örneğinin geri primer dizisi 5’- ATC CAG CCC AAC AGC CGC-3’ ve İleri primer dizisi 5’-ATG GAC GGG TCC GGG GAG 3’ şeklindedir. Erime sıcaklığı T_m 61 °C’dir. PCR protokolünde bağlanma sıcaklığı bu primer için 60.5 °C veya 62 °C olarak ayarlanmıştır. 45 döngülük PCR işlemi ile deneyler gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3. PCR işlemi için örneğin bileşim oranı.

Ad	Hacim	Açıklama
<i>Deiyonize Su</i>	4,55 µl	-
<i>Kalıp DNA</i>	2 µl	cDNA
<i>dNTP</i>	0,25 µl	-
<i>Primer 1</i>	1,5 µl	İleri
<i>Primer 2</i>	1,5 µl	Geri
<i>Enzim</i>	0,2 µl	Taq
<i>Reaksiyon Tamponu</i>	12,5 µl	-
<i>DMSO</i>	2,5 µl	Primer dimeri temizlemek için

4.10. Malzeme Listesi

Mevcut sistem, kaynakların yetersiz olduğu ülkelerde kullanılmak üzere uygun maliyetli bir çözüm olarak tasarlanmıştır. Sistemin malzeme maliyeti (Tablo 4.4.) yaklaşık 7000 TRY (219 \$) olmuştur.

Tablo 4.4. Tasarımda Kullanılan Ana Parçalar.

Parça	Miktar/Boyut	Maliyet (Toplam)
Peltier Eleman 1	1 (44.70mm L x 40.13mm W)	1200 TRY
Peltier Eleman 2	1 (40.00mm L x 23.00mm W)	1900 TRY
CPU Fan	1	1200 TRY
Santrifüjlü/Salyangoz Fan	2	100 TRY
Mikrodenetleyici	1	160 TRY
PCB	1	800 TRY
Bluetooth Modül	1	60 TRY
Sıcaklık Sensörü	1	65 TRY
H-Köprüsü	2	180 TRY
DSA	Rulo	-
PMMA	50 cm x 50 cm	300 TRY
Lamel	22 x 22, 24 x 32, 24 x 50	300 TRY
Röle	1	50 TRY
12V – 20 A güç kaynağı	1	300 TRY
Al kompozit	2	300 TRY
Diğer (kablo, bant, yapıştırıcı, lehim vs.)	-	100 TRY
Lazer kesici	-	100 TRY
Toplam maliyet		7115 TRY
İmalat/Montaj Zamanı		24 s

5. SİMÜLASYONLAR

5.1. Laminar Akış ve Isı Transferi Simülasyonu

COMSOL Multiphysics® hesaplamalı akışkanlar dinamiği (CFD) için araçlar sağlamaktadır. Akışkan akışının modellenmesi, yeni cihaz ve süreçlerin geliştirilmesinde giderek daha önemli hale gelmektedir. CFD, makine, kimyasal, sivil, havacılık ve ayrıca biyomedikal mühendisliği gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Mevcut hesaplama modeli sayesinde, tasarım parametrelerinin PCR döngüsünün performansı üzerindeki etkileri anlaşılabilir ve mikroakışkan PCR cihazının optimizasyonu için kullanılabilir.

Katılarda Isı Transferi Modülü (Heat Transfer in Solids), mikroçip üzerindeki sıcaklık alanını elde etmek için kullanılacaktır. Ayrıca akışkan malzemenin termofiziksel özellikleri sıcaklığa bağlıdır. Bu nedenle Isı transferi ve Laminar akış modülü birlikte kullanılacaktır.

COMSOL Multiphysics kullanıcılara hesaplama alanı için “mesh” oluşturma için çeşitli yollarını sunmaktadır. Bu durum “extremely coarse”, “extra coarse”, “coarser”, “coarse”, “normal”, “fine”, “finer”, “extra fine”, ve “extremely fine” olarak adlandırılan önceden tanımlanmış fizik kontrollü ağ yapısı kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu seçeneklerden biri seçildiğinde program ağı önceden tanımlanmış ağ boyutu parametreleriyle otomatik olarak oluşturmaktadır.

Laminar Akış Simülasyonu:

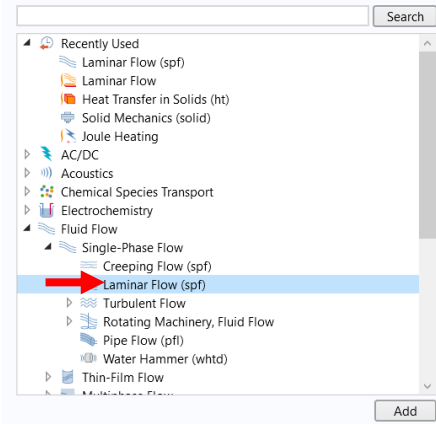
- Akışkan, mikrokanal alanına sabit bir U_0 hızında girecek şekilde ayarlanacaktır.
- Akış sıkıştırılamaz olarak ayarlanacak (incompressible) ve çıkış basıncı sıfır referans basınca ayarlanacaktır. Çıkış basıncının değeri önemli değildir çünkü sıkıştırılamaz akışlar için basıncın termodinamik anlamı önemsiz olmaktadır.
- Düzgün akış içine yerleştirilmiş bir silindir durumunu simüle etmek için (mikrokanalet malzeme giriş/çıkış silindiri), üst ve alt sınır koşulları "slip" olarak ayarlanacaktır, böylece sınırlar akışa kesme kuvveti uygulamayacaktır. Bu şekilde istenmeyen duvar etkileri en aza indirgenmektedir.

- Problem Reynolds sayısı ile ele alınmıştır: $Re = \frac{\rho U_0 L_0}{\mu}$, Küçük Re değerleri (<2000) için akış sabit kalacak ve daha yüksek değerler için zamanda periyodik hale gelecektir. Burada ρ yoğunluk ve μ dinamik viskoziteyi ifade etmektedir, ayrıca L_0 mikrokanalın uzunluğunu belirtmektedir. Her durumda da $\rho = 1$ ve $\mu = 1$ kullanılacaktır. Ayrıca farklı giriş hızları (U_0) kullanılacaktır. Su veya hava gibi gerçek bir akışkanı ve özelliklerini kullanmak da COMSOL Multiphysics ile gerçekleştirilebilmektedir.

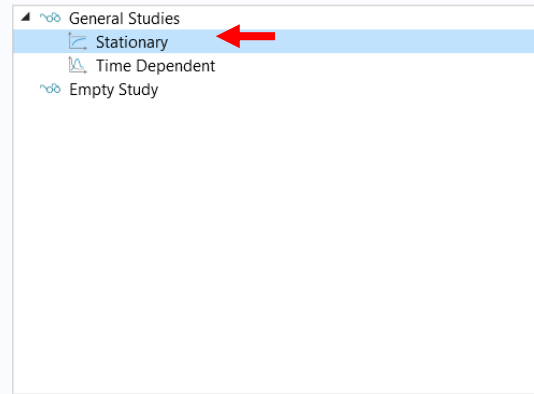
Laminar Akış Simülasyonu İşlem Adımları:

- COMSOL Multiphysics uygulaması çalıştırılarak “Model Wizard” menüsünden 2 Boyutlu Model seçilmiştir. Akışkan akışını modellemek için “Fluid Flow” ardından “Single Phase Flow” menüsünden “Laminar Flow” seçilmiştir. “Study” menüsünden ise “Stationary” seçilmiştir. Sabit (Stationary) çalışma, değişkenler zaman içinde değişmediğinde kullanılmaktadır (Şekil 5.1.).

a) Select Physics

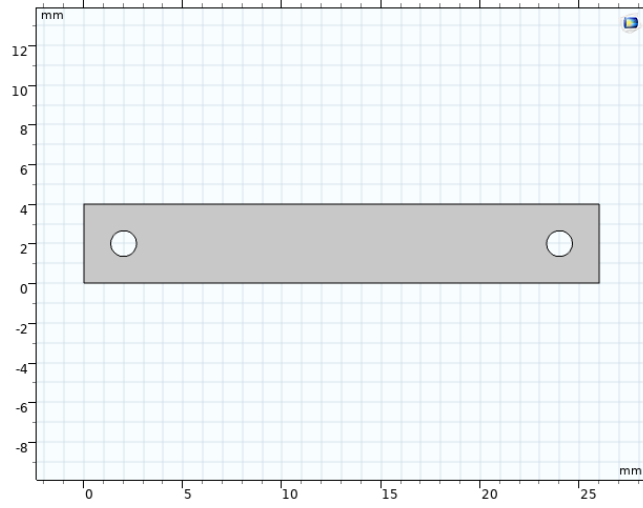


b) Select Study



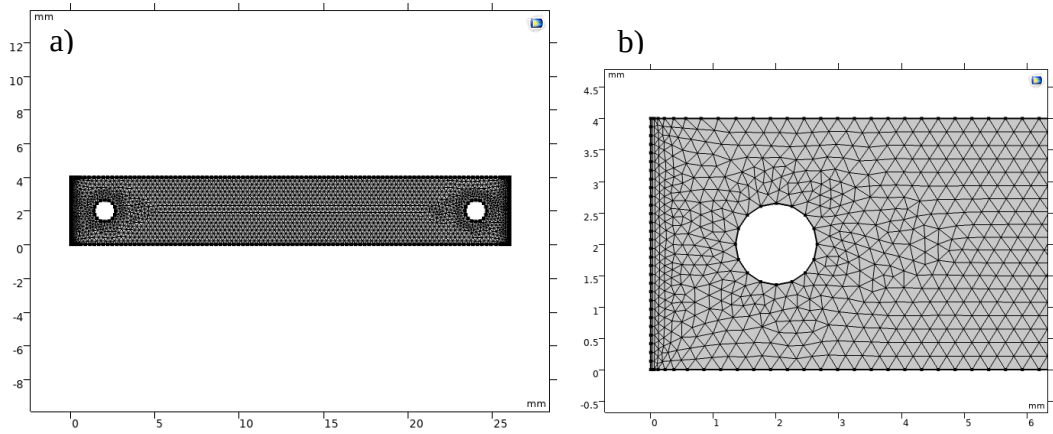
Şekil 5.1. Mikroçip Kanalında Akışkan Akışını Modellemek için yapılan işlem adımları. a) Laminar Akış seçimi, b) Sabit, zamana bağlı olmayan çalışma seçimi.

- Geometri menüsü kullanılarak uzunluğu 26mm ve genişliği 4mm olan dikdörtgen kanal çizilmiştir. Daha sonra çapı 0.65mm olan ve giriş- çıkış olarak kullanılacak silindirler çizilmiştir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. 26mmX4mm boyutunda, 0.65mm çaplı girişe sahip mikroçip kanalının COMSOL Multiphysics uygulamasında modellenmesi.

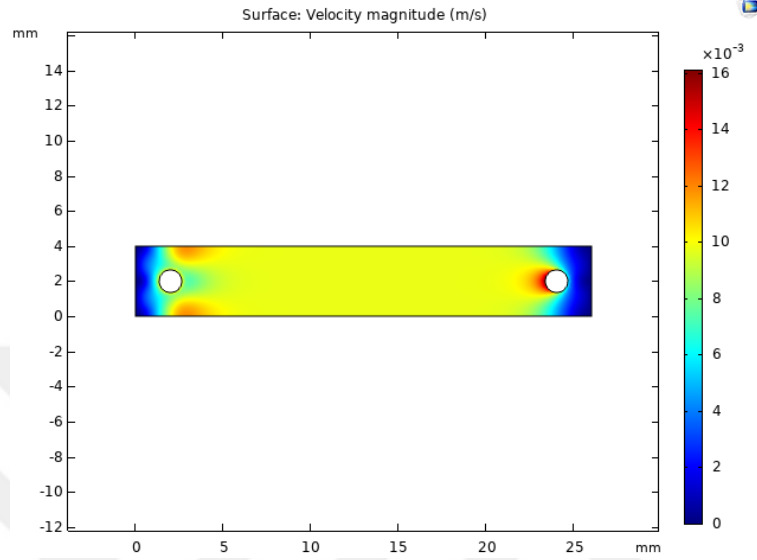
- Laminar Flow menüsü altında, akışkan özellikleri $\rho = 1$ ve $\mu = 1$ olarak değiştirilmiştir. Daha sonra giriş ve çıkış bölgelerinin seçimi yapılmış ve U_0 giriş hızı 0,01 m/s olarak ayarlanmıştır.
- “Mesh” seçilmiş ve varsayılan ayarlar kullanarak (Fizik kontrollü ağ ve Normal ağ boyutu) ayarlanmıştır. 4328 öğeli “mesh” elde edilmiştir. Oluşturulan “mesh” yapısının silindirler çevresinde otomatik olarak daha ince olduğu görülmüştür (Şekil 5.3.).



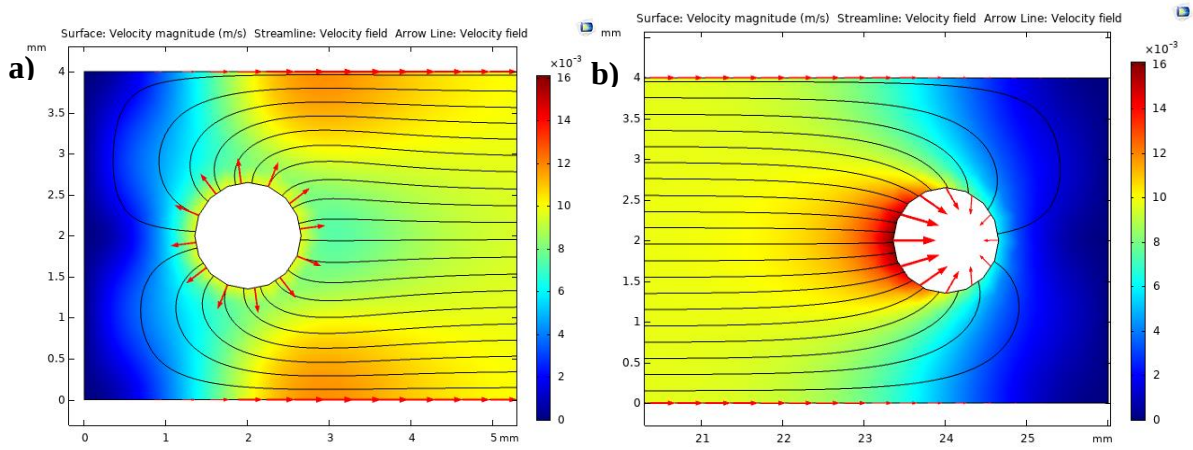
Şekil 5.3. a) Mikro kanala ait “mesh” yapısı gösterilmiştir b) Giriş/çıkış çevresindeki ağ yapısı daha ince olarak gözlenmiştir.

- “Study” menüsünden simülasyon çalıştırılmıştır. Şekil 5.4’de görülen grafik, hız büyüklüğünü göstermektedir. Giriş hızı 0,01 m/s olarak ayarlanmıştır. Silindirin

altında ve üstünde bundan daha yüksek değerler görülmüştür yani akış beklendiği gibi silindirden geçerek hızlanmıştır. Silindirin arkasında sıfır hızda durma noktası, ayrıca ön tarafında düşük hızlı girdap bölgesi olduğu görülmüştür (Şekil 5.5.a., Şekil 5.5.b).



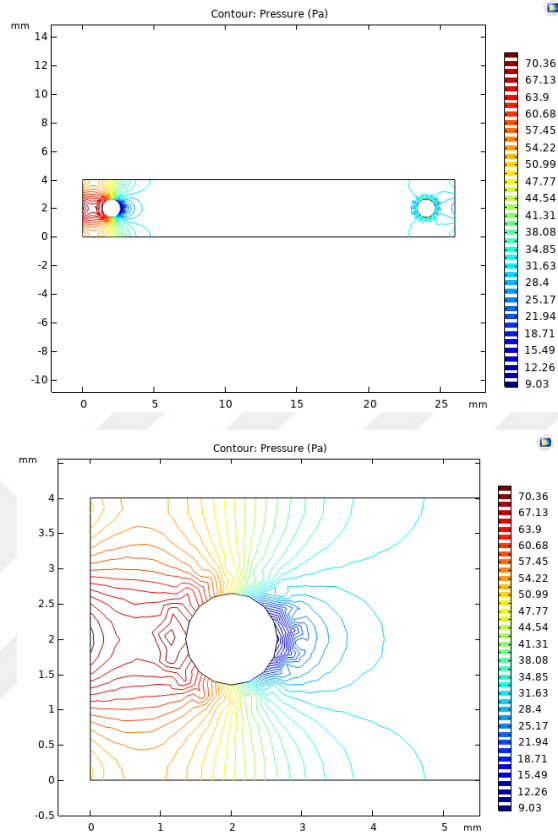
Şekil 5.4. Laminar Akış Hız Büyüklüğü grafiği.



Şekil 5.5. Laminar Akış yönünün oklar ile gösterimi; a) giriş, b) çıkış.

- Basınç alanını görmek için Sonuçlar menüsünden Basınç (spf) ögesi seçilmiştir. Basınç eğrileri çizgiler olarak gösterilmiştir (Şekil 5.6.). Basınç eğrileri grafiğinin göstergesinden de görüldüğü gibi durma noktası 50 Pa'nın üzerinde en yüksek basınca sahiptir. Bu basınç, çıkışta belirtilen sıfır basınca göre dir. Silindirin üst ve

alt kısımlarında basınç dağılımı simetrik olmuştur. Silindirin önünde belirli bir mesafeden sonra, basınç homojen hale gelmiştir. Bu durum, tamamen gelişmiş akışı (fully developed flow) belirtmektedir.



Şekil 5.6. Laminar Akış Basınç Eğrileri Grafiği.

Isı Transferi Simülasyonu:

Malzemeler arasında sıcaklık farkı olduğunda, ısı daima daha sıcak olan malzemeden daha soğuk olana aktarılmaktadır. COMSOL'da katılarda ısı transferi modülünde, temel denklem aşağıdaki gibidir (5.1):

$$\rho C_p \left(\frac{dT}{dt} + U_{trans} \cdot \nabla T \right) + \nabla(q + q_r) = Q_{ted} + Q \quad (5.1)$$

(5.1): ρ - yoğunluk (kg.m^{-3}), C_p - sabit gerilimde özgül ısı kapasitesi ($\text{J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T - mutlak sıcaklık (K), t - zaman (s), U_{trans} - öteleme hareketinin hız vektörü (m.s^{-1}), q - iletimle ısı akışı (W.m^{-2}), q_r - radyasyonla ısı akışı (W.m^{-2}), Q - ek ısı kaynakları (W.m^{-3}), Q_{ted} - termoelastik sönümleme (W.m^{-3}).

İletimle ısı akışı q , Fourier'in ısı iletimi yasasıyla verilmiştir (5.2):

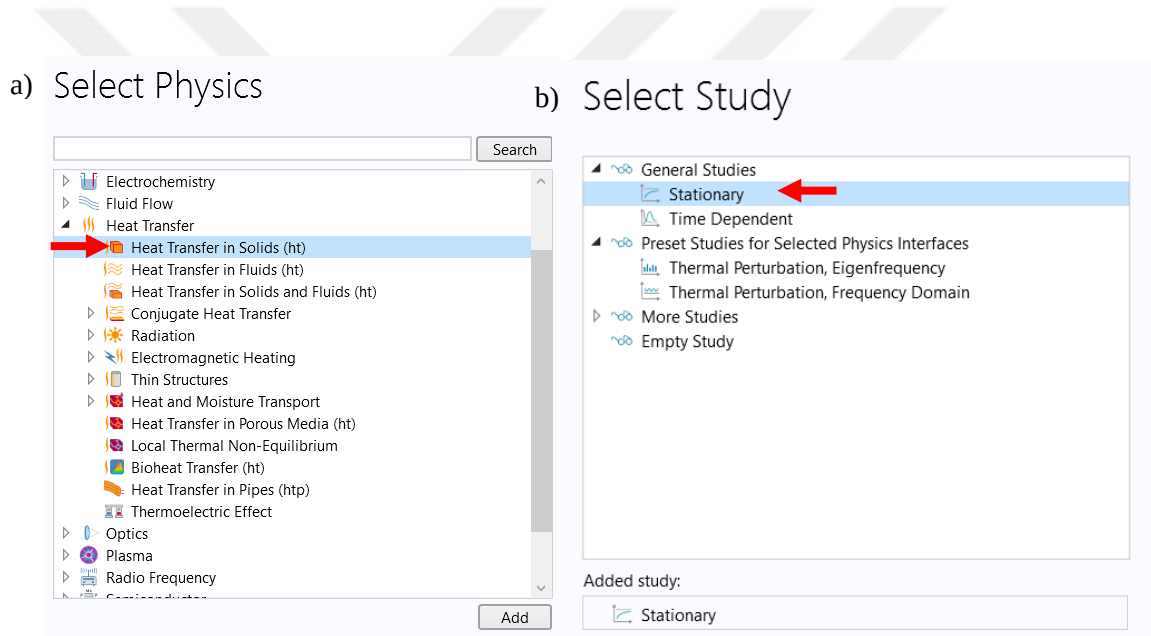
$$q = -k\nabla T \quad (5.2)$$

Burada k sembolü termal iletkenlik anlamına gelmektedir, $W.m^{-1}.K^{-1}$.

Kararlı durum probleminde, sıcaklık zamanla değişmemekte ve zaman türevleriyle ilgili terimler kaybolmaktadır.

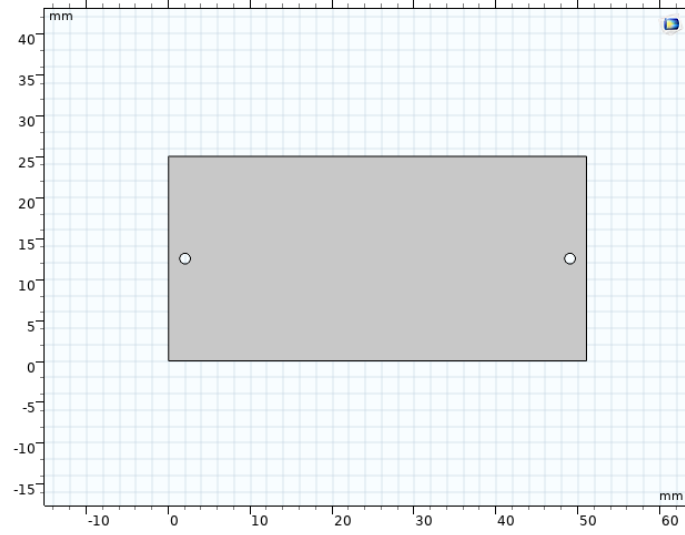
Isı Transferi Simülasyonu İşlem Adımları:

- COMSOL Multiphysics uygulaması çalıştırılarak “Model Wizard” menüsünden 2 Boyutlu Model seçilmiştir. Isı transferini modellemek için “Heat Transfer” ardından “Heat Transfer in Solids” seçilmiştir. “Study” menüsünden ise “Stationary” seçilmiştir. (Şekil 5.7.).



Şekil 5.7. Mikroçipin giriş ve çıkış deliklerinin bulunduğu PMMA katmanında ısı transferini modellemek için yapılan işlem adımları. a) Katılarda ısı transferi seçimi, b) Sabit, zamana bağlı olmayan çalışma seçimi.

- Geometri menüsü kullanılarak uzunluğu 51 mm genişliği 25 mm olan mikroçip dikdörtgen olarak çizilmiştir. Dikdörtgen üzerine ise çapları 0,65 mm olan giriş ve çıkış silindirleri çizilmiştir (Şekil 5.8.).



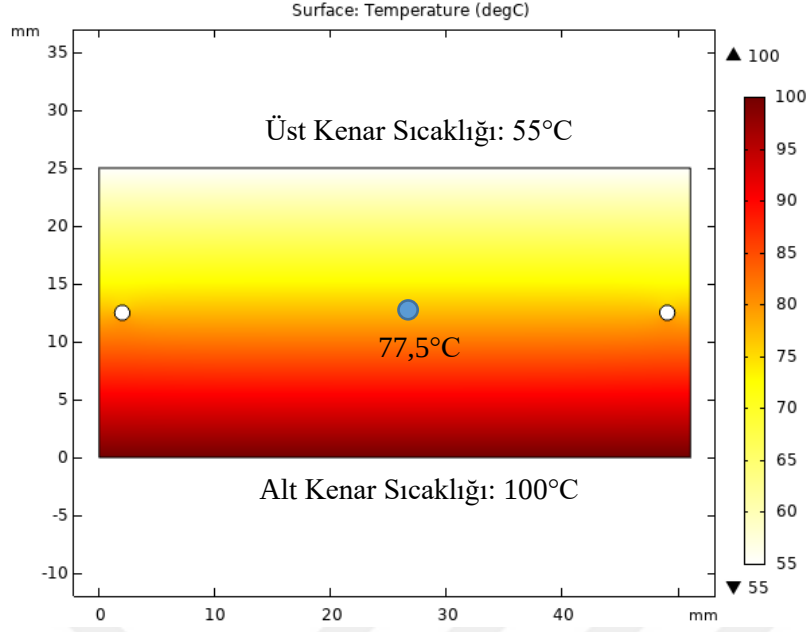
Şekil 5.8. 51 mm x 25 mm boyutunda, 0.65 mm çaplı girişe sahip PMMA katmanının COMSOL Multiphysics uygulamasında modellenmesi.

- “Materials” menüsünden MEMS, ardından PMMA malzemesi seçilerek çizilen dikdörtgene tanımlanmıştır (Şekil 5.9.).

Property	Value	Unit	Property group
☒ Heat capacity at constant pressure	1420[J/(kg*K)]	J/(kg·K)	Basic
☒ Density	1190[kg/m^3]	kg/m ³	Basic
☒ Thermal conductivity	0.19[W/(m*K)]	W/(m·K)	Basic
Coefficient of thermal expansion	70e-6[1/K]	1/K	Basic
Relative permittivity	3.0	1	Basic
Young's modulus	3e9[Pa]	Pa	Young's modulus and Poisson's ratio
Poisson's ratio	0.40	1	Young's modulus and Poisson's ratio

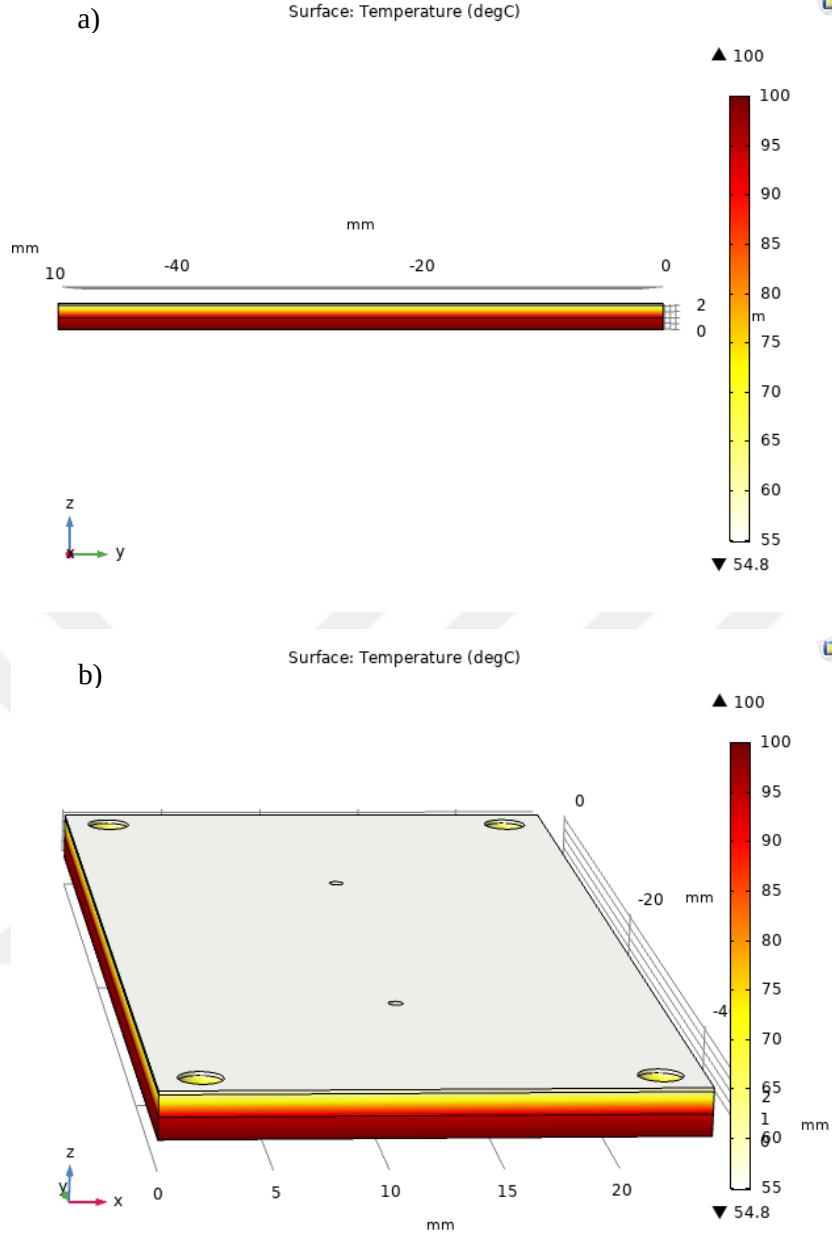
Şekil 5.9. COMSOL’da tanımlı PMMA malzemesi özellikleri.

- “Heat Transfer in Solids” menüsü ile dikdörtgenin alt kenar sıcaklığı 100°C, üst kenar sıcaklığı ise 55°C olarak değiştirilmiştir.
- “Mesh” seçilmiş ve gerekli ayarlar kullanarak (Fizik kontrollü ağ ve “Fine” ağ boyutu) düzenlenmiştir.
- “Study” menüsünden simülasyon çalıştırılmıştır. Sonuçlar incelenmiş, x konumu 25,5 mm ve y konumu 12,5 mm olan noktada sıcaklığın 77,5°C olduğu görülmüştür (Şekil 5.10.).



Şekil 5.10. Yüzey Sıcaklığı Grafiği.

- Daha sonra aynı işlemler üç boyutta tekrarlanmıştır. Üç katmanlı çip tasarımında kullanılmak üzere COMSOL malzeme kütüphanesinden PMMA katmanı için “PMMA polimeri, çift taraflı bant için PET polimeri ve lamel için Borosilikat malzemesi seçilmiştir.
- Lamel katmanında sıcaklık 100°C, PMMA katmanında ise 55°C olarak ayarlanmıştır. Simülasyon çalıştırılmış ve sonuçlar gözlemlenmiştir. Üç boyutlu çipin katmanlarına ait sıcaklık dağılımı Şekil 5.11.’de gösterilmiştir.

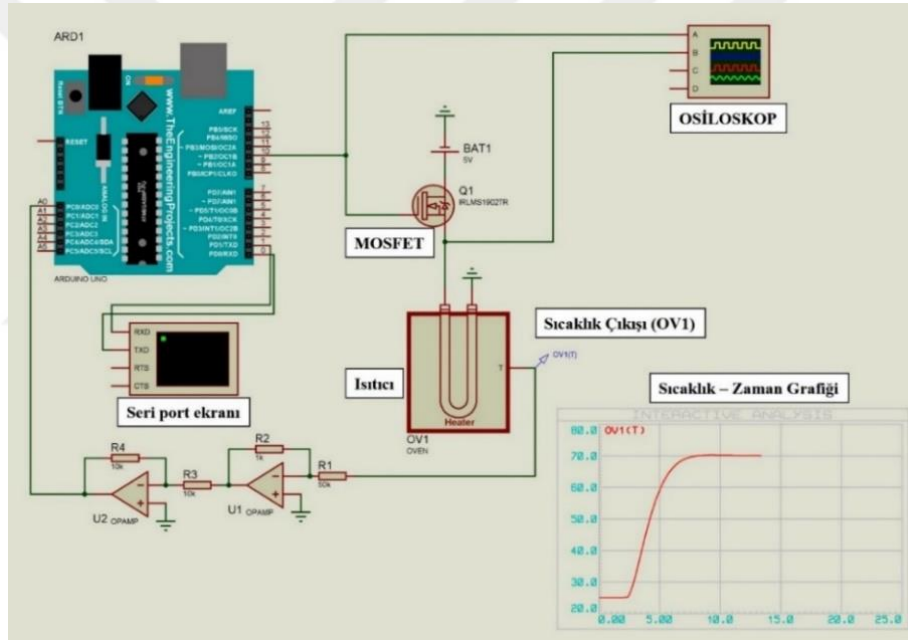


Şekil 5.11. Üç boyutlu çipe ait ısı transferi grafikleri a) Yanal eksenden görünüm, b) Üstten görünüm.

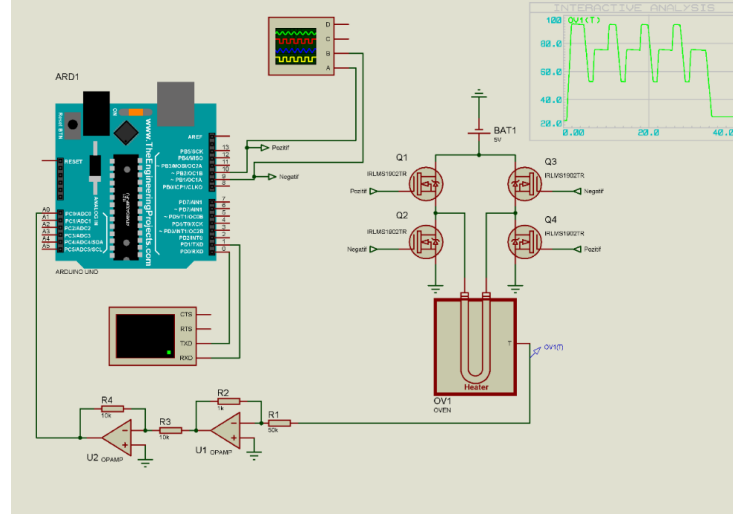
5.2. Sıcaklık Döngüleyici Elektronik Devre Simülasyonu

Proteus; elektronik devrelerin tasarımı, çizimi, simülasyonu ve baskı devrelerinin çıkartılması için kullanılan sanal laboratuvarıdır. Sıcaklık döngüleyici simülasyonu için Proteus 8.6 programı kullanılmıştır.

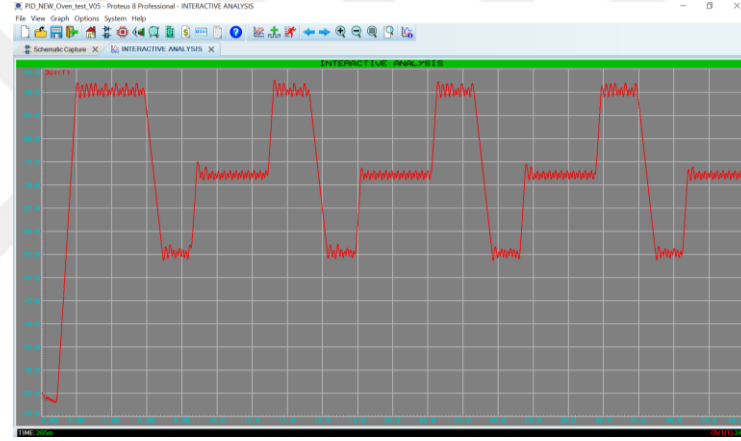
Isıtıcı olarak kullanılmak üzere seçilen Peltier modülleri temsilen Proteus kütüphanesinden Oven elemanı kullanılmıştır. Arduino IDE programı ile gerekli PID kontrol algoritması oluşturularak sıcaklık değişimleri gözlemlenmiştir. İlk olarak ısıtıcının istenilen bir sıcaklığa ulaşması sağlanıp, bu sıcaklıkta sabit tutulmaya çalışılmıştır (Şekil 5.12.). En uygun kontrolör parametreleri seçilmeye çalışılarak istenilen sıcaklıkta sabit kalınması sağlanmıştır. Daha sonra hem ısıtma hem soğutma için devre tasarımı yapılmıştır. Polarite değişimi için H-köprü devresi kullanılmıştır. Q1 ve Q4 anahtarları açık olduğunda ısıtıcıda sıcaklık artışı olması, Q2 ve Q3 anahtarları açık olduğunda ise ısıtıcıda sıcaklık düşüşü olması beklenmektedir (Şekil 5.13.). Gerekli PID kontrolör parametreleri ayarı yapılarak sıcaklık döngüleyici grafiği elde edilmiştir (Şekil 5.14.).



Şekil 5.12. Sıcaklık Döngüleyici Simülasyonu, 70°C'ye ulaşp, bu sıcaklıkta sabit kalması için PID kontrolör parametreleri düzenlenmiştir.

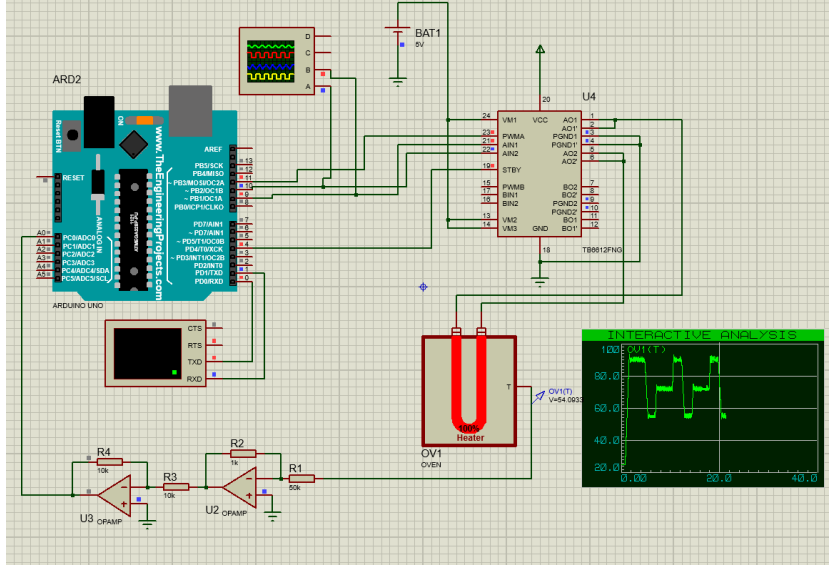


Şekil 5.13. Isıtma ve Soğutma süreçlerini gerçekleştiren Sıcaklık Döngüleyici simülasyonu.

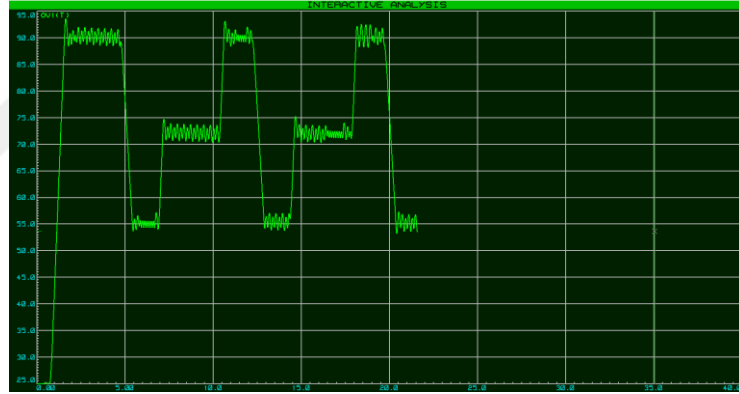


Şekil 5.14. Hesaplanan K_p , K_i ve K_d değerleri sonucunda elde edilen PCR döngüsünün simülasyon çıktısı.

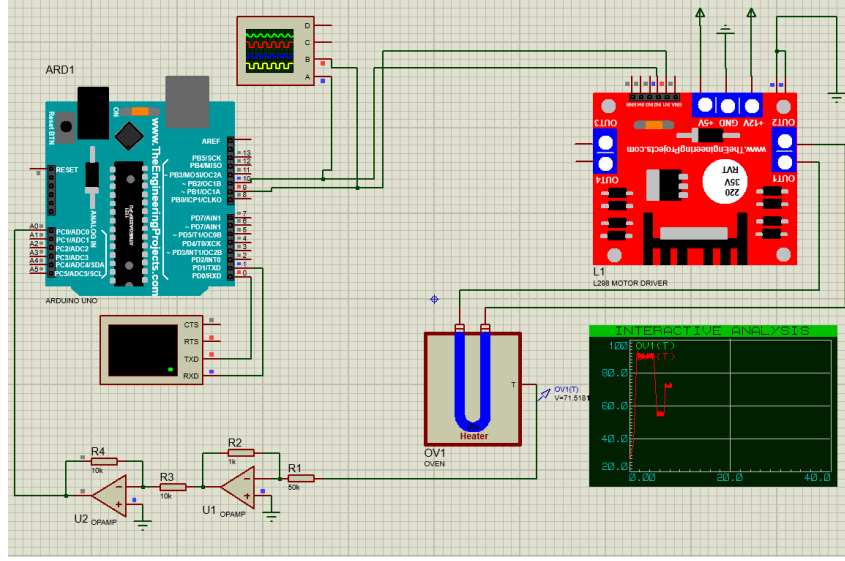
Çalışmada kullanılması düşünülen TB6612FNG ve L298N H-köprüleri ile de simülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Her iki H-köprüsü ile sıcaklık döngüleri elde edilmiştir (Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18.).



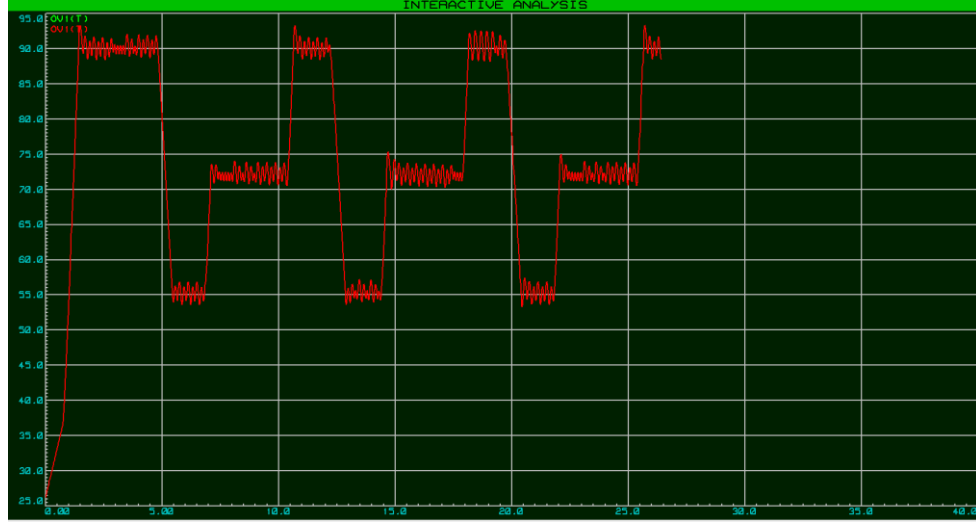
Şekil 5.15. TB6612FNG Modül ile Isıtma ve Soğutma süreçlerini gerçekleştiren Sıcaklık Döngüleyici simülasyonu.



Şekil 5.16. TB6612FNG ile PCR döngüsünün simülasyon çıktısı.



Şekil 5.17. L298N Modül ile Isıtma ve Soğutma süreçlerini gerçekleştiren Sıcaklık Döngüleyici simülasyonu.

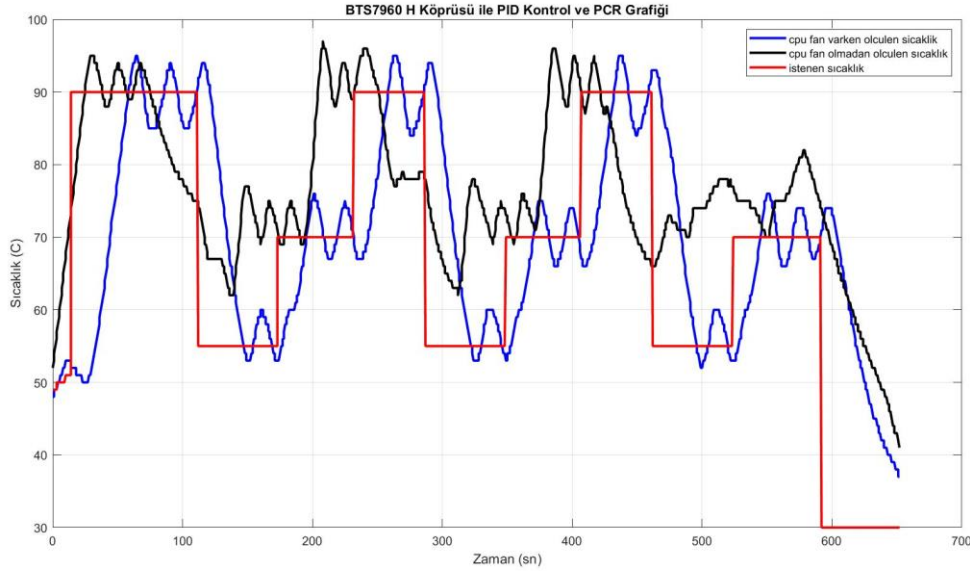


Şekil 5.18. L298N ile PCR döngüsünün simülasyon çıktısı.

6. BULGULAR

Peltier eleman, kartuş ısıtıcı sıcaklığı artırmada, heat sink, salyangoz fan ve CPU fan ise sıcaklığa düşürmede kullanılmış ve sıcaklık döngüleyici devresi oluşturulmuş, PCR grafiği elde etmek için ölçümler alınmıştır. Aşağıda farklı koşullarda elde edilmiş PCR grafikleri sıcaklık-zaman grafiği olarak verilmiştir.

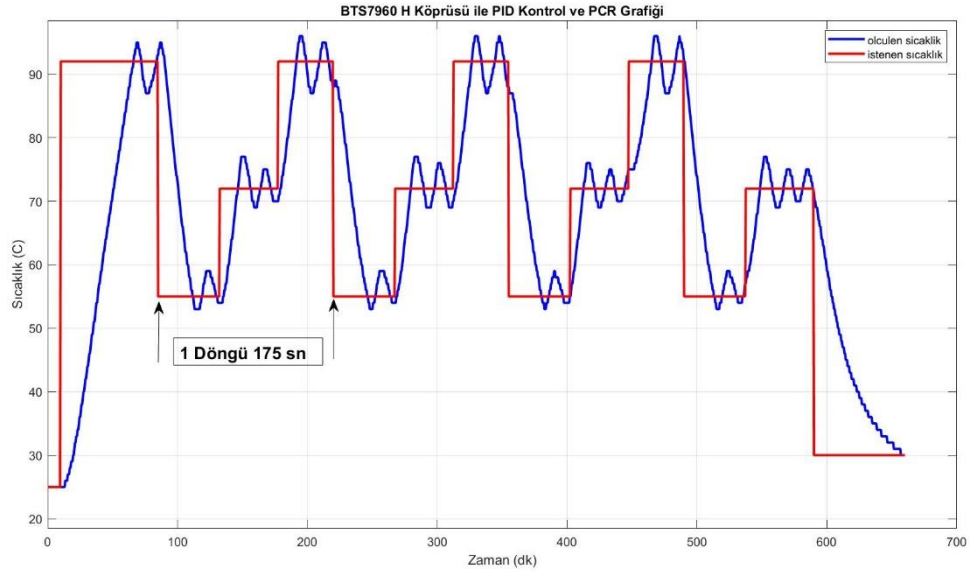
Öncelikle bir döngü süresi 175 sn olan PCR grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafikler için PID parametreleri aynı olup Kp, Ki ve Kd sırasıyla 100, 35 ve 150'dir. Bu parametreler deneme yanılma yöntemiyle elde edilmiştir. Sıcaklık döngüleyici devresinde H-köprüsü olarak BTS7960 ve 2 adet Peltier eleman kullanılmıştır. CPU fan kontrolü ise röle ile sağlanmıştır. Bluetooth modül HC-06 aracılığıyla Android bir cihazdan sıcaklık değerleri gözlemlenebilmektedir. Şekil 6.1.'de görülen grafik CPU fan kullanıldığında ve kullanılmadığında elde edilen sonuçları göstermektedir. CPU fanın kullanılmadığı durumda bağlanma sıcaklığı olan 55°C'ye ulaşamadığı görülmüştür.



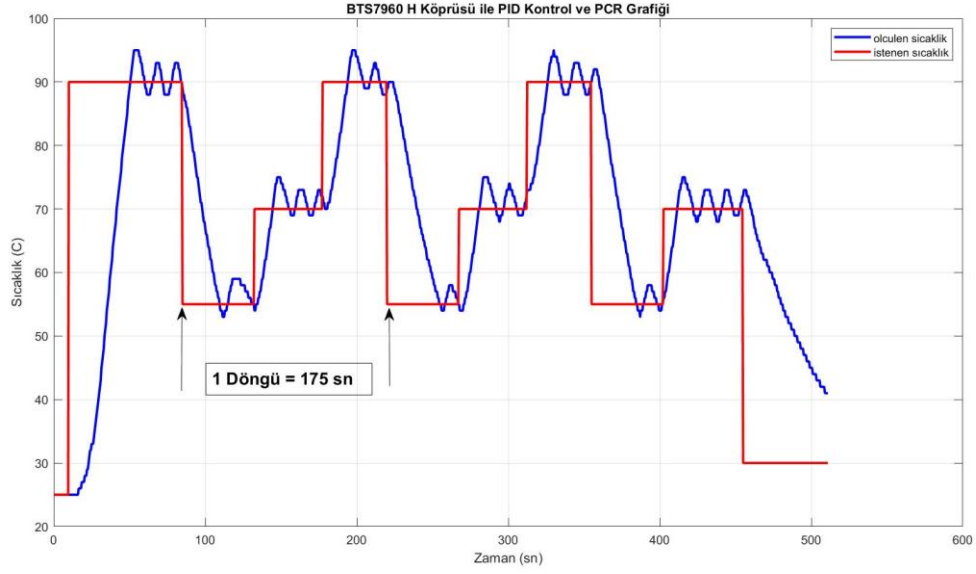
Şekil 6.1. PID Kontrolör kullanılarak elde edilen PCR grafiği (PID parametreleri KP = 100; KI = 35; KD = 150). CPU Fan kullanılarak elde edilmiş grafik (mavi) ile CPU fan kullanılmadan elde edilmiş grafik (siyah).

PCR adımları başlangıç denatürasyonu, denatürasyon, bağlanma, uzama ve bekleme adımlarından oluşmaktadır. Adım süreleri ve adım sıcaklıkları oluşturulan yazılım ile

değiştirilebilmektedir. Denatürasyon, bağlanma ve uzama sıcaklıkları değiştirilerek deneyler tekrar edilmiştir. Ayrıca farklı döngü sayılarından oluşan grafikler de elde edilmiştir. Elde edilen PCR grafiklerinde denatürasyon, bağlanma ve uzama adımlarından oluşan 1 döngünün 175 sn sürdüğü Şekil 6.2. ve Şekil 6.3.'da gösterilmiştir. Bu grafiklerde ilk dinlenme adımı ~95 sn sürmektedir. Denatürasyon adımı 55sn, bağlanma ve uzama adımları ise 60 sn sürmektedir. Şekil 6.2.'de 4 döngüden Şekil 6.3.'de ise 3 döngüden oluşan PCR grafiği görülmektedir.

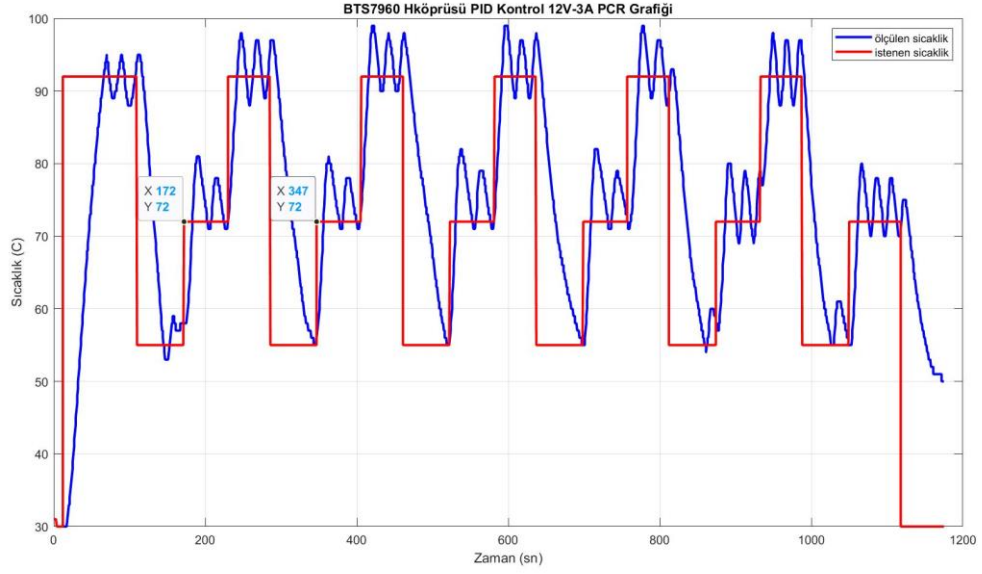


Şekil 6.2. Başlangıç denatürasyonu 92°C'de 95 saniye, bağlanma 55 °C'de 60 saniye, Uzatma 72 °C'de 60 saniye, Denatürasyon 92 °C'de 55 saniye ile 4 döngüden oluşan PCR grafiği.



Şekil 6.3. Başlangıç denatürasyonu 90°C'de 97 saniye, bağlanma 55 °C'de 60 saniye, Uzatma 70 °C'de 60 saniye, Denatürasyon 90 °C'de 55 saniye ile 3 döngüden oluşan PCR grafiği.

Şekil 6.4.'de 6 döngüden oluşan ~19 dk'lık PCR grafiği gösterilmiştir. Uzatma adımından denatürasyon adımına kadar olan ısıtma hızı 1,66°C/s iken; bağlanma adımından uzatma adımına kadar olan ısıtma hızı 1,55°C/s ve soğutma hızı 1,08°C/s olarak bulunmuştur. Sıcaklık döngüleyici devresinin ısıtma hızı oranı 1,60 °C/s'dir ve 1,55°C/s ile 1,66°C/s'nin ortalaması alınarak hesaplanmıştır (Tablo 6.1.).

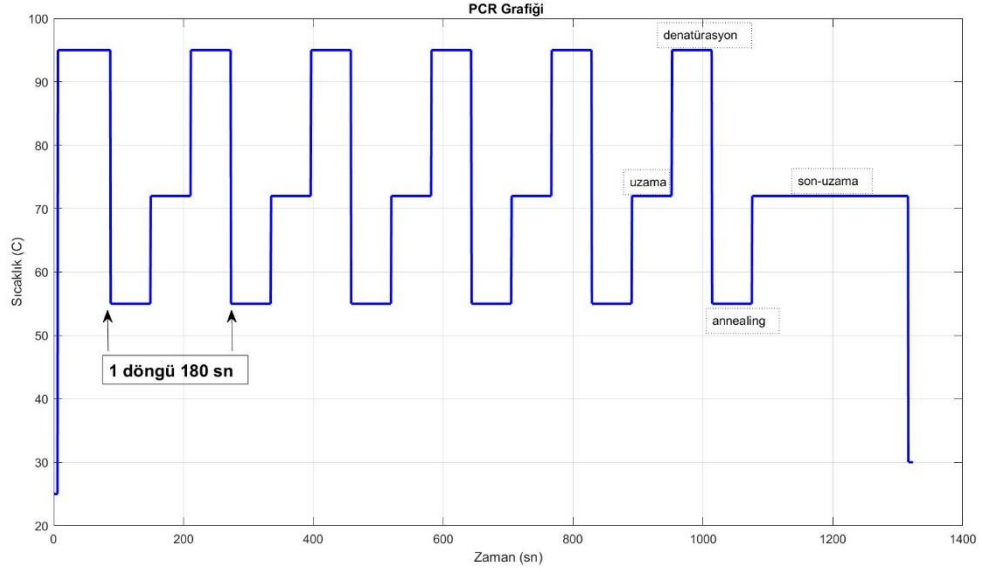


Şekil 6.4. Başlangıç denatürasyonu 92°C’de 97 saniye, bağlanma 55 °C’de 60 saniye, Uzatma 72 °C’de 60 saniye, Denatürasyon 92 °C’de 55 saniye ile 6 döngüden oluşan CPU fan kullanılarak elde edilen PCR grafiği.

Tablo 6.1. Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.

	Sıcaklık Döngüleyici Adım Değişimi	Geçiş Süresi	Geçiş Oranı	Sıcaklık Döngüleyici Adımı	Adım Süresi
<i>Başla</i>	30°C → 92 °C	53 sn	1.17 °C/sn	<i>Başlangıç Denatürasyonu</i>	97 sn
<i>6 Döngü</i>	92°→ 55°C	34 sn	1.08 °C/sn	<i>Bağlanma</i>	60 sn
	55°C → 72°C	11 sn	1.55 °C/sn	<i>Uzama</i>	60 sn
	72° → 92°C	12 sn	1.66 °C/sn	<i>Denatürasyon</i>	55 sn
<i>Toplam Süre</i>	19 dk 26 sn				
<i>Sistemin Isıtma Oranı= (1.55 + 1.66) / 2 = 1.60 °C/sn</i>					

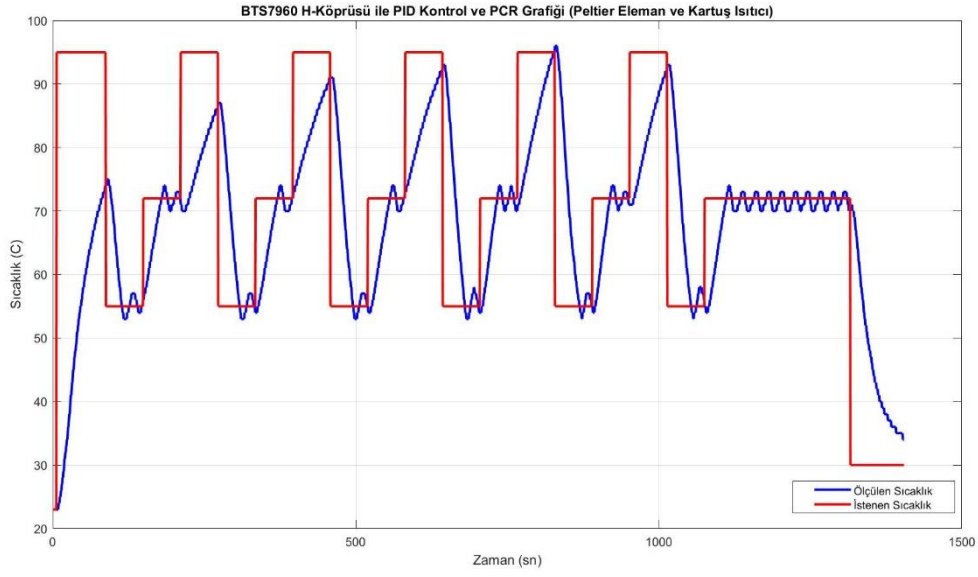
Daha sonra bir döngü süresi 180 sn olan PCR grafikleri oluşturulmuştur. Bu grafiklerde PCR döngüsü başlangıç denatürasyonu (95°C – 80 sn), bağlanma (55°C – 60 sn), uzama (72°C – 60 sn), denatürasyon (95°C – 60 sn) ve son uzama adımından (72°C – 5 dk) oluşmaktadır (Şekil 6.5.).



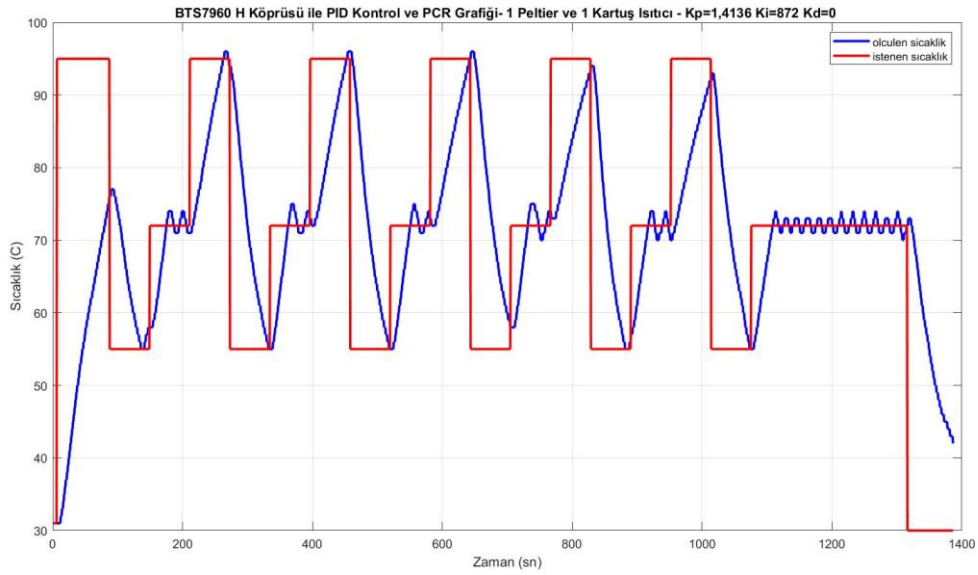
Şekil 6.5. Bir döngü süresi 180 sn olan PCR grafiği.

Aynı PCR protokol parametreleri ve PID parametreleri kullanılarak (K_p , K_i ve K_d sırasıyla 100, 35 ve 150'dir) Peltier elemanı ve kartuş ısıtıcı (12V, 40W) sıcaklığı artırmak için kullanılmış ve aşağıdaki grafik elde edilmiştir (Şekil 6.6.). Grafikte görüldüğü üzere, kartuş ısıtıcı kullanıldığında denatürasyon sıcaklığına (95°C) ulaşamamıştır. Bu durumun kartuş ısıtıcının PID kontrolü ile kullanıldığında üç sıcaklık adımı arasındaki geçişleri geciktirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca PID parametreleri MATLAB-PID Tuner Toolbox kullanılarak tekrar elde edilmiş ve ölçümler tekrarlanmıştır. Kartuş ısıtıcının kullanımıyla birlikte 95°C'ye ulaşıldığı gözlenmiş ancak, sıcaklık geçişleri arasındaki gecikmede önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Soğuma oranı ise kartuş ısıtıcı

kullanımında önemli derecede azalmıştır (Şekil 6.7.).



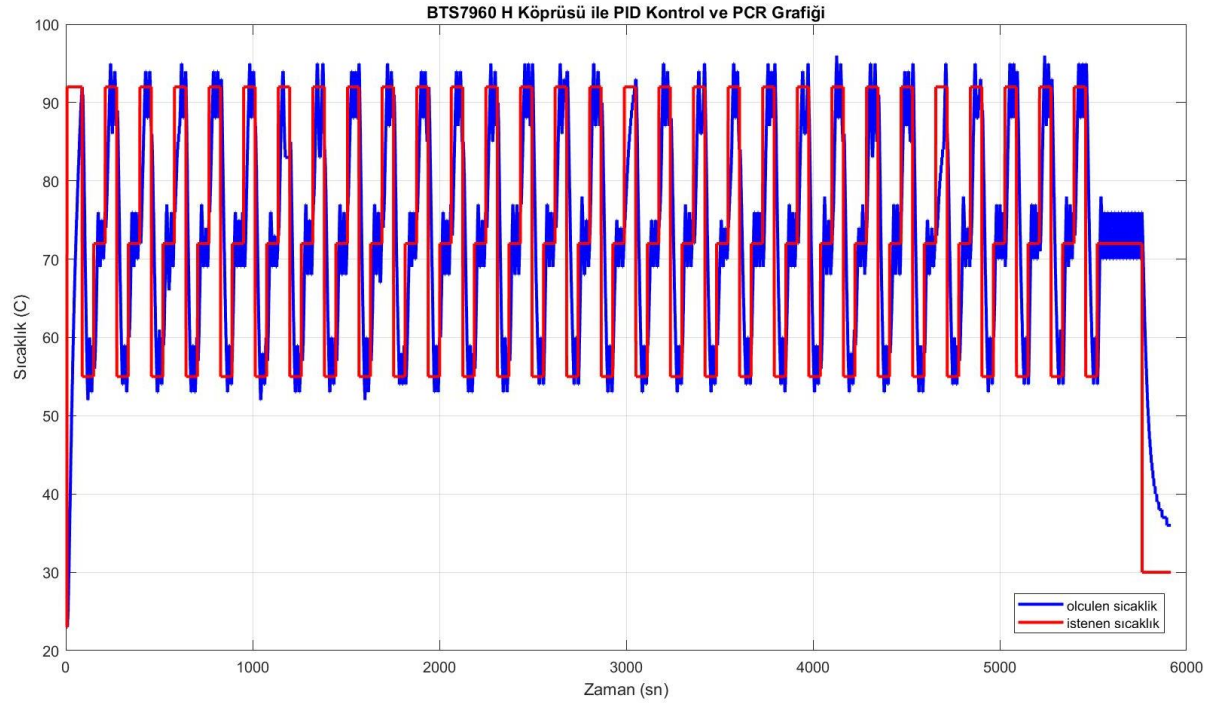
Şekil 6.6. Peltier elemanı ve kartuş ısıtıcı kullanılarak elde edilmiş 6 döngüden oluşan PCR grafiği.



Şekil 6.7. Peltier elemanı ve kartuş ısıtıcı ve farklı PID parametreleri kullanılarak elde edilmiş 6 döngüden oluşan PCR grafiği.

Yapılan farklı denemelerden sonra uygun PID kontrol parametreleri belirlenmiş ($K_p=1.3898$, $K_i=3044.281$ ve $K_d=0$) ve 30 döngüden oluşan PCR grafiği elde edilmiştir (Şekil

6.8.). Denatürasyon, bağlanma ve uzama adımları 60 sn sürmektedir. 30 döngüden oluşan PCR süreci ~99 dakika sürmüştür (Tablo 6.2.).

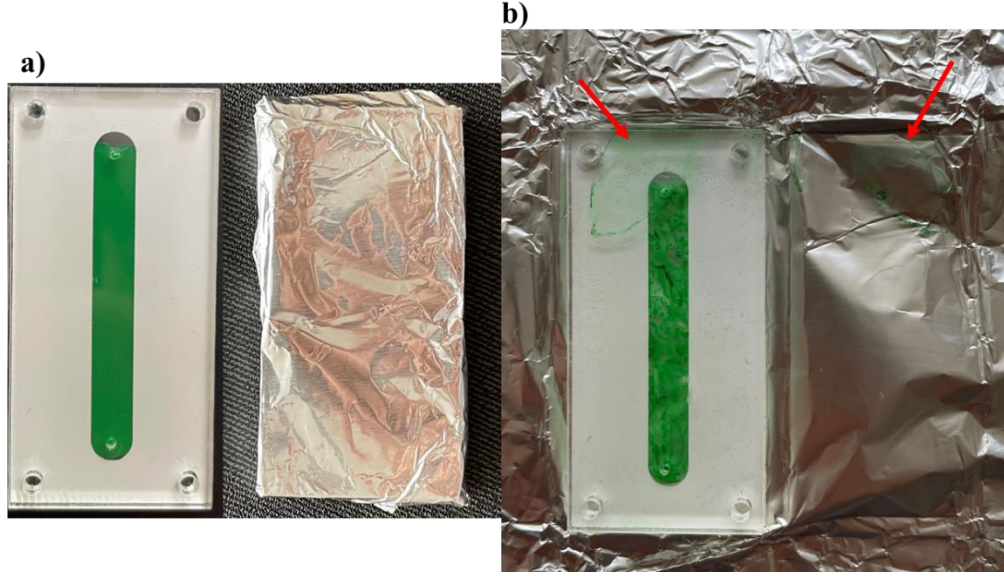


Şekil 6.8. PCR Grafiği, 30 döngü ile ilk denatürasyon, bağlanma, uzama, denatürasyon ve son uzama adımlarından oluşmakta ve yaklaşık ~99 dakika sürmektedir.

Tablo 6.2. 30 döngüden oluşan PCR protokolü için Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.

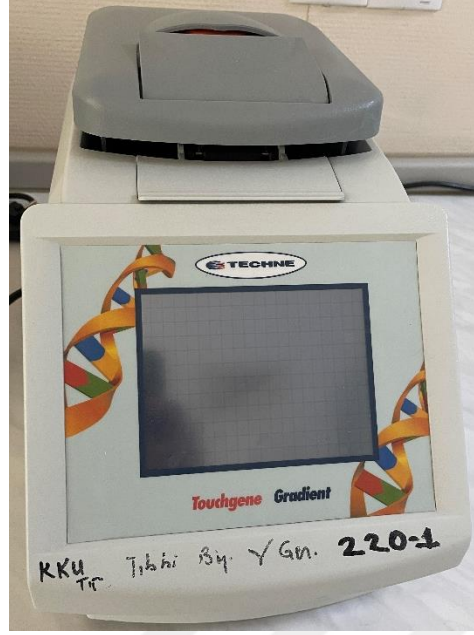
	Sıcaklık Döngüleyici Adım Değişimi	Geçiş Süresi	Geçiş Oranı	Sıcaklık Döngüleyici Adımı	Adım Süresi
<i>Başla</i>	23°C → 92 °C	78 sn	0,88 °C/sn	<i>Başlangıç Denatürasyonu</i>	80 sn
<i>30 Döngü</i>	92°→ 55°C	26 sn	1.42 °C/sn	<i>Bağlanma</i>	60 sn
	55°C → 72°C	20 sn	0,85 °C/sn	<i>Uzama</i>	60 sn
	72° → 92°C	23 sn	0,87 °C/sn	<i>Denatürasyon</i>	60 sn
<i>Son</i>	55°C → 72°C	27 sn	0,63 °C/sn	<i>Son Uzama</i>	5 dk
<i>Toplam Süre</i>	99 dk 19 sn				
<i>Sistemin Isıtma Oranı= (0.85 + 0.87)/2 = 0.86 °C/sn</i>					

Tasarlanan ve üretilen mikroçiplerin PCR işlemi sırasında beklenmedik sonuçlar doğurmayacağından emin olmak için mikroçip kanalı öncelikle mürekkep ile boyanmıştır (Şekil 6.9.a). Daha sonra seçilen primere uygun PCR adım sıcaklıkları ve adım sürelerine göre 15 döngüden oluşan deneme yapılmıştır. Buharlaşmayı önlemek amacıyla mikroçip alüminyum folyoya sarılmıştır. 15 döngü sonrasında mikroçip kanalında sıvı kalmadığı, boyanın kuruduğu ve buharlaşma olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.9.b).

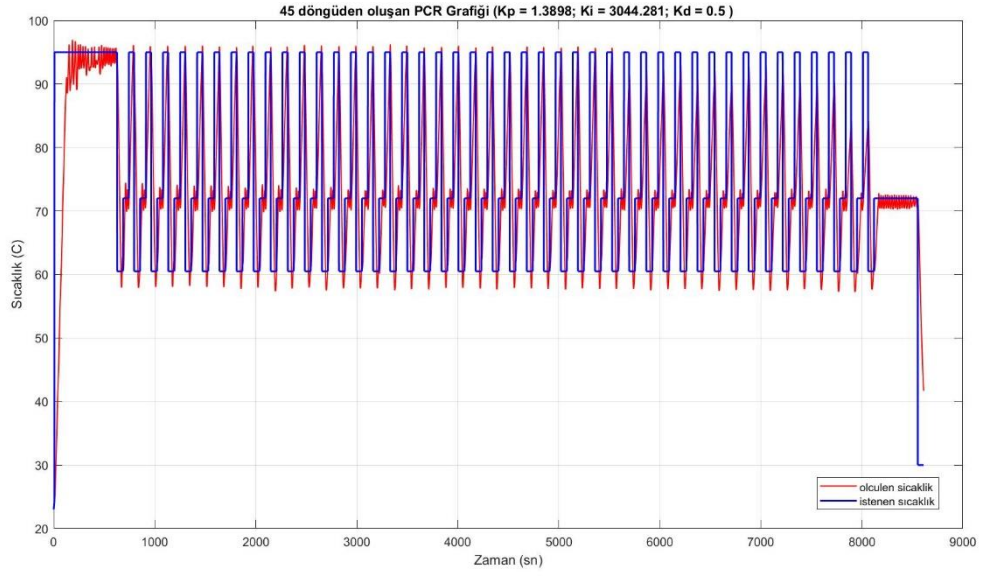


Şekil 6.9. Mikroçip kanalı, a) PCR işlemi öncesinde mürekkep ile boyanmış hali, b) PCR işlemi sonrası buharlaşma gerçekleşmiş hali.

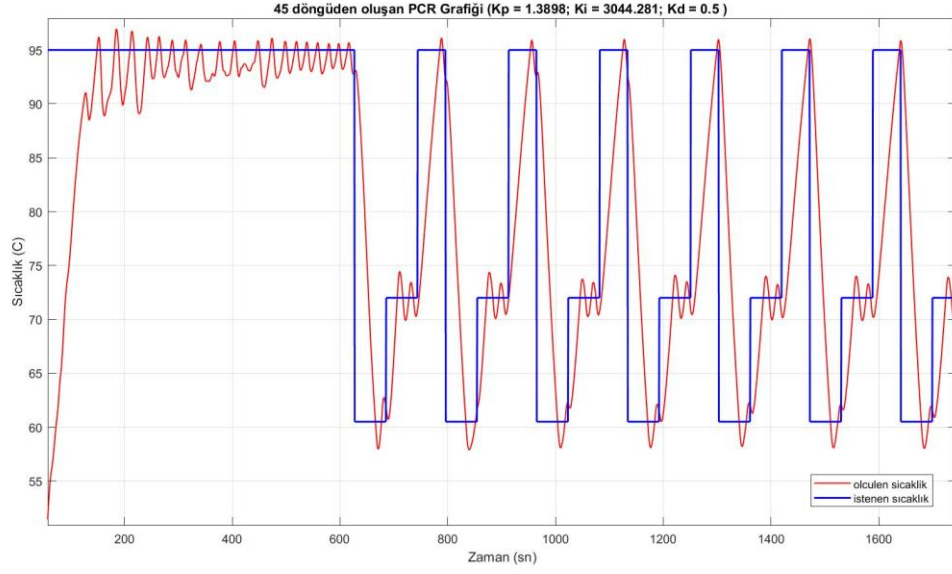
Elde edilen bu sonuçlardan sonra Bax primeri kullanılarak PCR işlemi çip üzerinde ve konvansiyonel bir cihazda (Techne Touchgene Gradient Thermal Cyclers) gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.10.). Mikro çipler PCR işleminden önce sterilize olmaları için 24 saat boyunca UV ışık altında bekletilmiştir. PCR işlemi sırasında buharlaşmayı önlemek amacıyla mikroçipin giriş çıkış delikleri kapatılmıştır. Şekil 6.11. ve Şekil 6.12.'de 45 döngüden oluşan PCR grafikleri verilmiştir. PCR protokolü 95°C'de 10 dk başlangıç denatürasyonu, 60,5°C'de 30 sn bağlanma, 95°C'de 30 sn denatürasyon, 72°C'de 30 sn uzama ve 72°C'de 7 dk son uzama adımından oluşmaktadır. Çalışmada geliştirilen sıcaklık döngüleyici bu PCR işlemi sırasında 12V – 20A adaptör kullanılarak çalıştırılmıştır.



Şekil 6.10. Konvansiyonel PCR cihazına ait görsel.



Şekil 6.11. PCR Grafiği, 45 döngü ile ilk denatürasyon, bağlanma, uzama, denatürasyon ve son uzama adımlarından oluşmaktadır ve yaklaşık ~145 dakika sürmüştür.



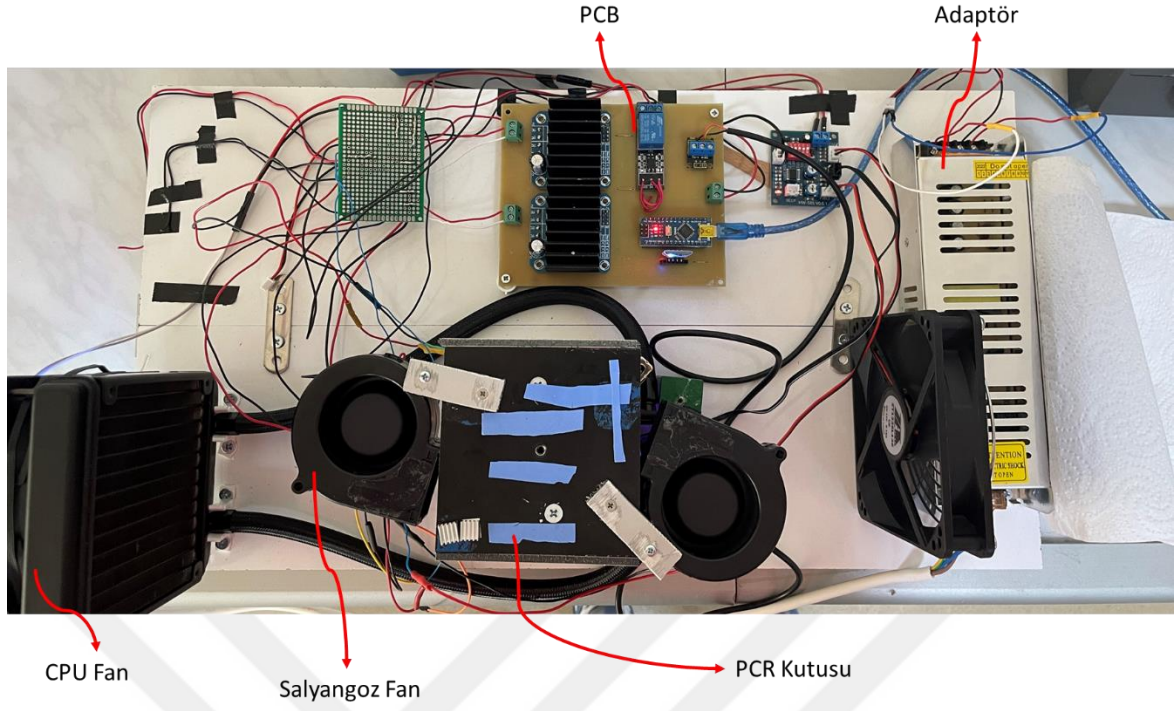
Şekil 6.12. 45 döngüden oluşan PCR işlemine ait grafiğin başlangıç denatürasyonu ve 6 döngüsüne ait yakın çekim.

Aşağıda 45 döngüden oluşan PCR işlemine ait veriler bulunmaktadır (Tablo 6.3.). Bu tabloya göre sistemin ısıtma oranı $0,5^{\circ}\text{C/sn}$, soğutma oranı ise $0,94^{\circ}\text{C/sn}$ olmuştur. Hesaplamalar yapılırken 5 döngünün ortalaması alınmıştır. Isıtma oranının diğer ölçümlere göre düşük olmasının nedeni döngü sayısının artmasıyla verimliliğin düşmesi olarak düşünülmüştür.

Tablo 6.3. 45 döngüden oluşan PCR protokolü için Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.

	Sıcaklık Döngüleyici Adım Değişimi	Geçiş Süresi	Geçiş Oranı	Sıcaklık Döngüleyici Adımı	Adım Süresi
<i>Başla</i>	23°C → 95 °C	120 sn	0.6°C/sn	<i>Başlangıç Denatürasyonu</i>	10 dk
<i>45 Döngü</i>	95°→ 60.5°C	37 sn	0.9°C/sn	<i>Bağlanma</i>	30 sn
	60.5°C → 72°C	23 sn	0.5°C/sn	<i>Uzama</i>	45 sn
	72° → 95°C	43 sn	0.5°C/sn	<i>Denatürasyon</i>	30 sn
<i>Son</i>	60.5°C → 72°C	42 sn	0.27°C/sn	<i>Son Uzama</i>	7 dk
<i>Toplam Süre</i>	145 dk				
<i>Sistemin Isıtma Oranı= (0.5+0.5)/2 = 0.5 °C/sn</i>					

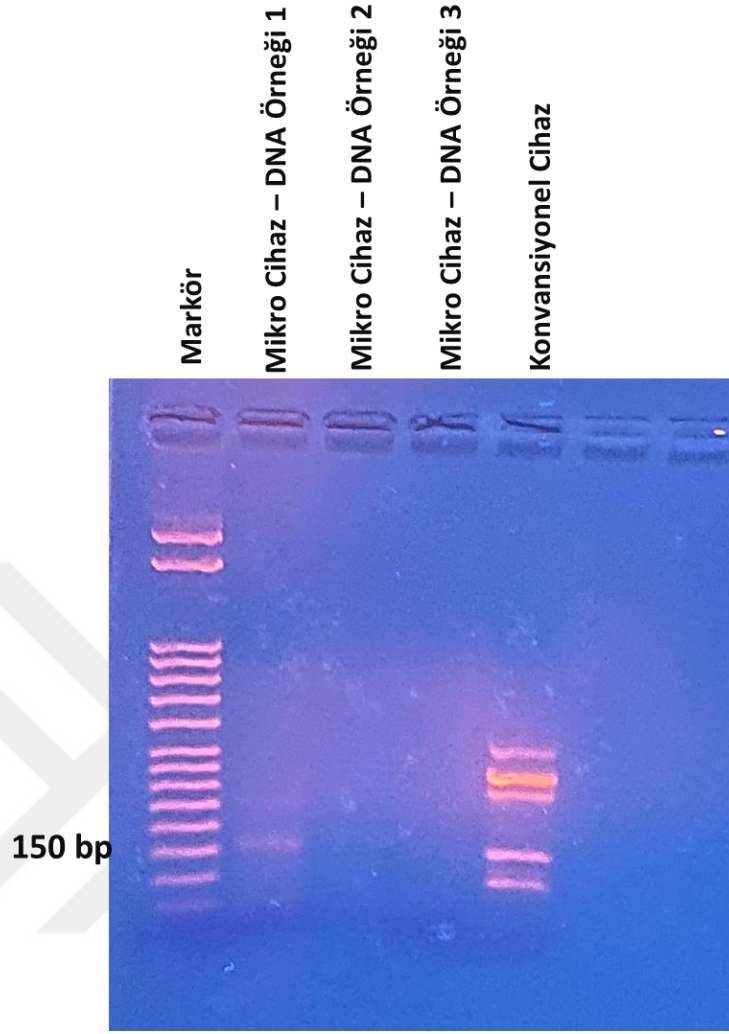
Aşağıdaki şekilde PCR gerçekleştirilirken kullanılan sistem gösterilmiştir (Şekil 6.13.). Şekil 6.14.'de ise PCR kutusunun içeriği verilmiştir. Mikroçip iki Peltier eleman arasına yerleştirilmiş ve PCR işlemi bu şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için PCR kutusuna mikroçip veya ince cidarlı amplifikasyon tüpü yerleştirilmiştir. Mikroçip kullanıldığında buharlaşma gerçekleştiği için bir sonuç elde edilememiştir. İnce cidarlı amplifikasyon tüpleri kullanılırken mineral yağı kullanılmış ve agaroz jel elektroforezi ile elde edilen sonuç Şekil 6.15.'de verilmiştir. 250 bç'de bax primere ait gözlenmesi gereken sonuç gözlenememiştir. Fakat 150 bç'de amplifikasyon gözlenmiştir.



Şekil 6.13. Tasarlanan Sistemin görseli.



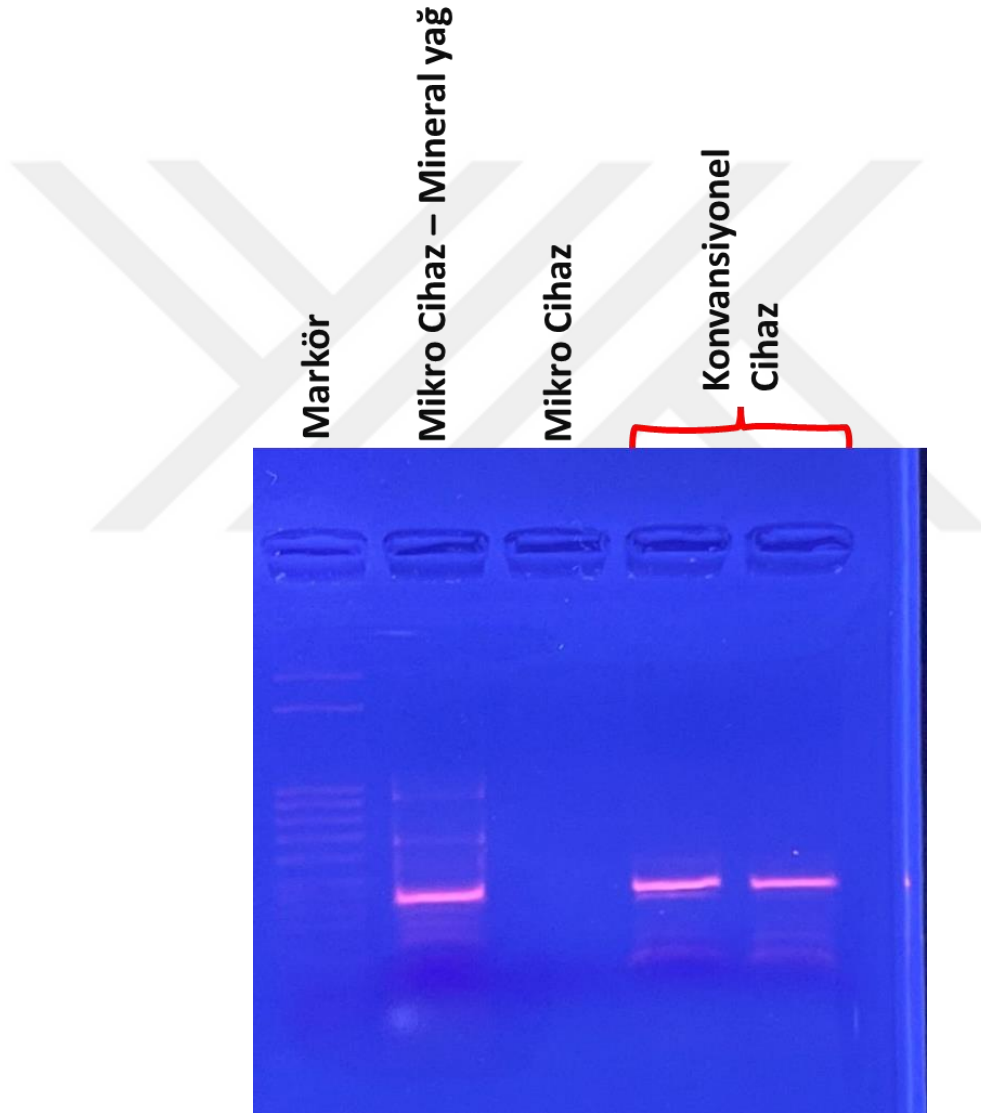
Şekil 6.14. PCR kutusunun blok diyagramı.



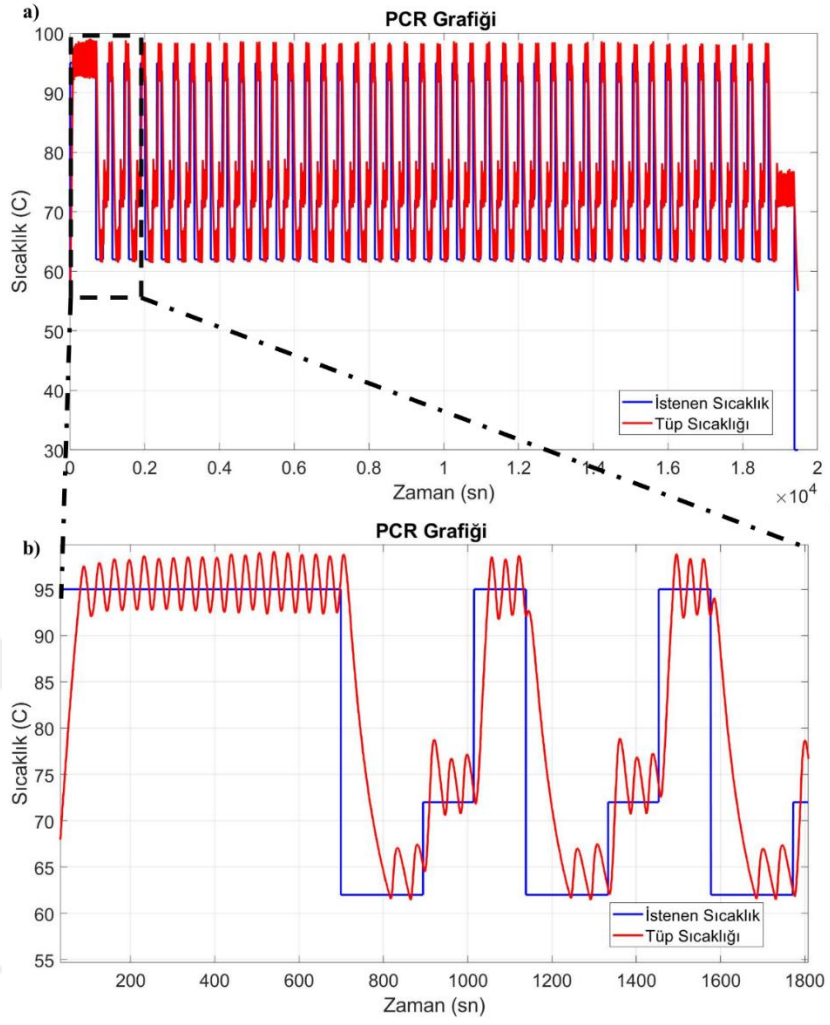
Şekil 6.15. İnce cidarlı amplifikasyon tüpleri kullanıldığında elde edilen agaroz jel elektroforez sonucu.

Daha sonra sistem ve sistem parametreleri güncellenmiştir. CPU fan kullanılmamış ve PCR kutusu tamamen kapalı hale getirilmiştir. Soğuma işlemine yardımcı olması için kullanılan salyangoz fanlar ise PCR kutusuna açılan bir boşluk aracılığıyla havalandırmayı sağlamıştır. İnce cidarlı amplifikasyon tüpleri delikli Al bloklara yerleştirilmiştir. Sıcaklık ölçümü test tüpü içerisinden, Peltier yüzeyinden ve PCR kutusundan olmak üzere üç ayrı bölgeden ölçülmüştür. PCR adım sıcaklıkları 95 °C denatürasyon, 72 °C uzama/uzatma ve 62°C bağlanma olarak ayarlanmış, adım süreleri değiştirilmiştir. PID kontrolör parametreleri uzama ve denatürasyon adımları için Kp 1.3898, Ki 3044.281 ve Kd 0.5, bağlanma adımı için ise Kp 10, Ki 5 ve Kd 2 olarak ayarlanmıştır. Mikro cihaz ile amplifiye edilecek PCR karışımlarının bir tanesinde buharlaşmayı önleyebilmek adına mineral yağı kullanılmış, diğerinde kullanılmamıştır. PCR işlemi ince cidarlı amplifikasyon tüpleri kullanılarak tekrar

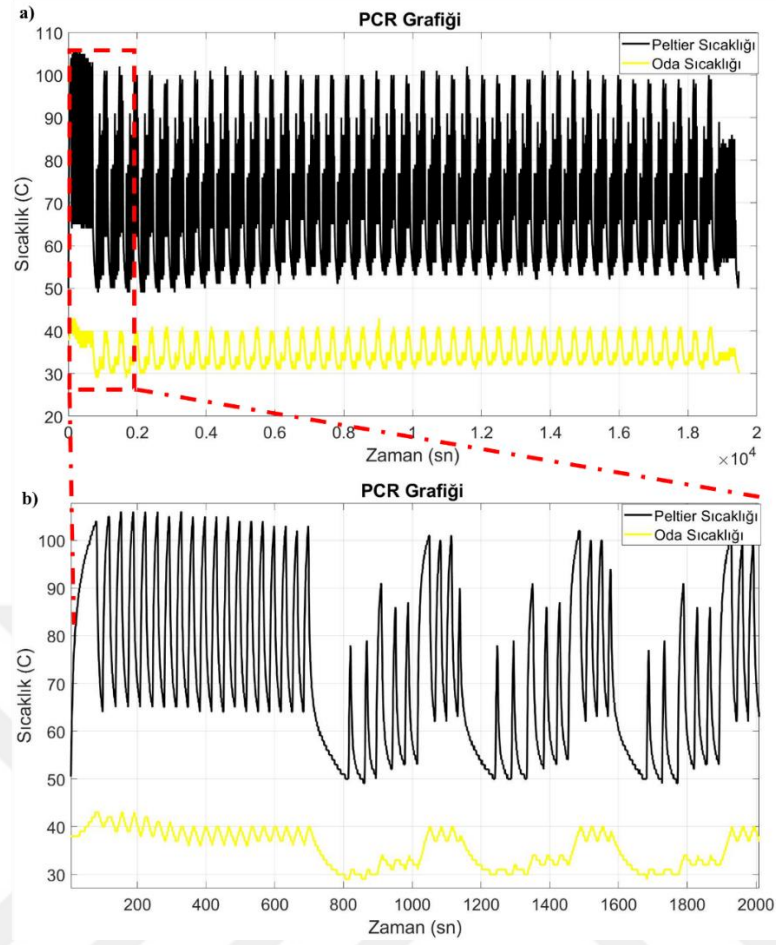
edilmiş ve mineral yağı kullanıldığında DNA örneği başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir (Şekil 6.16.). Elde edilen PCR işlemine ait sıcaklık-zaman grafikleri Şekil 6.17. ve 6.18.’de verilmiştir. Şekil 6.17.’de DS18B20 dijital sıcaklık sensörü ile test tüpü içerisinde ölçülen sıcaklık ile istenen sıcaklıklar bulunmaktadır. Şekil.6.18.’de ise Peltier yüzeyinden ve PCR kutusu içerisinde IR sıcaklık sensörü ile ölçülen sıcaklık-zaman grafiği verilmiştir. Güncellenmiş sistemin son hali Şekil 6.19.’da, PCR kutusunun iç bölümü Şekil.6.20’de ve PCR kutusu blok diyagramı Şekil.6.21.’de verilmiştir.



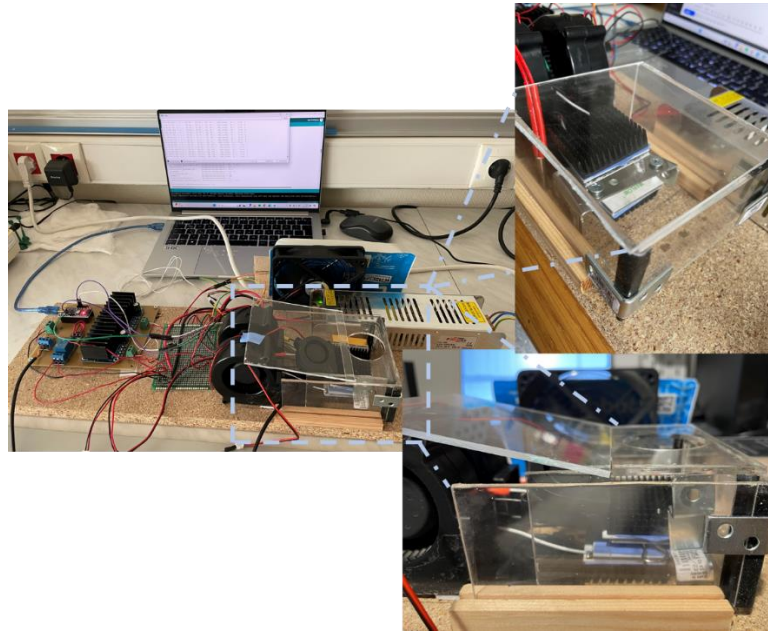
Şekil 6.16. İnce cidarlı amplifikasyon tüpleri kullanıldığında elde edilen agaroz jel elektroforez sonucu.



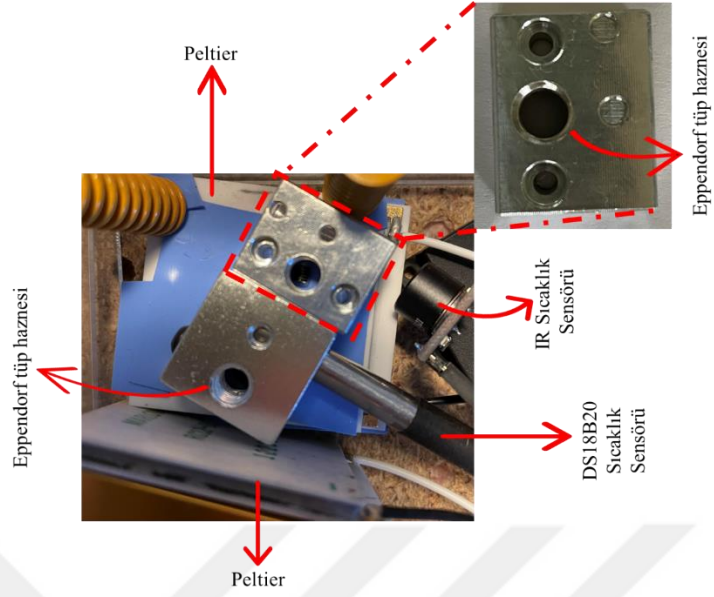
Şekil 6.17. PCR mikro cihazı ile PCR protokolü sırasında sıcaklık takibi ve grafiği. a) tüm PCR protokolü için ince cidarlı amplifikasyon tüpünün sıcaklık profili. b) başlangıç denatürasyonu ve tek bir döngü için sıcaklık profili.



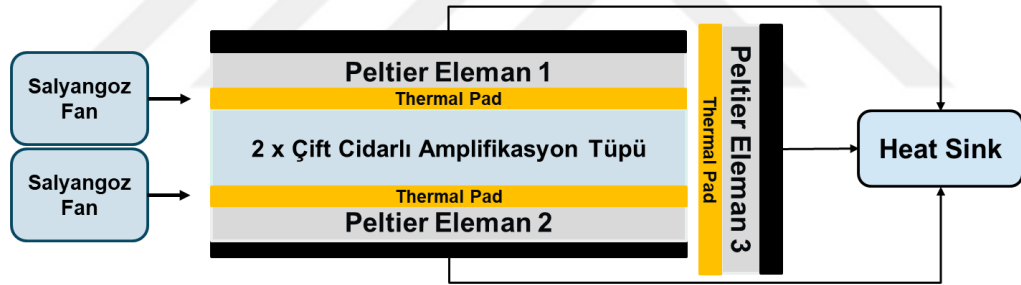
Şekil 6.18. PCR mikro cihazı ile PCR protokolü sırasında sıcaklık takibi ve grafiği. a) tüm PCR protokolü için Peltier elemanların sıcaklık profili. b) başlangıç denatürasyonu ve tek bir döngü için Peltier elemanların sıcaklık profili.



Şekil 6.19. Güncellenmiş PCR cihazı ve PCR kutusuna ait görseller.



Şekil 6.20. PCR Kutusunun, Al blok, İnce cidarlı amplifikasyon tüp haznesinin üstten görünümü.



Şekil 6.21. Çift Cidarlı Amplifikasyon Tüpü ile Kullanılan PCR Kutusu Blok Diyagramı.

Aşağıda başarılı amplifikasyon elde edilen ve 42 döngüden oluşan PCR işlemine ait veriler bulunmaktadır (Tablo 6.4.). PCR protokolü 95°C’de 11 dk başlangıç denatürasyonu, 62°C’de 195 sn bağlanma, 95°C’de 123 sn denatürasyon, 72°C’de 120 sn uzama ve 72°C’de 8 dk son uzama adımından oluşmaktadır. Toplam işlem süresi ise ~5 saat olmuştur. Tabloya göre sistemin ısıtma oranı 0,64°C/sn, soğutma oranı ise 0,33°C/sn olmuştur. Hesaplamalar yapılırken 5 döngünün ortalaması alınmıştır. Soğutma oranının PCR kutusunun tamamen kapatılması, adım sürelerinin arttırılması nedeniyle azaldığı düşünülmektedir. Adım süreleri başarılı amplifikasyon elde edebilmek ve kalış süresini arttırabilmek amacıyla arttırılmıştır.

Tablo 6.4. 42 döngüden oluşan PCR protokolü için Sıcaklık Döngüleyici Koşulları ve ısıtma/soğutma oranları.

	Sıcaklık Döngüleyici Adım Değişimi	Geçiş Süresi	Geçiş Oranı	Sıcaklık Döngüleyici Adımı	Adım Süresi
<i>Başlangıç</i>	27°C → 95°C	74 sn	0.92°C/sn	<i>Başlangıç Denatürasyonu</i>	11 dk
<i>42 Döngü</i>	95°C → 62°C	101 sn	0.33°C/sn	<i>Bağlanma</i>	195 sn
	62°C → 72°C	16 sn	0.63°C/sn	<i>Uzama</i>	120 sn
	72°C → 95°C	36 sn	0.64°C/sn	<i>Denatürasyon</i>	123 sn
<i>Son</i>	62°C → 72°C	18 sn	0.55°C/sn	<i>Son Uzama</i>	8 dk
<i>Toplam Süre</i>	5 saat				
<i>Sistemin Isıtma Oranı = (0.63 + 0.64) / 2 = 0.63,5 °C/sn</i>					

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, polimer, kâğıt ve cam tabanlı PCR mikroçipi ile örnek ısıtma ve soğutmaya izin veren düşük maliyetli, taşınabilir bir sıcaklık döngüleyici önerilmiştir. Mikroçip üretim yöntemi karmaşık değildir, ekonomik ve tek kullanımlıktır, bu da kullanılacak mikroçipi toplumun gereksinimleri için uygun bir çözüm haline getirmektedir. PCR cihazı, soğutma için bir salyangoz fan ve CPU fanı, ısıtma için Peltier elemanları ile bir PID kontrol devresi birleştirilerek üretilmiştir. PID sıcaklık kontrolörü, dijital sıcaklık sensörünün ölçümüne dayalı olarak üç sıcaklık adımı arasında sabit bir sıcaklığı korumak için kullanılmıştır. Ölçülen sıcaklık ile istenen ayar noktası arasındaki farkın hata değeri PID denetleyici tarafından sürekli olarak hesaplanmıştır. Ayarlanan değer değiştiğinde bile, hata aralığı hesaplanarak ve ayarlanarak sabit bir sıcaklık korunmaya çalışılmıştır. Genin başarılı bir şekilde çoğaltıldığını göstermek için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Kullanılan mikroçip ile başarılı amplifikasyon gerçekleştirilememiştir. Bu durumun nedeni buharlaşma ve kullanılan mikroçip malzemelerinin özellikleri olduğu düşünülmüştür. Daha sonra sistem ince cidarlı amplifikasyon tüpü kullanılacak şekilde güncellenmiş, PCR işlemi tekrar edilmiştir. Bu durumda amplifikasyon mineral yağı kullanıldığında başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir.

Önerilen PCR sıcaklık döngüleyici, mobilite, satın alınabilirlik ve performansı korurken sağlık hizmetlerini daha erişilebilir hale getirebilecektir. Sıcaklık döngüleyiciyi sahaya hazır hale getirmek için, POC testine tam entegrasyon ve kullanıma yönelik birkaç adım daha atılması gerekmektedir. Pozitif ve negatif örnekler için doğru değerler belirlemek amacıyla, mevcut cihaz ve PCR çipleri kullanılarak daha fazla örneğin analiz edilmesi gerekmektedir.

Minyatürize PCR sistemi tasarlarken dikkat edilmesi gereken iki durum bulunmaktadır. Birincisi bir döngüyü tamamlamak için gereken süre olan döngü süresidir. İkincisi ise amplifikasyon veya tespit süresidir. Bu da tespit edilebilir miktarda DNA oluşana kadar geçmesi gereken süredir. Kısa bir döngü süresi, döngünün verimliliği biraz daha uzun bir döngü süresinden daha düşük olduğunda (ve dolayısıyla daha fazla döngüye ihtiyaç duyulduğunda) daha uzun bir amplifikasyon süresine yol açabilir. Bu nedenle döngü süresinin yanı sıra döngünün verimliliği de dikkate alınmaktadır. PCR döngüsünün farklı adımları farklı zaman sınırlarına sahiptir. Denatürasyon ve bağlanma, uzama için gereken

süreden çok daha hızlı gerçekleşmektedir. Denatürasyon ve bağlanma süresinin, doğru sıcaklıklara ulaşıldığı anda meydana geldiği iddia edilirken, uzama, gerekli ürünün uzunluğuna, polimeraz hızına ve primerlerin ve polimerazın difüzyon süresine bağlı olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda farklı ısıtıcıların, farklı boyutta mikroçiplerin ve farklı PCR adımlarının kullanıldığı görülmüştür. Tablo 7.1., çeşitli araştırmalardan elde edilen verilere genel bir bakış sunmakta ve bu çalışmayı rapor edilen diğer mikro PCR cihazlarıyla karşılaştırmaktadır. Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında ısıtma ve soğutma hızı ile ilgili iyileştirmeye ihtiyaç olduğu görülmüştür. Yapılan ilk denemelerde elde edilen 1,60°C/sn olan ısıtma hızının bazı çalışmalar ile benzer olduğu görülmüştür. Cihazımızdaki CPU soğutma yöntemi, sıcaklık döngüleyici kutusu içindeki mikroçipten ısının atılmasında büyük bir etki sağlamamıştır. Bununla birlikte, PCR çipinin bulunduğu kutucuğa yalnızca birkaç mikrolitre içeren bir örneği tutabilecek bir sıcaklık sensörünün yerleştirilmesi zorlayıcı olmuştur. Ayrıca, PCR çipinin girişinin ve çıkışının kapatılması zorlayıcı olmuştur. Ayrıca eksik bir kapatma örneğin buharlaşmasına neden olmaktadır. Örneğin anlık sıcaklığının doğrudan ölçülememesi nedeniyle öncelikle ısıtıcı eleman Peltier'in sıcaklığı izlenmiştir. Bu durumda hem mikroçip hem ince cidarlı amplifikasyon tüp kullanıldığında başarılı amplifikasyon elde edilememiştir. Daha sonra sıcaklık test tüpü içerisinden, Peltier eleman üzerinden ve PCR kutusu içerisinden ölçülmüştür. DS18B20 sıcaklık sensörü PCR işleminin gerçekleştiği kutu içerisinde olduğundan ve PCR örnek karışımı kutu içerisine yerleştirildiğinden, Peltier yüzeyinden ölçüm alan IR sıcaklık sensör sıcaklığı DS18B20 ile toplanan sıcaklığa kıyasla biraz daha fazla olmuştur. Gerçek koşulları simüle etmek için DS18B20 sensörü, 25 µl su içeren kapalı bir 200 µl PCR İnce cidarlı amplifikasyon tüp tüpünün içine yerleştirilmiştir. Ölçümler bu şekilde ince cidarlı amplifikasyon tüpleri ile de gerçekleştirilmiştir. İstenilen sıcaklıklara daha hızlı ulaşmak bu çalışmanın amaçlarından biri olduğu için literatürde bulunan sıcaklık döngüleyicilerden ve konvansiyonel PCR cihazlarından farklı olması için çalışmalara devam edilmektedir.

Tablo 7.1. Mikroçip Kullanan Sıcaklık Döngüleyicilerin Tip, Boyut ve Hızının Karşılaştırılması.

PCR Tipi	PCR Çip Malzemesi	Isıtıcı Tipi	Boyut (mm ³)	Isıtma Oranı (°C/sn)	Soğutma Oranı (°C/sn)	PCR Adımları	Ref.
Konvansiyonel ve Mikroçip	PMMA + Cam + DSA	TEC - Peltier	24 x 50 x 5 or 22 x22 x 5	1.60 (max) 0,64	1.08 (max) 0,33	92°C (den) 55°C (ann) 72°C (ext)	(Bizim Cihazımız)
Konvansiyonel	Cam	Çip Dirençli Isıtıcı	40 x 40 x 25	21.9	1.4	95°C (den) 60°C (ann) 72°C (ext)	[11]
Real Time	İnce Film	Pt	50 x 30 x 20	2.9	1.3	94°C (den) 58°C (ann) 72°C (ext)	[158]
Konvansiyonel	magnet, polypropylene tube, acrylic	TEC	6 x 7 x 3	2.8	2.5	95°C (den) 60°C (ann/ext)	[159]
Konvansiyonel	PMMA	PCB mikroısıtıcı	54.1 x 24.9	1.1 - 1.4	0.5 - 0.6	90°C (den) 55°C (ann/ext)	[160]
Konvansiyonel	PDMS-glass	Pt Isıtıcı	18 × 10 × 2.5	6	4	98 °C (den) 55 °C (ann) 72 °C (ext)	[104]
Konvansiyonel	Polikarbonat	Isıtıcı Plaka	34×20×1.0	1.8	2	95 °C (den) 72 °C (ext) 60 °C (ann)	[161]
Real Time	PDMS	Thermoelectric Cooler (TEC)	18.5 x 18.5 x 1	4.1	2.8	95 °C (initial den) 95°C (den) 60 °C (ann/ext)	[162]
Konvansiyonel	PMMA	Infrared LED	20µL	1.5	2	94 °C (den) 55 °C (ann) 72 °C (ext)	[163]

Mevcut literatürde, geleneksel PCR tüplerini kullanan, uygun maliyetli ve taşınabilir PCR cihazları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Piyasada bulunan çok sayıda cihaz önemli maliyetlere sahiptir. Sistemimizin maliyetinin ~7000 TRY olduğu düşünüldüğünde, çok düşük maliyet, daha küçük hacim ve kullanıcı dostu olma avantajına sahiptir ve bu da sahada uygulama potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Tablo 7.2 çeşitli çalışmalardan elde edilen verilere genel bir bakış sunmakta ve İnce cidarlı amplifikasyon tüp kullanan PCR cihazlarını karşılaştırmaktadır. Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında ısıtıcı eleman olarak Peltier veya ısıtıcı plakalar kullanılmış, soğutma için ise genellikle fan veya su tankı kullanılmıştır. Başarılı amplifikasyon gerçekleştiren çalışmaların büyük çoğunluğunda iki farklı sıcaklık adımı kullanan PCR döngüsü gerçekleştirilmiştir. Bax geni kullanarak amplifikasyon gerçekleştiren çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.



Tablo 7.2. İnce Cidarlı Amplifikasyon Tüp Kullanan Sıcaklık Döngüleyicilerin Malzeme, Kontrolör ve PCR Koşulları Karşılaştırılması.

Cihaz Bileşenleri	PCR	PCR Koşulları	Sonuç	Kontrolör	REF
STM32 mikrodenetleyici	tüp	65 °C ve 95 °C	SEC61 translocon subunit alpha, ORF1ab, Matrix Metalloproteinase	PID	[127]
Fan					
TEC					
Güç kaynağı					
heat sink					
pt1000					
h köprüsü					
Termokupl	tüp	Isıtma / soğutma oranları sırasıyla 7.2, 6.12, 5.52 ve 5.28 °C /s	Amplifikasyon yok	-	[164]
Su tankı					
Su pompası					
Fan					
pc					
heat sink	tüp	94-95 °C, 52-54 °C, 74-76 °C	turmeric DNA	PID	[148]
Peltier eleman					
al blok					
DS18B20 sıcaklık sensörü					
Arduino UNO					
Akrilik					
Arduino Nano	tüp	65 °C ve 105 °C	SARS-CoV-2 (E geni ve RdRp geni)	PID	[150]
Fan					
ısıtıcı blok- PCB					
K-tipi termokupl					
LM35 sıcaklık sensörü					
Lid ısıtıcı (Kartuş ısıtıcı)	tüp	95 °C 30 s, 52.8 °C 30 s ve 72 °C 30 s, maksimum hız 2 °C/s	bacteriophage phi6	PID	[165]
Peltier eleman					
heat sink					
Termistör					
h köprüsü					
Fan					
Fan	tüp	2 °C/s ısıtma ve soğutma hızı, 95 °C 15 s ve 60 °C 1 dk	T. pallidum (Syphilis) bakteriyel DNA ve Zika virüs RNA örnekleri	PID	[130]
NTC termistör					
Arduino Nano					
AC/DC adaptör (giriş 100-240 V—50/60 Hz—çıkış 12 V, 5)					
PCB ısıtıcı					
Lid ısıtıcı	tüp	10 dk 95 °C'de başlangıç denatürasyonu, 40 döngü 95 °C 30 s denatürasyon, 55 °C (30 s bağlanma), ve 72 °C (60 s uzama), 72°C'de 10 dk son uzama	Listeria	progressive selective PID	[95]
Dirençli ısıtıcı					
12 V, 20 A DC güç kaynağı					
TEC Peltier soğutma için					
Fan					
heat sink					

KAYNAKLAR

- [1] A. J. Geall, C. W. Mandl, and J. B. Ulmer, “RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines,” *Semin. Immunol.*, vol. 25, no. 2, pp. 152–159, 2013, doi: 10.1016/j.smim.2013.05.001.
- [2] A. Kowalczyk, “Trends and perspectives in DNA biosensors as diagnostic devices,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 23, pp. 36–41, 2020, doi: 10.1016/j.coelec.2020.03.003.
- [3] S. Park, Y. Zhang, S. Lin, T. H. Wang, and S. Yang, “Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 830–839, 2011, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.017.
- [4] G. G. Morbioli, T. Mazzu-Nascimento, A. Aquino, C. Cervantes, and E. Carrilho, “Recombinant drugs-on-a-chip: The usage of capillary electrophoresis and trends in miniaturized systems – A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 935, pp. 44–57, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.06.019.
- [5] Y. Zhang and P. Ozdemir, “Microfluidic DNA amplification-A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 638, no. 2, pp. 115–125, 2009, doi: 10.1016/j.aca.2009.02.038.
- [6] M. Joshi and J. D. Deshpande, “Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application,” *Int. J. Biomed. Res.*, vol. 2, no. 1, 2011, doi: 10.7439/ijbr.v2i1.83.
- [7] C. D. Ahrberg, A. Manz, and B. G. Chung, “Polymerase chain reaction in microfluidic devices,” *Lab Chip*, vol. 16, no. 20, pp. 3866–3884, 2016, doi: 10.1039/c6lc00984k.
- [8] J. D. Kim *et al.*, “Chamber temperature measurement of micro PCR chip using thermocouple,” *Int. J. Multimed. Ubiquitous Eng.*, vol. 7, no. 2, pp. 395–402, 2012.
- [9] J. M. Trauba and C. T. Wittwer, “Microfluidic Extreme PCR: <1 Minute DNA Amplification in a Thin Film Disposable,” *J. Biomed. Sci. Eng.*, vol. 10, no. 05, pp. 219–231, 2017, doi: 10.4236/jbise.2017.105017.
- [10] Y. Fuchiwaki, H. Nagai, M. Saito, and E. Tamiya, “Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 27, no. 1, pp. 88–94, 2011, doi: 10.1016/j.bios.2011.06.022.
- [11] D. Yeom *et al.*, “A Thermocycler Using a Chip Resistor Heater and a Glass Microchip

- for a Portable and Rapid Microchip-Based PCR Device,” *Micromachines*, vol. 13, no. 2, 2022, doi: 10.3390/mi13020339.
- [12] M. Teymouri *et al.*, “Recent advances and challenges of RT-PCR tests for the diagnosis of COVID-19,” *Pathol. Res. Pract.*, vol. 221, no. March, p. 153443, 2021, doi: 10.1016/j.prp.2021.153443.
- [13] G. Torezin, M. Cassaboni, and B. De Oliveira, “A new RT-LAMP-on-a-Chip Instrument for SARS-CoV-2 diagnostics,” *Microchem. J.*, vol. 180, no. January, 2022, doi: 10.1016/j.microc.2022.107600.
- [14] T. Yang, Y. C. Wang, C. F. Shen, and C. M. Cheng, “Point-of-care RNA-based diagnostic device for Covid-19,” *Diagnostics*, vol. 10, no. 3, pp. 9–11, 2020, doi: 10.3390/diagnostics10030165.
- [15] H. Zhu, H. Zhang, S. Ni, M. Korabečná, L. Yobas, and P. Neuzil, “The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 130, p. 115984, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2020.115984.
- [16] M. Madadelahi, R. Agarwal, S. O. Martinez-Chapa, and M. J. Madou, “A roadmap to high-speed polymerase chain reaction (PCR): COVID-19 as a technology accelerator,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 246, no. November 2023, p. 115830, 2024, doi: 10.1016/j.bios.2023.115830.
- [17] A. Ganguli *et al.*, “Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 37, pp. 22727–22735, 2020, doi: 10.1073/pnas.2014739117.
- [18] H. Zhu *et al.*, “IoT PCR for pandemic disease detection and its spread monitoring,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 303, no. September 2019, 2020, doi: 10.1016/j.snb.2019.127098.
- [19] “FIND COVID-19 TEST DIRECTORY,” 2022. .
- [20] X. Dong *et al.*, “Rapid PCR powered by microfluidics: A quick review under the background of COVID-19 pandemic,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 143, p. 116377, 2021, doi: 10.1016/j.trac.2021.116377.
- [21] X. Chen *et al.*, “Ultrafast PCR Detection of COVID-19 by Using a Microfluidic Chip-Based System,” *Bioengineering*, vol. 9, no. 10, 2022, doi:

10.3390/bioengineering9100548.

- [22] R. J. Roberts, "Nucleic Acid," *Encyclopedia Britannica*. .
- [23] N. Bermingham and K. Leuttich, "PCR and its Applications," *Curr. Diagnostic Pathol.*, vol. 9, pp. 159–164, 2003, doi: 10.1016/S0968.
- [24] S. Shahi, S. Zununi Vahed, N. Fathi, and S. Sharifi, "Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 117, pp. 983–992, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.085.
- [25] JMWagesJr, "Polymerase Chain Reaction," in *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 123, 2005, pp. 45–66.
- [26] J. S. Farrar and C. T. Wittwer, "Extreme PCR: Efficient and specific DNA amplification in 15-60 seconds," *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 145–153, 2015, doi: 10.1373/clinchem.2014.228304.
- [27] C. D. Ahrberg, B. R. Ilic, A. Manz, and P. Neužil, "Handheld real-time PCR device," *Lab Chip*, vol. 16, no. 3, pp. 586–592, 2016, doi: 10.1039/c5lc01415h.
- [28] A. Wuethrich and J. P. Quirino, "A decade of microchip electrophoresis for clinical diagnostics – A review of 2008–2017," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1045, pp. 42–66, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2018.08.009.
- [29] Q. Di HE, D. P. HUANG, G. HUANG, and Z. G. CHEN, "Advance in Research of Microfluidic Polymerase Chain Reaction Chip," *Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 44, no. 4, pp. 542–550, 2016, doi: 10.1016/S1872-2040(16)60921-0.
- [30] H. Zhu, H. Zhang, Y. Xu, S. Laššáková, M. Korabečná, and P. Neužil, "PCR past, present and future," *Biotechniques*, vol. 69, no. 4, pp. 317–325, 2020, doi: 10.2144/BTN-2020-0057.
- [31] M. A. A. Valones, R. L. Guimarães, L. A. C. Brandão, P. R. E. De Souza, A. De Albuquerque Tavares Carvalho, and S. Crovela, "Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–11, 2009, doi: 10.1590/S1517-83822009000100001.
- [32] J. A. Carriço, A. J. Sabat, A. W. Friedrich, and M. Ramirez, "Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: Databases, tools and the next-

- generation sequencing revolution,” *Eurosurveillance*, vol. 18, no. 4, pp. 1–8, 2013, doi: 10.2807/ese.18.04.20382-en.
- [33] Y. M. D. Lo and K. C. A. Chan, “Introduction to the polymerase chain reaction,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 336, pp. 1–10, 2006, doi: 10.1385/1-59745-074-x:1.
- [34] A. G. Jagtar Singh, Niti Birbian, Shweta Sinha, “A critical review on PCR, its types and applications,” *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 7, pp. 65–80, 2014.
- [35] Y. Ouyang *et al.*, “A disposable laser print-cut-laminate polyester microchip for multiplexed PCR via infra-red-mediated thermal control,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 901, pp. 59–67, 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.09.042.
- [36] S. Chen *et al.*, “Present status of microfluidic PCR chip in nucleic acid detection and future perspective,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 157, p. 116737, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116737.
- [37] E. Asghari *et al.*, “Ultra-fast one-step RT-PCR protocol for the detection of SARS-CoV-2,” *medRxiv*, vol. pre-print, p. 2020.06.25.20137398, 2020.
- [38] R. Cuchacovich, “Clinical Applications of the Polymerase Chain Reaction: An Update,” *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 20, no. 4, pp. 735–758, 2006, doi: 10.1016/j.idc.2006.09.003.
- [39] P. Markoulatos, N. Siafakas, and M. Moncany, “Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach,” *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 16, no. 1, pp. 47–51, 2002, doi: 10.1002/jcla.2058.
- [40] H. S. Huang, C. L. Tsai, J. Chang, T. C. Hsu, S. Lin, and C. C. Lee, “Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis,” *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 24, no. 10, pp. 1055–1063, 2018, doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.018.
- [41] M. R. Green and J. Sambrook, “Nested polymerase chain reaction (PCR),” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2019, no. 2, pp. 175–179, 2019, doi: 10.1101/pdb.prot095182.
- [42] S. Sabour, “Diagnostic reliability of nested PCR: Methodological issues on reliability and validity,” *Helicobacter*, vol. 25, no. 4, pp. 1–2, 2020, doi: 10.1111/hel.12701.

- [43] S. A. Bustin, "Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 25, no. 2, pp. 169–193, 2000, doi: 10.1677/jme.0.0250169.
- [44] A. Farasani, "Genetic analysis of the 2019 coronavirus pandemic with from real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 911–916, 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.035.
- [45] Y. Li *et al.*, "Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19," *J. Med. Virol.*, vol. 92, no. 7, pp. 903–908, 2020, doi: 10.1002/jmv.25786.
- [46] C. J. Smith and A. M. Osborn, "Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 67, no. 1, pp. 6–20, 2009, doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
- [47] A. Tastanova *et al.*, "A Comparative Study of Real-Time RT-PCR–Based SARS-CoV-2 Detection Methods and Its Application to Human-Derived and Surface Swabbed Material," *J. Mol. Diagnostics*, vol. 23, no. 7, pp. 796–804, 2021, doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.04.009.
- [48] S. Lei, S. Chen, and Q. Zhong, "Digital PCR for accurate quantification of pathogens: Principles, applications, challenges and future prospects," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 184, no. February, pp. 750–759, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.132.
- [49] R. Lu, J. Wang, M. Li, Y. Wang, J. Dong, and W. Cai, "SARS-CoV-2 detection using digital PCR for COVID-19 diagnosis ," 2020.
- [50] N. Gupta *et al.*, "Point-of-care PCR assays for COVID-19 detection," *Biosensors*, vol. 11, no. 5, 2021, doi: 10.3390/bios11050141.
- [51] FDA, "In Vitro Diagnostics EUAs," *FDA*, 2022. .
- [52] L. M. J. Nijsten, "Fast temperature changes for polymerase chain reaction (PCR) on a lab-on-a-chip (LoaC)," university of twente, 2013.
- [53] F. Ahmad and S. A. Hashsham, "Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point-of-care diagnostics: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 733, pp. 1–15, 2012, doi: 10.1016/j.aca.2012.04.031.

- [54] S. Petralia and S. Conoci, “PCR technologies for point of care testing: Progress and perspectives,” *ACS Sensors*, vol. 2, no. 7, pp. 876–891, 2017, doi: 10.1021/acssensors.7b00299.
- [55] S. Dunbar and S. Das, “Amplification chemistries in clinical virology,” *J. Clin. Virol.*, vol. 115, no. November 2018, pp. 18–31, 2019, doi: 10.1016/j.jcv.2019.03.015.
- [56] W. Su, X. Gao, L. Jiang, and J. Qin, “Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1377, pp. 13–26, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2014.12.041.
- [57] R. Shen *et al.*, “Nucleic acid analysis on electrowetting-based digital microfluidics,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 158, p. 116826, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116826.
- [58] X. Xia, H. Yang, J. Cao, J. Zhang, Q. He, and R. Deng, “Isothermal nucleic acid amplification for food safety analysis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 153, p. 116641, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116641.
- [59] B. Xiao, R. Zhao, N. Wang, J. Zhang, X. Sun, and A. Chen, “Recent advances in centrifugal microfluidic chip-based loop-mediated isothermal amplification,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 158, 2023, doi: 10.1016/j.trac.2022.116836.
- [60] Cooper GM, “Detection of Nucleic Acids and Proteins,” in *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd editio., Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
- [61] R. Pol, F. Céspedes, D. Gabriel, and M. Baeza, “Microfluidic lab-on-a-chip platforms for environmental monitoring,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 95, pp. 62–68, 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.08.001.
- [62] J. Butler, *Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR*, 2nd Editio. 2004.
- [63] C. M. Kim and C. D. Smolke, “Biomedical applications of RNA-based devices,” *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 4, pp. 106–115, 2017, doi: 10.1016/j.cobme.2017.10.005.
- [64] I. Latorre, V. Saludes, J. Díez, and A. Meyerhans, “Techniques of Nucleic Acid-Based Diagnosis in the Management of Bacterial and Viral Infectious Diseases,” *Nucleic Acids as Mol. Diagnostics*, vol. 9783527335, pp. 201–216, 2015, doi:

10.1002/9783527672165.ch09.

- [65] B. Buszewski, E. Maślak, M. Złoch, V. Railean-Plugaru, E. Kłodzińska, and P. Pomastowski, “A new approach to identifying pathogens, with particular regard to viruses, based on capillary electrophoresis and other analytical techniques,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 139, 2021, doi: 10.1016/j.trac.2021.116250.
- [66] A. Wuethrich and J. P. Quirino, “A decade of microchip electrophoresis for clinical diagnostics – A review of 2008–2017,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1045, pp. 42–66, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2018.08.009.
- [67] Y. H. Chen, W. C. Wang, K. C. Young, T. T. Chang, and S. H. Chen, “Plastic microchip electrophoresis for analysis of PCR products of hepatitis C virus,” *Clin. Chem.*, vol. 45, no. 11, pp. 1938–1943, 1999, doi: 10.1093/clinchem/45.11.1938.
- [68] C. Zhang, J. Xu, W. Ma, and W. Zheng, “PCR microfluidic devices for DNA amplification,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, no. 3, pp. 243–284, 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.10.002.
- [69] G. Panicker, D. R. Call, M. J. Krug, and A. K. Bej, “Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 12, pp. 7436–7444, 2004, doi: 10.1128/AEM.70.12.7436-7444.2004.
- [70] C. D. Chin, V. Linder, and S. K. Sia, “Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities,” *Lab Chip*, vol. 7, no. 1, pp. 41–57, 2007, doi: 10.1039/b611455e.
- [71] V. Gubala, L. F. Harris, A. J. Ricco, M. X. Tan, and D. E. Williams, “Point of care diagnostics: Status and future,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 2, pp. 487–515, 2012, doi: 10.1021/ac2030199.
- [72] A. Manocha and S. Bhargava, “Emerging challenges in point-of-care testing,” *Curr. Med. Res. Pract.*, vol. 9, no. 6, pp. 227–230, 2019, doi: 10.1016/j.cmrp.2019.11.006.
- [73] T. Nguyen *et al.*, “Point-of-care devices for pathogen detections: The three most important factors to realise towards commercialization,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 131, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2020.116004.
- [74] Y. Manmana, T. Kubo, and K. Otsuka, “Recent developments of point-of-care (POC)

- testing platform for biomolecules,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 135, p. 116160, 2021, doi: 10.1016/j.trac.2020.116160.
- [75] C. Wang, M. Liu, Z. Wang, S. Li, Y. Deng, and N. He, “Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices,” *Nano Today*, vol. 37, p. 101092, 2021, doi: 10.1016/j.nantod.2021.101092.
- [76] V. Garzarelli, M. S. Chiriaco, M. Cereda, I. Autuori, and F. Ferrara, “Miniaturized Real-Time PCR systems for SARS-CoV-2 detection at the Point-of-Care,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 536, no. June, pp. 104–111, 2022, doi: 10.1016/j.cca.2022.09.014.
- [77] Y. Yang, Y. Chen, H. Tang, N. Zong, and X. Jiang, “Microfluidics for Biomedical Analysis,” *Small Methods*, vol. 4, no. 4, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1002/smtd.201900451.
- [78] S. L. Karsten, M. C. Tarhan, L. C. Kudo, D. Collard, and H. Fujita, “Point-of-care (POC) devices by means of advanced MEMS,” *Talanta*, vol. 145, pp. 55–59, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.04.032.
- [79] Z. E. Jeroish, K. S. Bhuvaneshwari, F. Samsuri, and V. Narayanamurthy, *Microheater: material, design, fabrication, temperature control, and applications— a role in COVID-19*, vol. 24, no. 1. Springer US, 2022.
- [80] A. T. Woolley, D. Hadley, P. Landre, J. Andrew, R. A. Mathies, and M. A. Northrup, “Functional Integration of PCR Amplification and Capillary Electrophoresis in a Microfabricated DNA Analysis Device electrophoresis (CE) chips have been successfully coupled,” *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 23, pp. 4081–4086, 1996.
- [81] M. L. Kovarik *et al.*, “Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications in the Laboratory, Clinic, and Field,” *Anal Chem*, vol. 85, no. 2, pp. 451–472, 2014, doi: 10.1021/ac3031543.Micro.
- [82] G. R. M. Duarte, C. W. Price, B. H. Augustine, E. Carrilho, and J. P. Landers, “Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 13, pp. 5182–5189, 2011, doi: 10.1021/ac200292m.
- [83] D. Li, C. Batchelor-Mcauley, L. Chen, and R. G. Compton, “Band Electrodes in Sensing Applications: Response Characteristics and Band Fabrication Methods,” *ACS*

- Sensors*, vol. 4, no. 9, pp. 2250–2266, 2019, doi: 10.1021/acssensors.9b01172.
- [84] J. Qiu, Q. Gao, H. Zhao, J. Fu, and Y. He, “Rapid Customization of 3D Integrated Microfluidic Chips via Modular Structure-Based Design,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 10, pp. 2606–2616, 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00401.
- [85] Z. Meng, H. Raji, M. Tayyab, and M. Javanmard, “Cell phone microscopy enabled low-cost manufacturable colorimetric urine glucose test,” *Biomed. Microdevices*, vol. 25, no. 4, pp. 1–10, 2023, doi: 10.1007/s10544-023-00682-y.
- [86] K. Kikkeri, F. M. Naba, and J. Voldman, “Rapid, low-cost fabrication of electronic microfluidics via inkjet-printing and xurography (MINX),” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 237, no. June, p. 115499, 2023, doi: 10.1016/j.bios.2023.115499.
- [87] K. Kalkandjiev *et al.*, “Microfluidics in silicon/polymer technology as a cost-efficient alternative to silicon/glass,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 21, no. 2, 2011, doi: 10.1088/0960-1317/21/2/025008.
- [88] K. Wang, L. He, A. Manz, and W. Wu, “User-friendly microfabrication method for complex topological structure and three-dimensional microchannel with the application prospect in polymerase chain reaction (PCR),” *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 3, pp. 1523–1528, 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.0c03827.
- [89] N. Y. Lee, “Recent progress in lab-on-a-chip technology and its potential application to clinical diagnoses,” *Int. Neurol. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 2–10, 2013, doi: 10.5213/inj.2013.17.1.2.
- [90] L. Mazutis *et al.*, “Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single DNA molecule isothermal amplification and analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 12, pp. 4813–4821, 2009, doi: 10.1021/ac900403z.
- [91] P. J. Asciello and A. J. Baeumner, “Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 8, pp. 1420–1430, 2011, doi: 10.1039/c0lc00666a.
- [92] C. Zhang and D. Xing, “Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: Latest advances and future trends,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 13, pp. 4223–4237, 2007, doi: 10.1093/nar/gkm389.
- [93] T. Pogfai, A. Wisitsoraat, A. Tuantranont, K. Wong-Ek, and S. Mongpraneet, “Low Cost and Portable PCR Thermoelectric Cycle,” *Int. J. Appl. Biomed. Eng.*, vol. 1, no.

January, pp. 41–45, 2008.

- [94] D. Wu and W. Wu, “Battery powered portable thermal cycler for continuous-flow polymerase chain reaction diagnosis by single thermostatic thermoelectric cooler and open-loop controller,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 7, 2019, doi: 10.3390/s19071609.
- [95] T. Kadja, C. Liu, Y. Sun, and V. P. Chodavarapu, “Low-Cost, Real-Time Polymerase Chain Reaction System for Point-of-Care Medical Diagnosis,” *Sensors*, vol. 22, no. 6, 2022, doi: 10.3390/s22062320.
- [96] W. Wu and N. Y. Lee, “Three-dimensional on-chip continuous-flow polymerase chain reaction employing a single heater,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, no. 7, pp. 2053–2060, 2011, doi: 10.1007/s00216-011-4947-x.
- [97] L. He, B. Sang, and W. Wu, “Battery-powered portable rotary real-time fluorescent qPCR with low energy consumption, low cost, and high throughput,” *Biosensors*, vol. 10, no. 5, 2020, doi: 10.3390/BIOS10050049.
- [98] S. Li and S. Chen, “Design, simulation, and microfabrication of a heat-conduction DNA chip with integrated microheaters,” *J. Manuf. Process.*, vol. 6, no. 1, pp. 81–87, 2004, doi: 10.1016/S1526-6125(04)70061-4.
- [99] U. Barman, R. S. Wiederkehr, P. Fiorini, L. Lagae, and B. Jones, “A comprehensive methodology for design and development of an integrated microheater for on-chip DNA amplification,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 28, no. 8, 2018, doi: 10.1088/1361-6439/aabd2c.
- [100] M. B. Turgay and A. G. Yazıcıoğlu, “Numerical simulation of fluid flow and heat transfer in a trapezoidal microchannel with COMSOL multiphysics: A case study,” *Numer. Heat Transf. Part A Appl.*, vol. 73, no. 5, pp. 332–346, 2018, doi: 10.1080/10407782.2017.1420302.
- [101] F. Bragheri, R. M. Vazquez, and R. Osellame, *Microfluidics*. Elsevier Inc., 2016.
- [102] G. T. Polley, “Heat transfer and fluid flow,” *Phys. Technol.*, vol. 7, no. 3, pp. 132–133, 1976, doi: 10.1088/0305-4624/7/3/407.
- [103] R. T. Balmer, *modern engineering thermodynamics*, vol. 13, no. 1. 2011.

- [104] F. Cui *et al.*, “Design and experiment of a PDMS-based PCR chip with reusable heater of optimized electrode,” *Microsyst. Technol.*, vol. 23, no. 8, pp. 3069–3079, 2017, doi: 10.1007/s00542-016-3064-3.
- [105] N. S. Nise, *Control Systems Engineering*, Sixth Edit., vol. 517. 2011.
- [106] G. C. Goodwin, S. F. Graebe, and M. E. Salgado, *Control system design.*, vol. 36. 2000.
- [107] K. N. R. V. Sailaja, “PID Controller Tuning using Ziegler-Nichols Method for Temperature control of Thermal Cycler,” pp. 1289–1296, 2019, doi: 10.15662/IJAREEIE.2019.0804024.
- [108] L. Wang, *PID Control System Design and Automatic Tuning using MATLAB/Simulink*. Australia: IEEE Press, 2020.
- [109] C. Gamze, T. Şen, and M. Yüksekaya, “Recent Advances in Science and Technology of Materials,” 1973, doi: 10.1007/978-1-4684-7233-2.
- [110] N. R. K. Sailaja Vangimalla, Ramesh Datla, Lakshmi Prasad M, “DESIGN AND DEVELOPMENT OF THERMAL CYCLER (PCR INSTRUMENT) FOR DNA ANALYSIS,” *Int. J. Eng. Sci. Res. Technol.*, vol. 8, no. 5, 2019.
- [111] M. D. Thakor, S. K. Hadia, and A. Kumar, “Precise temperature control through Thermoelectric Cooler with PID controller,” *2015 Int. Conf. Commun. Signal Process. ICCSP 2015*, no. June, pp. 1118–1122, 2015, doi: 10.1109/ICCSP.2015.7322677.
- [112] J. Böhm, “Digital control system analysis and design,” *Automatica*, vol. 33, no. 9, pp. 1767–1768, 1997, doi: 10.1016/s0005-1098(97)82236-4.
- [113] K. H. Ang, G. Chong, and Y. Li, “PID control system analysis, design, and technology,” *IEEE Trans. Control Syst. Technol.*, vol. 13, no. 4, pp. 559–576, 2005, doi: 10.1109/TCST.2005.847331.
- [114] K. J. Åström and T. Hägglund, “The future of PID control,” *Control Eng. Pract.*, vol. 9, no. 11, pp. 1163–1175, 2001, doi: 10.1016/S0967-0661(01)00062-4.
- [115] M. Sarif, D. V. A. Kumar, M. Venu, and G. Rao, “Comparison Study of PID Controller Tuning using Classical/Analytical Methods,” *Int. J. Appl. Eng. Res.*, vol.

- 13, no. 8, pp. 5618–5625, 2018.
- [116] H. I. Jaafar, S. Yuslinda, M. Shahrieel, and M. Aras, “Development of PID Controller for Controlling Desired Level of Coupled Tank System,” *Int. J. Innov. Technol. Explor. Eng.*, no. 3, pp. 2278–3075, 2014.
 - [117] B. Copeland, “The Design of PID Controllers using Ziegler Nichols Tuning,” *Retrieved, March*, no. March, pp. 1–4, 2008.
 - [118] S. B. Joseph, E. G. Dada, A. Abidemi, D. O. Oyewola, and B. M. Khammas, “Metaheuristic algorithms for PID controller parameters tuning: review, approaches and open problems,” *Heliyon*, vol. 8, no. 5, p. e09399, 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09399.
 - [119] O. A. Somefun, K. Akingbade, and F. Dahunsi, “The dilemma of PID tuning,” *Annu. Rev. Control*, vol. 52, no. May, pp. 65–74, 2021, doi: 10.1016/j.arcontrol.2021.05.002.
 - [120] J. Qian and L. Sun, “Application of Transfer Function in Predicting the Temperature Field of Space Equipment Under Periodic External Heat Flow,” *Front. Energy Res.*, vol. 10, no. March, pp. 1–11, 2022, doi: 10.3389/fenrg.2022.833071.
 - [121] E. P. Engineering, “Dynamic analysis and time response,” in *Process Dynamics*, .
 - [122] C. de Silva, “Time Response,” in *Vibration*, no. 1, 1999.
 - [123] G. S. Sandhu and J. S. Dilawari, “A Review Paper on Microprocessor Based Controller Programming,” *arXiv*, vol. 1, 2012.
 - [124] Q. Xianbo and Y. Jingqi, “Temperature control for PCR thermocyclers based on peltier-effect thermoelectric,” *Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. - Proc.*, vol. 7 VOLS, no. February, pp. 7509–7512, 2005, doi: 10.1109/iembs.2005.1616249.
 - [125] H. E. Kim, A. Schuck, W. Y. Kim, E. K. Jung, Y. H. Hong, and Y. S. Kim, “PID Temperature Control System-Based Microfluidic PCR Chip for Genetic Analysis,” *J. Electr. Eng. Technol.*, vol. 17, no. 1, pp. 495–501, 2022, doi: 10.1007/s42835-021-00969-1.
 - [126] L. Li, L. Zhu, Q. Jiang, and G. Liu, “Optimizing of thermal cycler control in microfluidic PCR system,” *Appl. Mech. Mater.*, vol. 263–266, no. PART 1, pp. 713–

717, 2013.

- [127] L. Yao, Y. Jiang, Z. Tan, and W. Wu, “Construction of Very Low-Cost Loop Polymerase Chain Reaction System Based on Proportional-Integral-Derivative Temperature Control Optimization Algorithm and Its Application in Gene Detection,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 50, pp. 46003–46011, 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c02975.
- [128] C. Kim Soon, N. Anusha Devi, K. Beng Gan, and S.-M. Then, “Design and development of polymerase chain reaction thermal cyclers using proportional-integral temperature controller,” *Malaysian J. Fundam. Appl. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 213–218, 2018, doi: 10.11113/mjfas.v14n2.765.
- [129] K. S. Chong, K. B. Gan, and S. Then, “Development of Thermal Cycler Using Proportional-Integral Controller for Polymerase Chain Reaction,” *Int. Med. Device Technol. Conf.*, pp. 199–202, 2017.
- [130] V. K. de Oliveira *et al.*, “A low-cost PCR instrument for molecular disease diagnostics based on customized printed circuit board heaters,” *Biomed. Microdevices*, vol. 23, no. 2, pp. 1–8, 2021, doi: 10.1007/s10544-021-00563-2.
- [131] H. Liu *et al.*, “Temperature control algorithm for polymerase chain reaction (PCR) instrumentation based upon improved hybrid fuzzy proportional integral derivative (PID) control,” *Instrum. Sci. Technol.*, vol. 51, no. 2, pp. 109–131, 2023, doi: 10.1080/10739149.2022.2105866.
- [132] S. M. Pourkiaei *et al.*, “Thermoelectric cooler and thermoelectric generator devices: A review of present and potential applications, modeling and materials,” *Energy*, vol. 186, p. 115849, 2019, doi: 10.1016/j.energy.2019.07.179.
- [133] D. Zhao and G. Tan, “A review of thermoelectric cooling: Materials, modeling and applications,” *Appl. Therm. Eng.*, vol. 66, no. 1–2, pp. 15–24, 2014, doi: 10.1016/j.applthermaleng.2014.01.074.
- [134] S. B. Riffat and X. Ma, “Thermoelectrics: A review of present and potential applications,” *Appl. Therm. Eng.*, vol. 23, no. 8, pp. 913–935, 2003, doi: 10.1016/S1359-4311(03)00012-7.
- [135] J. L. Pérez-Aparicio, R. Palma, and R. L. Taylor, “Finite element analysis and material sensitivity of Peltier thermoelectric cells coolers,” *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 55,

- no. 4, pp. 1363–1374, 2012, doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2011.08.031.
- [136] A. Maciel, “Development and Control of a condensation system using Peltier Cells,” Tecnico Lisboa, 2014.
- [137] A. Kherkhar, Y. Chiba, A. Tlemçani, and H. Mamur, “Thermal investigation of a thermoelectric cooler based on Arduino and PID control approach,” *Case Stud. Therm. Eng.*, vol. 36, no. November 2021, p. 102249, 2022, doi: 10.1016/j.csite.2022.102249.
- [138] R. G. Arns, “The other transistor: Early history of the metal-oxide-semiconductor field-effect transistor,” *Eng. Sci. Educ. J.*, vol. 7, no. 5, pp. 233–240, 1998, doi: 10.1049/esej:19980509.
- [139] T. S. A. S. P. Vimala, M. Karthigai Pandian, *MOSFET Design and Its Optimization for Low-Power Applications*, 1st Editio. 2021.
- [140] İ. C. TIĞLI, “H-Köprü Tipi Motor Sürücülerinin Özellikleri ve H-Köprü Uygulama Devrelerinin Değerlendirilmesi,” 2019, vol. 3, no. 1, p. 77.
- [141] V. Sieben, “A High Power H-Bridge,” no. September, p. 24, 2003.
- [142] N. Sadikin, M. Sari, and B. Sanjaya, “Smarthome Using Android Smartphone, Arduino uno Microcontroller and Relay Module,” in *Journal of Physics: Conference Series*, 2019, vol. 1361, no. 1, doi: 10.1088/1742-6596/1361/1/012035.
- [143] V. Gurevich, *Electric Relays Principles and Applications*. Taylor & Francis, 2005.
- [144] D. İbrahim, *Microcontroller-based Temperature Monitoring and Control*, 1st editio. Elsevier Science, 2002.
- [145] N. DiFonzo and P. Bordia, “Thermistors and Thermocouples: Matching the Tool to the Task in Thermal Validation,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 130, no. 2, p. 556, 1998, [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.050>.
- [146] A. Elyounsi and A. N. Kalashnikov, “Evaluating Suitability of a DS18B20 Temperature Sensor for Use in an Accurate Air Temperature Distribution Measurement Network †,” *Eng. Proc.*, vol. 10, no. 1, 2021, doi: 10.3390/ecsa-8-11277.
- [147] D. Yulizar, S. Soekirno, N. Ananda, M. A. Prabowo, I. F. P. Perdana, and D. Aofany,

Performance Analysis Comparison of DHT11, DHT22 and DS18B20 as Temperature Measurement, vol. 1. Atlantis Press International BV, 2023.

- [148] S. C. Sheu, P. Kijamnajsuk, C. K. Chan, and J. J. Chen, “A 3D-printed oscillatory polymerase chain reaction system using a single heater,” *Appl. Therm. Eng.*, vol. 239, no. December 2023, p. 122201, 2024, doi: 10.1016/j.applthermaleng.2023.122201.
- [149] Y. Q. An *et al.*, “Ultrafast Microfluidic PCR Thermocycler for Nucleic Acid Amplification,” *Micromachines*, vol. 14, no. 3, 2023, doi: 10.3390/mi14030658.
- [150] V. K. De Oliveira, H. C. Ancelmo, and D. M. Bordin, “Low-Cost Arduino Reverse Transcriptase Loop-Mediated Acid Detection,” 2024.
- [151] M. H. Ji J, Hu C, Pang X, Liang J, Huang Q, Hu S, Mei Q, “An Open Thermal Control System for Stable Polymerase Chain Reaction on Digital Microfluidic Chip,” *ACS Omega*, vol. 09, no. 9, pp. 10937–10944, 2024.
- [152] M. P. Dinca, M. Gheorghe, M. Aherne, and P. Galvin, “Fast and accurate temperature control of a PCR microsystem with a disposable reactor,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 19, no. 6, 2009, doi: 10.1088/0960-1317/19/6/065009.
- [153] S. Gross, D. Camozzo, V. Di Noto, L. Armelao, and E. Tondello, “PMMA: A key macromolecular component for dielectric low- κ hybrid inorganic-organic polymer films,” *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 3, pp. 673–696, 2007, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2006.12.012.
- [154] Y. De Shen, G. Y. Shen, Z. Z. Li, M. Ren, and S. Y. Seol, “A study on steam generator for domestic steam cleaner with cartridge heater,” in *2nd International Workshop on Education Technology and Computer Science, ETCS 2010*, 2010, vol. 2, pp. 69–73, doi: 10.1109/ETCS.2010.225.
- [155] Y. R. Pathak, B. D. Baloni, and S. A. Channiwala, “Numerical Simulation of Centrifugal Blower Using Cfx,” pp. 242–247, 2012.
- [156] STMicroelectronics, “DUAL FULL-BRIDGE DRIVER,” Italy, 2000.
- [157] J. LaDou, “Printed circuit board industry,” *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 209, no. 3, pp. 211–219, 2006, doi: 10.1016/j.ijheh.2006.02.001.
- [158] J. Lim, S. Jeong, M. Kim, and J. H. Lee, “Battery-operated portable PCR system with

- enhanced stability of Pt RTD,” *PLoS One*, vol. 14, no. 6, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0218571.
- [159] I. Seder, D.-M. Kim, S.-H. Hwang, H. Sung, D.-E. Kim, and S.-J. Kim, “Fluidic handling system for PCR-based sample-to-answer detection of viral nucleic acids,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 349, no. September, p. 130788, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130788.
- [160] G. D. Kaprou, V. Papadopoulos, C. M. Loukas, G. Kokkoris, and A. Tserepi, “Towards PCB-based miniaturized thermocyclers for DNA amplification,” *Micromachines*, vol. 11, no. 3, 2020, doi: 10.3390/mi11030258.
- [161] A. Salman, H. Carney, S. Bateson, and Z. Ali, “Shunting microfluidic PCR device for rapid bacterial detection,” *Talanta*, vol. 207, no. May 2019, p. 120303, 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2019.120303.
- [162] P. E. Guevara-Pantoja *et al.*, “Hybrid Opto-Thermocycler for RT-qPCR Detects SARS-CoV-2,” *Adv. Mater. Technol.*, vol. 8, no. 3, pp. 1–10, 2023, doi: 10.1002/admt.202200902.
- [163] W. Liu, M. Zhang, X. Liu, A. Sharma, and X. Ding, “A Point-of-Need infrared mediated PCR platform with compatible lateral flow strip for HPV detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 96, pp. 213–219, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2017.04.047.
- [164] W. Ling, W. Zhou, J. Cui, Z. Shen, Q. Wei, and X. Chu, “Experimental study on the heating/cooling and temperature uniformity performance of the microchannel temperature control device for nucleic acid PCR amplification reaction of COVID-19,” *Appl. Therm. Eng.*, vol. 226, no. October 2022, p. 120342, 2023, doi: 10.1016/j.applthermaleng.2023.120342.
- [165] P. Mandal, V. Dhakane, A. Kulkarni, and S. Tallur, “WELPCR: Low-cost polymerase chain reaction (PCR) thermal cycler for nucleic acid amplification and sensing,” *APSCON 2024 - 2024 IEEE Appl. Sens. Conf. Proc.*, pp. 10–13, 2024, doi: 10.1109/APSCON60364.2024.10465933.