

**ELİPSOMETRE ESASLI
MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERİ KULLANAN
PROTEİN ARRAY PLATFORMLARININ
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF
ELLIPSOMETER BASED
PROTEIN ARRAY PLATFORMS
USING MICROFLUIDIC SYSTEMS**

BURCU OTMAN

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
(Prof. Dr. Tülin KUTSAL)

Üye (Danışman) :.....
(Prof. Dr. Erhan BİŞKİN)

Üye :.....
(Prof. Dr. S. Ali TUNCEL)

Üye :.....
(Prof. Dr. A. Kevser ÖZDEN PİŞKİN)

Üye :.....
(Yrd. Doç. Dr. Cengiz KOÇUM)

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ELİPSOMETRE ESASLI MİKROAKIŞKAN SİSTEMLERİ KULLANAN PROTEİN ARRAY PLATFORMLARININ HAZIRLANMASI

BURCU OTMAN

ÖZ

Sunulan çalışmada elipsometre esaslı, mikroakışkan sistemleri kullanan array platformlarının geliştirilmesi daha sonra bu platformlara iki farklı protein molekülünün yerleştirilip seçici antikoları ile etkileşiminin TIRE (Total Internal Reflection Ellipsometry - Toplam İçten Tam Yansımali Elipsometri) yöntemi ile incelenmesi amaçlanmaktadır.

Tez çalışması üç ana grupta toplanmıştır. İlk bölümde, öncelikle polimerizasyon süresinin, kullanılması amaçlanan polimer türlerinin, çapraz bağlayıcı oranlarının optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen çapraz bağlı polimerlerin temas açıları ölçülmüş, şişme dereceleri belirlenmiş, yüzey analizleri FT-IR-ATR tekniği ile gerçekleştirilmiş, en uygun polimer türü olarak 1:1 oranında çapraz bağlayıcı içeren Glisidil Metakrilat polimeri seçilmiştir. Daha sonra fotolitografik yöntemler kullanılarak silikon elastomer (Polidimetil Siloksan) ile mikrokanal fabrikasyonu gerçekleştirilmiş, bir diğer yöntem olan temaslı sıvı fotolitografik polimerizasyon (Contact Liquid Photolithographic Polymerisation, CLiPP) yöntemi ile de GMA polimeri kullanılarak farklı boyutlarda mikrokanallar hazırlanmıştır. İki yöntemle de alınan sonuçlar değerlendirildiğinde optimum sonuçları veren fabrikasyon yöntemi, "Fotolitografik Yöntemler Kullanılarak Silikon Elastomer (Polidimetil Siloksan, PDMS) ile Mikrokanal Fabrikasyonu" olarak belirlenmiştir. Optimum kanal boyutu ise 200 µm olarak seçilmiştir. PDMS ile hazırlanan polimerik mikrokanalların üzerleri GMA filmi ile kaplı cam slaytlar yardımı ile kapatılmıştır.

Çalışmanın ikinci bölümünde hazırlanan mikro akış kanallarının duvarlarının GMA polimerinden oluşan yüzeylerine, array platformunu oluşturmak üzere, prob moleküllerin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olan array platformunun kanallarına, 5–500 nM derişim aralığında Albumin (Human Serum Albumin, HSA) ve 10–500 nM derişim aralığında Protein A prob molekülleri

yerleştirilmiştir. Bu modifikasyonlar TIRE yöntemi ile izlenmiş, epoksi – protein etkileşimi gözlemlenmiştir.

nc bölüm kapsamında, bu problemlerin spesifik antikorları olan anti – Albumin antikoru 5–500 nM derişim aralığında ve IgG antikoru 10–500 nM derişim aralığında kanallara gönderilerek etkileşimler TIRE yöntemi ile eş zamanlı olarak incelenmiş, hazırlanan platformların performansları ve tayin sınırları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Mikroakışkan Sistemler, Biyosensör, Fotopolimerizasyon, Fotolitografi, Protein Array Platformları, Elipsometri, İçten tam yansımalı elipsometri (TIRE)

Danişman : Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mhendisliği Bölümü

PREPARATION OF ELLIPSOMETER BASED PROTEIN ARRAY PLATFORMS USING MICROFLUIDIC SYSTEMS

BURCU OTMAN

ABSTRACT

The purpose of the thesis is to construct ellipsometer based array platforms that are involving microfluidic systems and moreover to immobilize two model probes into the microchannels of the platforms and to observe the interactions of this probe molecules with their specific antibodies, using Total Internal Reflection Ellipsometry (TIRE) technique.

It can be said that the whole work is consisting of three main parts. In the first part, firstly, optimization of the polymerisation time length, polymer type, crosslinker ratios were done. Contact angles of the synthesized crosslinked polymers were measured, swelling ratios were determined, surface analyses were performed using FT-IR-ATR technique and consequently Glycidyl Methacrylate polymer containing a crosslinker ratio of 1:1 was selected as the appropriate polymer type. Later, microchannels were fabricated with silicone elastomer (Polydimethyl Siloxane, PDMS) using photolithographic techniques along with Contact Liquid Photolithographic Polymerisation (CLiPP) method using GMA polymer. Both methods were compared and the optimum fabrication method was selected as fabrication with silicone elastomer (Polydimethyl Siloxane, PDMS) using photolithographic techniques and the optimum channel size was determined to be 200 μm . The PDMS microchannels were covered using a GMA film coated microscope slide.

In the second part of the work, in order to construct array platforms, immobilisation of the probe molecules onto the GMA wall of the microchannels was performed. Probe molecule solutions of Albumin (Human Serum Albumin, HSA) having a concentration range of 5–500 nM and Protein A with a 10–500 nM concentration range were immobilized into the pre-fabricated channels. The modifications were observed with TIRE and the epoxy – protein interactions were monitored.

At last, in the third part, solutions of specific antibodies of these probes (anti – Albumin and IgG antibodies) were injected into the channels having concentration ranges of 5–500 nM and 10–500 nM respectively and the real time interactions were observed with TIRE technique. The performances and detection limits of the fabricated platforms were determined.

Keywords : Microfluidic Systems, Biosensor, Photopolymerisation, Photolithography, Protein Array Platforms, Ellipsometry, Total Internal Reflection Ellipsometry (TIRE)

Advisor : Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering

TEŞEKKÜR

Birlikte çalışabilmek adına her şeyi göze aldığım, çok değerli hocam, sevgili tez danışmanım Prof. Dr. Erhan Bişkin'e bana olan sonsuz güveninden ötürü teşekkür ederim...

Ayrıca;

Tüm çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgilerini benden esirgemeyen tüm saygıdeğer hocalarıma,

Bilim namına bildiğim çoğu şeyi bana öğreten, aynı laboratuvarı paylaştığım, kimi zaman gece yarısına kadar birlikte çalıştığım sevgili Bora'ya ve değerli Gökhan Hocama,

Zorlandığım her anda duraksamadan yardımına koşan Lokman Abime,

Her ne olursa olsun, bilgisiyle ışık, sözleriyle destek olan Ouz'a,,

Benimle iki çift kelimeden eden sevgili Lab. Arkadaşlarıma ve bunun yanı sıra yardımlarından ötürü Gülsu'ya,

Beni desteklediklerinden, bırakmayı düşündüğüm her anda beni vazgeçirdiklerinden ötürü Terralab'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Var oluşundan ötürü kardeşim Nihan'a,

Tüm açık yürekliliğinden, dobralığından dolayı kimsenin olamayacağı kadar dostum olan Ersin'e,

Kelimelere sığdıramayacağım her şey için Sevi'ye,

Hayat boyu uzakta ya da yakında hep yanımda olan, bana inançlarını asla kaybetmeyen, varlıklarını yokluklarında dahi her zaman omzumda hissettiğim ve her türlü zorluğa karşı beni en derinden destekleyen canım anneme, saygıdeğer babama, sevgili dayıma,

Ve sevgili hayat arkadaşşıma, bir ömrü beraber geçirmeye söz verdiği için...

Tüm bunların ötesinde, bu tezin tamamlanmasına kadar geçirdiğim zorlu süreçte, önüme bin bir türlü engel koyan tüm kadim dostlarıma, beni daha güçlü kıldıkları için...

...teşekkürü borç bilirim...

*Burcu OTMAN
Aralık 2009*

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tanı ve Moleküler Tanı Sistemi	4
2.2. Array Teknolojileri	5
2.3. Biyosensörler	5
2.3.1. Optik Biyosensörler	8
2.3.2. Yüzey Plazmon Rezonans	8
2.2.3. Elipsometri	10
2.4. Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar	14
2.5. Desenleme Teknikleri	16
2.5.1. Soft Litografi	16
2.5.2. Fotolitografi	17
2.5.3. Robotik Baskılama	21
2.5.4. AFM Litografisi	22
2.5.5. LIGA	23
2.6. Mikroakışkan Sistemler	22
2.6.1. Mikroakışkan Sistemler Hakkında Genel Bilgiler	23
2.6.2. Mikroakışkan Sistemlerin Kullanım Alanları	26
2.6.3. Mikroakışkan Sistemlerin Geleneksel Mikrofabsikasyonu	27
2.6.4. Mikroakışkan Sistemlerin Başlıca Avantajları	36
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	38
3.2. Mikroakışkan Kanalların Oluşturulması	40
3.2.1. Cam Yüzeylerinin Temizlenmesi ve Modifikasyonu	41
3.2.2. Polimerlerin Sentez ve Karakterizasyonu	42
3.2.3. Fotomaske Hazırlanması	45
3.2.4. Fotolitografik Yöntemler Kullanılarak Silikon Elastomer ile Mikrokanal Fabrikasyonu	46
3.2.5. CLiPP Metodu ile Mikrokanal Fabrikasyonu	47
3.3. Polimerik Sensör Yüzeylerinin Hazırlanması	48
3.3.1. Mikroakış Kanallarına Albumin Prob İmmobilizasyonu	48
3.3.2. Mikroakış Kanallarına Protein A Prob İmmobilizasyonu	49

3.4. . Array Platformlarının Performansının Belirlenmesi	49
3.4.1. Mikroakış Kanallı Albumin Sensörünün Performansının Belirlenmesi	49
3.4.2. Mikroakış Kanallı Protein A Sensörünün Performansının Belirlenmesi	49
3.4.3. Mikroakış Kanallı Albumin ve Protein A Array Platformlarının Performansının Belirlenmesi	50
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	70
4.1. Mikroakışkan Kanalların Oluşturulması	52
4.1.1. Cam Yüzeylerinin Temizlenmesi ve Modifikasyonu	52
4.1.2. Polimer Sentez ve Karakterizasyonu	54
4.1.3. Fotolitografik Yöntemler Kullanılarak Silikon Elastomer ile Mikrokanal Fabrikasyonu	79
4.1.4. CLiPP Metodu ile Mikrokanal Fabrikasyonu	87
4.2. Elipsometre Bazlı Mikroakışkan Sistemleri Kullanan Polimerik Sensör Yüzeylerinin Hazırlanması	92
4.2.1. Mikroakış Kanallarına Albumin Prob İmmobilizasyonu	92
4.2.2. Mikroakış Kanallarına Protein A Prob İmmobilizasyonu	93
4.3. Mikroakışkan Kanallı Array Platformlarının Performanslarının Belirlenmesi	94
4.3.1. Mikroakış Kanallı Albumin Sensörünün Performansının Belirlenmesi	94
4.3.2. Mikroakış Kanallı Protein A Sensörünün Performansının Belirlenmesi	96
4.3.3. Mikroakış Kanallı Albumin ve Protein A Array Platformlarının Performansının Belirlenmesi	98
5. SONUÇLAR	101
KAYNAKLAR	106
EKLER	117
ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Temel Biyosensör Elemanları	6
Şekil 2.2. Kretschmann düzeneği	9
Şekil 2.3. Temel Elipsometre Bileşenleri	11
Şekil 2.4. r_p , r_s , Ψ değerlerinin şematik gösterimi	12
Şekil 2.5. Gelen ışığın arayüzeyden yansımaları ve kırılması	12
Şekil 2.6. Kendiliğinden Düzenlenme Örnekleri	15
Şekil 2.7. Fotolitografi tekniği ile desenleme yönteminin şematik gösterimi	18
Şekil 2.8. Bazı mikroakışkan sistemlerin SEM görüntüleri	26
Şekil 2.9. Günümüzde kullanılan mikroteknolojiler ve boyut aralıkları	27
Şekil 2.10. Yarı ışık etkisinin şematik gösterimi	32
Şekil 2.11. Replikasyon yöntemleri	33
Şekil 2.12. CLiPP yönteminin basamakları	36
Şekil 3.1. Elipsometre cihazı ve TIRE için optik düzen	39
Şekil 3.2. Kullanılan fotolitografi sistemi	40
Şekil 3.3. HEMA, GMA ve EGDMA yapısal formülleri	42
Şekil 3.4. Hazırlanan Fotomaske Tasarımları	46
Şekil 4.1. Boş cam slayt yüzeylerinin 3 boyutlu elipsometrik görüntüleri	53
Şekil 4.2. Farklı sürelerde UV ışığa maruz bırakılmış çapraz bağlı polimerler	56
Şekil 4.3. A, B, C ve D polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi	59
Şekil 4.4. I, J, K ve L polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi	60
Şekil 4.5. M, N, O ve P polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi	61
Şekil 4.6. E, F, G ve H polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi	62
Şekil 4.7. Polimer filmlerin şişme derecelerinin karşılaştırılması	63
Şekil 4.8. Polimer film yüzeyinin bozulmasının elipsometrik 2 boyutlu ve 3 boyutlu görünüşü	64
Şekil 4.9. Yalnızca HEMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerik filmlerin temas açısı değerlerinin, çapraz bağlayıcı miktarına göre değişimi.	65
Şekil 4.10. %50 oranında GMA içeren çapraz bağlı polimerik filmlerin temas açısı değerlerinin, çapraz bağlayıcı miktarına göre değişimi	67

Şekil 4.11. Hacmen %25 oranında HEMA içeren GMA çapraz bağlı polimerik filmlerin temas açısı değerlerinin, çapraz bağlayıcı miktarına göre değişimi	68
Şekil 4.12. Sadece GMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerlerin çapraz bağlayıcı oranına bağlı temas açısı değişimi	69
Şekil 4.13. GMA, EGDMA monomerlerinin yapıları ve çapraz bağlı GMA-EGDMA polimerinin yapısı	71
Şekil 4.14. Çeşitli yüzeyler üzerinde su damlası görüntüleri	72
Şekil 4.15. Monomer / çapraz bağlayıcı oranı hacmen 1:0,5 olarak sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer film için ATR ölçüm sonucu	74
Şekil 4.16. Monomer / çapraz bağlayıcı oranı hacmen 1:1,0 olarak sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer film için ATR ölçüm sonucu	75
Şekil 4.17. Monomer / çapraz bağlayıcı oranı hacmen 1:1,5 olarak sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer film için ATR ölçüm sonucu	76
Şekil 4.18. Hacmen 1:0,5; 1:1,0; 1:1,5 monomer / çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer filmlerinin üst üste çakıştırılan ATR ölçüm sonuçları	78
Şekil 4.19. Silikon plaka üzerine kaplanan ışığa duyarlı malzemenin kaplama kalınlığı	80
Şekil 4.20. Kanal tasarımında kullanılacak olan kalıbın elipsometrik 3 boyutlu görüntüsü.	81
Şekil 4.21. 400 µm genişliğe sahip polimerik mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü	82
Şekil 4.22. 200 µm genişliğindeki polimerik mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü	83
Şekil 4.23. 100 µm genişliğe sahip kanallara ait elipsometrik 3 boyutlu görüntü	84
Şekil 4.24. Amin - epoksi etkileşimi sonucu iki yüzeyin birbirlerine kimyasal olarak bağlanmasının şematik gösterimi	86

Şekil 4.25. 400 µm genişliğinde hazırlanan mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü	88
Şekil 4.26. 200 µm genişlik ve 200 µm kanal aralığına sahip mikrokanalların elipsometrik görüntüsü	89
Şekil 4.27. 200 µm genişlik ve 200 µm kanal aralığına sahip mikrokanalların mikroskop görüntüsü	90
Şekil 4.28. 100 µm genişliğe sahip mikrokanalların elipsometrik görüntüsü	91
Şekil 4.29. Farklı Albumin derişimlerinde elde edilen kinetik bağlanma eğrileri	92
Şekil 4.30. Farklı Protein A derişimlerinde elde edilen kinetik bağlanma eğrileri	93
Şekil 4.31. Albumin – anti-Albumin ve Albumin – BSA etkileşimlerinin kinetik eğrileri	95s
Şekil 4.32. anti – Albumin sensörü için derişim değerlerine karşılık Delta değişimleri	96
Şekil 4.33. Protein A - IgG ve Protein A – BSA etkileşimlerinin kinetik eğrileri	97
Şekil 4.34. IgG sensörü için derişim değerlerine karşılık Delta değişimleri	98
Şekil 4.35. Albumin – anti-Albumin etkileşiminin kinetik eğrisi	99
Şekil 4.36. Protein A – IgG etkileşiminin kinetik eğrisi	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscope)
APTS	3-aminopropiltrietoksisilan
ATR	Attenuated Total Reflection
CLIPP	Temaslı Sıvı Fotolitografik Fotopolimerizasyon (Contact Liquid Photolithographic Photopolymerisation)
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme (Chemical Vapor Deposition)
DMPAP	2,2-dimetoksi-2-fenil-asetofenon
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
GMA	Glisidil Metakrilat
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
IgG	İmmunoglobulin G
LB	Langmuir – Blodgett
MEMS	Mikro Elektro Mekanik Sistemler
μTAS	Mikro Toplam Analiz Sistemi
PDMS	Polidimetil Siloksan
PMMA	Polimetil Metakrilat
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme (Physical Vapor Deposition)
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabaka (Self Assembling Monolayer)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance)
TIRE	Toplam İçten Tam Yansımali Elipsometri (Total Internal Reflection Ellipsometry)

1. GİRİŞ

Tarih boyunca pek çok salgın hastalık yaşamı tehdit etmiş ve bunun sonucu olarak hastalık tanısı yaşam bilimleri alanında faaliyet gösteren araştırmacıların en çok ilgilendiği konulardan biri haline gelmiştir. Eğer tanı doğru ve zamanında yapılamaz ise tedavi sonuçsuz kalır. Ne yazık ki canlı organizmalarda gerekli tüm bilgileri taşıyan DNA, RNA ve proteinler gibi biyolojik moleküller oldukça karmaşık moleküller olmakla beraber canlı ortamlarda çok düşük derişimlerde bulduklarından araştırılmaları ve tanınmaları oldukça zahmetlidir. Çoğu hastalığın tedavisinde ise erken tanı oldukça kritik bir rol oynamaktadır. Bu amaçla günümüze kadar geliştirilmiş, hücre kültürleri, hücre sayım sistemleri, immünolojik testler, çeşitli görüntüleme teknikleri, DNA dizileri (arrayleri), spektrometreler gibi tanı sistemleri genellikle uzun süreli ve pahalı teknikler olmakla beraber, kimi zaman anlamlı sonuç alınabilmesi için hastalığın belli bir aşamaya yani biyolojik moleküllerin belli bir derişime ulaşmış olması gerekmektedir.

Yenilenen teknoloji ile beraber hastalık tanı sistemlerinde de çeşitli ilerlemeler gerçekleşmiştir. Örneğin çeşitli biyosensörler ve tanı kitleri geliştirilmiştir. Tanı kitleri genel anlamda hastalığın varlığı veya yokluğu ile ilgili bilgi verirken biyosensörlerin yardımı ile ne derecede olduğu diğer bir deyişle miktarı da algılanabilmektedir. Bu sistemlerde temel olarak tanıyıcı bir eleman, bir sinyal çevirici ve sinyal okuyucu bulunmaktadır. Çalışma prensibi özetle şu şekildedir; tanıyıcı eleman ile biyolojik numune arasında meydana gelen kimyasal etkileşim sonucu ısı, renk, iletkenlik vb. gibi sinyaller oluşur, çevirici yardımı ile bu sinyaller, etkileşimler ile orantılı bir elektrik sinyaline çevrilir ve okuyucu tarafından algılanarak sonuç belirlenir.

Biyosensörlerin geliştirilmesi ile, sağlık bilimleri, çevre bilimleri, gıda, hayvancılık gibi insan yaşamını doğrudan etkileyen pek çok alanda olumsuzlukların moleküler düzeyde gözlemlenmesi ve giderilmesi olanaklı kılınmıştır. Tüm bu alanlarda biyomoleküllerin tanısında bu molekülleri spesifik olarak tanıyan çeşitli biyolojik moleküller, biyosensörlerin tanıyıcı ajanları olarak kullanılırlar. Antikorlar, oligonükeotidler, oligopeptidler tanıyıcı ajan olarak kullanılan biyomoleküllerden

bazılarıdır. Biyosensör sistemlerinde tanıyıcı moleküllere “prob”, bu moleküller yardımı ile tanınan moleküllere ise “hedef molekül” adı verilir.

Biyosensör çeşitlerinden olan optik esaslı biyosensörlerde herhangi bir işaretleme yöntemine ihtiyaç duyulmaması bu teknikleri öncelikli kılmaktadır. Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance, SPR) ve Elipsometri gibi optik özellikleri kullanan sensörler pek çok alanda kullanılmaktadır. Elipsometrik sensörler ile sensör yüzeylerinde birçok etkileşimin (antikor – antijen etkileşimleri, enzimatik reaksiyonlar, vs.) gerçek zamanlı izlenmesi ve hem nitel hem de nicel tanı yapılması mümkün olmaktadır.

Hedef moleküllerin sayıca oldukça fazla olması günümüz araştırma konularını biyosensörlerden, aynı anda çok sayıda hedef molekülün tanınmasına ve miktarlarının belirlenmesine olanak sağlayan sistemlere doğru yönlendirmiştir. Böylelikle son yıllarda, aynı anda çok sayıda hedef molekülün tanınmasına imkan sağlayan “Array Teknolojileri” gündeme gelmiştir ve hızla gelişmeye devam etmektedir. Özellikle “İnsan Genom Projesi” array teknolojilerindeki en önemli adımdır. Affymetrix firması işbirliği ile ilk DNA mikroarray sistemi geliştirilmiş ve proje beklenenden çok daha kısa bir sürede tamamlanmıştır. Bu ilk önemli adımın ardından çeşitli DNA array platformları ve protein array platformları geliştirilmeye devam etmiştir. Kısaca, array teknolojilerinde, platform üzerinde çok sayıda tanıyıcı molekül bulunmaktadır ve aynı anda birden fazla hedef molekülün tanınması mümkündür. Array teknolojilerindeki en önemli basamak prob moleküllerin platform üzerine yerleştirilmesi yani immobilize edilmesidir.

Array teknolojilerinin gelişmesini takiben minyatür laboratuvar olarak da bilinen “çip içi laboratuvar” (lab on a chip) terimi gündeme gelmiş, araştırmacıların ilgisini hızla çekmiştir. Çip içi laboratuvarlar birkaç santimetrekare boyutundaki platformlar üzerinde bir ya da birden fazla laboratuvar görevinin gerçekleştirilmesi için tasarlanan çiplerdir. Bu tip çipler, son yıllarda oldukça ilgi çeken “Mikro Elektro-Mekanik Sistemler” (MEMS) ya da bir diğer deyişle “Mikro Toplam Analiz Sistemleri” (μ TAS) gibi konuların alt başlıkları olarak sınıflandırılabilirler.

MEMS ve μ TAS moleküler düzeyde araştırmaya olanak sağlayan sistemlerdir ve bu yönleri ile ilaç taşınımı, genomik araştırmalar, protein analizi, tanı gibi pek çok alanda

kullanılmaktadır. Bu sistemlerin araştırılması ile beraber minyatürizasyon teknikleri gündeme gelmiş, bu alanlarda pek çok araştırma yapılmıştır. Fotolitografi, AFM litografisi, dip-pen litografi, x-ışını litografisi, soft litografi gibi çeşitli litografi teknikleri, kalıplama, döküm, aşındırma, biriktirme gibi çok sayıda teknik minyatürizasyon işlemlerinde kullanılmaktadır.

Mikroakışkan sistemler, MEMS, μ TAS ve çip içi laboratuvar sistemlerinde sıklıkla kullanılan mikron boyutlu kanallardaki kapiler etki ile akışı inceler ve kullanır. Örneğin yakın zamanda IBM firması tarafından tanıtılan kılcal damar hareketini yani kapiler etkiyi kullanarak, tek aşamalı bir araç olarak kullanılabilir ve ileride birçok hastalığın ve virüsün tanısında kullanılabilir yeni geliştirilen bir çip içi laboratuvar sisteminde, çok küçük bir kan damlası ile, kısa sürede teşhis sağlanabilmektedir. (Juncker ve Delamarche, 2002). Bu yüzyıl içinde klasik laboratuvar ortamlarının yerlerini mikroakışkan sistemlerle bütünlüşmüş, üretimi kolay, ucuz, tek kullanımlık mikro laboratuvarlara bırakacağı düşünülmektedir. Mikroakışkan sistemlerinde akış kapiler etki ile sağlanabilmektedir ve Reynold sayısı oldukça düşüktür, böylelikle kanal içinde akış daima laminer olmaktadır. Mikroakışkan sistemlerinin, düşük örnek hacmi gerektirmeleri, kısa sürede cevap alınması, paralel ölçüm yapılabilmesi, kontrol edilebilirlik gibi önemli avantajları vardır. Bu tip sistemlerde kullanılan malzemelerin mutlaka biyolojik olarak uyumlu olmaları gerekmektedir. Bu amaçla son yıllarda mikroakışkan sistemlerin üretiminde kullanılabilir çeşitli malzemeler geliştirilmiştir.

Tez kapsamında elipsometre esaslı, mikroakışkan sistemleri kullanan array platformları geliştirilmiştir. Hazırlanan mikroakışkan kanallı platformlara model protein prob molekülleri (Protein A ve anti-Albumin antikoru) yerleştirilmiş, bu platformların HlgG ve Albumin tanısında örnek array sistemleri olarak kullanılabilirlikleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanı ve Moleküler Tanı Sistemi

Biyotıp, Moleküler Biyoloji, Genetik, Biyoteknoloji vb. gibi bilim ve teknolojiler, temel bilimlerin ve mühendislik bilimlerinin yaşam bilimlerindeki uygulamaları ile ilgilenmektedir. Günümüzde birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede olduğu gibi ülkemizde de öncelikli konular arasında yer alan bu bilim ve teknoloji dallarında oldukça hızlı bir ilerleme söz konusudur. Özellikle son on yılda ivme kazanan nanoteknoloji (nanotıp, nanobiyoteknoloji vb.) alanındaki araştırmaların yardımları ile ise moleküler düzeye doğru bir yönelime geçilmiştir. (Iqbal, 2000)

Tıp, çevre, gıda, hayvancılık, tarım vb. gibi akla gelebilecek birçok alanda “tanı” oldukça kritik bir faaliyet olarak gündeme gelmektedir. Örneğin tıp alanında tanı yapılmadan önce tedavi uygulanamaz ancak hastalık tanısı yapıldıktan sonra uygulanabilir. Gıda ürünleri ve çevre kirliliğinin (örneğin mikrobiyal kirlilik) tanısı insanın ve çevrenin sağlığı açısından oldukça kritik bir öneme sahiptir.

Günümüz teknolojisinde tanı da artık moleküler düzeydedir ancak bu durum tanıyı çok daha zor ve oldukça pahalı hale getirmektedir. Genel olarak bir tanı sisteminde istenilen hedef molekülü seçici olarak tanıyan bir molekül kullanılır ve bu tanıyıcı moleküle tanı sistemlerinde “prob” adı verilir. Prob molekül bir taşıyıcı yüzey üzerine çeşitli yöntemler kullanılarak yerleştirilir. Özet olarak prob ile hedef molekül arasındaki etkileşme sonucu meydana gelen çeşitli değişimler bir çevirici yardımı ile sinyale dönüştürülür ve bu sinyalin ölçülmesi ile de tanı gerçekleştirilir. Günümüzde biyolojik esaslı tanı sistemlerinde “prob” olarak tek sarmal oligonükleotidler, oligopeptidler, proteinler (antikorlar, enzimler vb.) yaygın olarak kullanılan moleküller olarak söylenilebilir (Espina, 2004).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi gibi geleneksel tanı teknikleri, pahalı ekipmanlar gerektiren, yalnızca iyi donanımlı laboratuarlarda kullanılabilecek zahmetli tekniklerdir. Hücre kültürü ve mikroskopik izleme gibi temel mikrobiyolojik teknikler ise oldukça uzun süreli yöntemlerdir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Polymerase Chain Reaction”, PCR) gibi

diğer bazı yöntemler de çeşitli patojenlerin tayininde kullanılmaktadırlar. Fakat, PCR için önceden örnek hazırlanması gerekir, reaktifleri ucuz değildir ve çoklu analiz oldukça zordur. Kısaca geleneksel laboratuvar tanı yöntemleri, genellikle tek seferde sadece tek bir tanıyı gerçekleştirebilecek şekilde tasarlanmış, oldukça pahalı ekipmanlar kullanan, zahmetli ve uzun süreli testlerdir (Garipcan, 2008).

2.2. Array Teknolojileri

Array (çoklu analiz dizisi) teknolojileri birden fazla örneğin ya da molekülün aynı anda değerlendirilebildiği, genellikle çok kısa sürede cevap veren ve bunlardan çok daha önemlisi çoklu tanının mümkün olduğu yeni bir teknoloji dalıdır. Array teknolojilerinde; çok sayıda tanıyıcı molekülün, önceden hazırlanan array platformlarına belli yöntemler ile yerleştirilerek aynı anda çok sayıda hedef molekülün tanınması esas amaçtır. Array platformu üzerindeki tanıyıcı molekül - hedef molekül etkileşmesi, çoğunlukla hedef molekülün optikçe aktif olan bir floresan boya kullanılarak işaretlenmesi (“etiketlenmesi”) ve meydana gelen etkileşimler sonucunda floresans (floresan ışık) şiddetindeki değişimin çeşitli optik cihazlar yardımı ile ölçümü sonucunda gerçekleştirilir (Estrela, 2008)

Etiket kullanımı pahalı bir yöntem olmakla birlikte uygulaması zor ve oldukça zaman alıcıdır. Ayrıca bu yöntem biyolojik hedef moleküle de zarar verebilmektedir. Son yıllarda işaretlenmeye gerek duyulmadan ölçüm yapılabilecek kütle değişim esaslı (QCM vb.) ve optik (SPR, elipsometre, vb.) cihazların array teknolojilerine uygulanması üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Boozer, 2006).

2.3. Biyosensörler

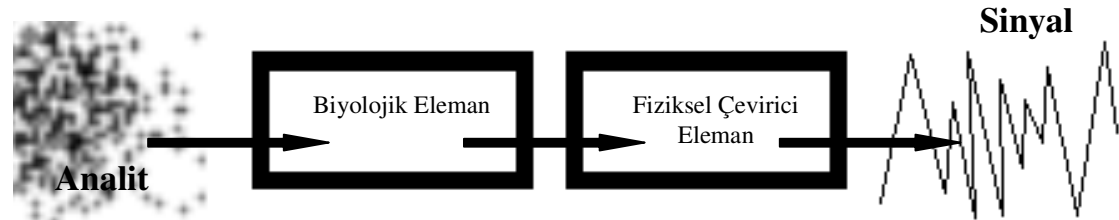
Biyosensörler bir diğer deyişle biyoalgılayıcılar, kısaca bünyelerinde biyolojik bir tanıyıcı eleman bulunduran ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analiz cihazları olarak tanımlanmaktadırlar. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir.

Bir biyosensörde ilk olarak bir takım temel özellikler (hassasiyet, kalibrasyon, tayin sınırı, seçicilik, özgüllük, tekrarlanabilirlik, tekrar kullanılabilirlik, kısa cevap süresi vb.) aranır. Hassasiyeti yüksek olan bir biyosensör çok küçük değişiklikleri algılayabilmelidir (Cahn, 1993). İdeal bir biyosensörde kalibrasyon, geleneksel çözeltiler veya bilinen analit derişimleri kullanılarak kolayca yapılabilirdir. Yapılan kalibrasyon sonucunda elde edilen veriler tayin limitini belirleyecek kadar olmalıdır (Diamond, 1998). Özgül bir biyosensör istenen tek bir analiti tanıyabilmelidir ve bu durum gerçekleşemediğinde ise seçiciliği yüksek olmalıdır. Bir biyosensörün tekrarlanabilirliği aynı örnekten aynı sonucun elde edilip edilemediğinin ölçüsüdür (Cahn, 1993). İyi bir biyosensörde cevap süresinin kısa olması istenir ki bu da seçilen biyolojik ajan veya çevirici cinsine göre farklılık gösterebilir.

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar,

- Biyolojik tanı elemanı (seçici tanıma mekanizmasına sahip “biyomolekül, biyoajan”)
- Algılayıcı (biyoajanın incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fiziko-kimyasal sinyalleri elektronik sinyaller dönüştürülebilen “çevirici”)
- Sinyal üretici (“elektronik” bölüm)

Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli olan ve tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyolojik elemandır. Temel olarak bir biyosensörü oluşturan elemanlar Şekil 2.1.’de gösterilmiştir (Vo-Dinh ve Cullum, 2000; Vo-Dinh, 2001; Thévenot, 2001).



Şekil 2.1. Temel Biyosensör Elemanları

Tayin edilecek moleküller (analitler); proteinler, nükleik asitler, bakteriler, organeller, toksinler, metal iyonları, hücreler veya kimyasallar olabilir. Biyolojik tanı elemanları ise enzimler, mikroorganizmalar, proteinler, dokular, kemoreseptörler, hücreler,

antikorlar veya nükleik asitler olabilmektedir. Genel olarak kullanılan fiziksel çeviriciler ise şu şekildedir: transistör, termistör, kristaller, resistörler, optik fiberler, kuvarz kristaller vb. Biyosensörler, biyolojik molekül seçiciliğine, çevirici türüne veya bunların birleşimine göre sınıflandırılabilir.

Biyolojik seçiciliğine göre olan biyosensör sınıfları aşağıdaki gibidir:

- (i) **Antikor/antijen bazlı:** Antijen ile o antijene spesifik olan antikor arasındaki etkileşimlere dayanan biyosensörlerdir.
- (ii) **Enzim bazlı:** Enzim aktivitesini kullanan bu tip sensörlerde reseptör olarak çeşitli enzimler kullanılmaktadır (Alcala, 2002).
- (iii) **Nükleik asit bazlı (DNA, cDNA, RNA):** Bu tip DNA sensörlerinde insan, virüs, bakteri gibi canlı DNA'ları tanınmaktadır (Kwakye ve Baeumner, 2003).
- (iv) **Hücresel etkileşim bazlı:** Genetik olarak modifiye edilmiş bakteriler kullanılarak bu tip biyosensörler elde edilir (Kitova, 2002; Köhler, 2000; Degrassi, 2002; Mitchell ve Gu, 2003).
- (v) **Biyomimetik yapı bazlı (Sentetik reseptörler) :** Aptamerlerin yani aminoasitler, ilaçlar, proteinler gibi çeşitli moleküllere afinite gösteren sentetik nükleik asit ligandlarının veya DNA analog-peptid nükleik asit gibi moleküllerin kullanıldığı tipte sensörlerdir.

Çevirici türüne göre olan biyosensör sınıfları ise şu şekildedir (Vo-Dinh ve Cullum, 2000; Köhler, 2001):

- (i) **Elektrokimyasal biyosensörler:** Elektriksel verileri ölçerek işleyen biyosensörlerdir. Amperometrik, potansiyometrik ve kondüktömetrik olarak üçe ayrılırlar (Garipcan, 2008)
- (ii) **Kütleye duyarlı biyosensörler:** Yüzey akustik dalga, mikrobalans, rezonans esaslı sensörler bu sınıftadır. Kütledeki herhangi bir değişimi ölçen bu tipteki biyosensörler, yüzey üzerine bağlanan çeşitli molekülleri çok küçük miktarlarda ölçebilen biyosensörlerdir. En yaygın örneği olarak piezoelektrik kristal kullanan sensörler verilebilir.
- (iii) **Termal biyosensörler:** Meydana gelen reaksiyon sıcaklığını ölçerler.
- (iv) **Optik biyosensörler :** Bu tip sensörlerde sinyal ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Optik esaslı sensörler temelde absorpsiyon, fluoresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler.

2.3.1. Optik Biyosensörler

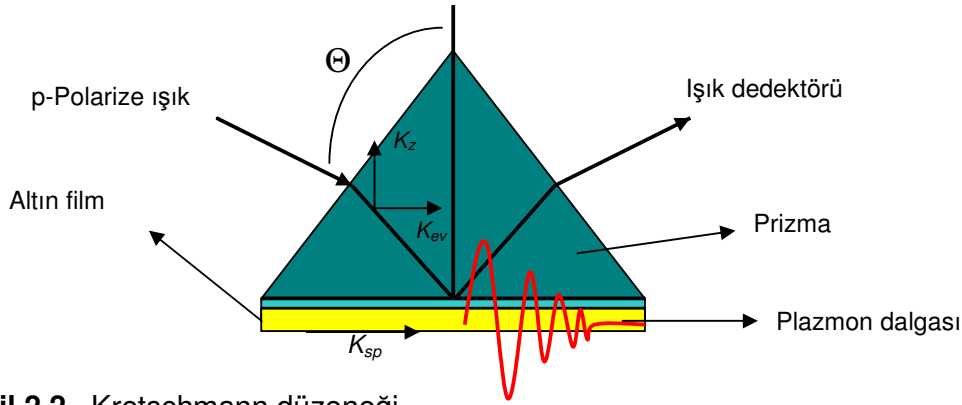
Biyolojik tanıda eskiden beri en sık kullanılan yöntemler optik yöntemlerdir (Gizeli ve Lowe, 1996; Robinson, 1991). Temel olarak optik bir biyosensör bir ışık kaynağı, ışığa özgün bir karakter kazandıran bir takım optik bileşenler, bir sensör kafası ve fotodetektörden oluşmaktadır. Optik sensörlerde analit direkt olarak optik özellikleri etkilemektedir. Ortamdaki optik değişimler çeşitli harici spektrofotometreler ile algılanmaktadır. Optik sensörler çeşitlerine göre lüminesans, adsorpsiyon, polarizasyon, floresans gibi pek çok tekniği kullanarak genlik, enerji, polarizasyon, bozunma zamanı ve/veya faz gibi çok çeşitli değişikliği kaydetmektedirler. Bu parametreler arasında bazı sistemlerde genlik, derişimle doğrudan ilişkili olduğu için en çok ölçülen parametre olarak gündeme gelmektedir. Polarizasyon değişimine bakılarak yüzeye yerleşen moleküllerin tayini gerçekleştirilebilir. Floresans özelliklerdeki değişimler ise çeşitli moleküler etkileşimlerin tayininde kullanılmaktadır.

2.3.2. Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance, SPR)

SPR, sensör yüzeyindeki bir takım moleküler etkileşimler sonucunda kırma indisindeki değişimleri izleyerek oldukça hassas olarak ölçüm yapan bir analitik cihazdır (Jordan, 1994; Liedberg, 1983; Liedberg, 1993; Melendez, 1997; Namira, 1995). SPR sisteminin en göze çarpan özelliği herhangi bir işaretleme metoduna gerek duymadığı için analiz sırasında çalışılan molekül veya biyomoleküle zarar vermemesidir. Bu nedenle SPR günümüzde sıklıkla kimyasal ve/veya biyolojik etkileşimlerin incelenmesinde kullanılan etiketsiz bir karakterizasyon ve tayin yöntemi olarak kullanılır.

Yüzey plazmonu, biri metal yani iletken ve diğeri de dielektrik yani yalıtkan olan iki ortamın ara yüzeyince düzlem boyunca ilerleyen yük yoğunluğudur. Yüzey plazmonu yaratmak için uygun metaller gümüş, altın, bakır, alüminyum, platin vb. olarak sıralanabilir. Gümüş, keskin bir SPR eğrisi vermekte ancak biyolojik uygulamalarda oksidasyona yatkın olduğu için tercih edilmemekte, altın ise biyolojik uygulamalarda daha kararlı olduğu için tercih edilmektedir. (De Bruijn, 1992). Yüzey plazmonunun uyarılması için Otto (1968) ve Kretschmann (1971) tarafından iki farklı düzenek geliştirilmiştir. Ancak, Kretschmann tarafından geliştirilen azaltılmış tam yansıma

(“attenuated total reflection”, ATR) düzeni, genellikle kullanılan düzenektir. Şekil 2.2.’de Kretschmann düzeneği şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kretschmann düzeneği

SPR’ de, p-polarize ışık sağlayan bir ışık kaynağı kullanılır ve optik olarak geçirgen iki ortamın ara yüzeyi ince olan bir metal film ile kaplıdır. Tam yansıma sonucu elde edilen sönümlü dalganın dalga vektörü Eşitlik 2.1.’ de verilmiştir (Matsubara, 1988):

$$K_{ev} = \frac{\omega_o}{c} \eta_g \sin \theta \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte, K_{ev} dalga vektörü, ω_o gelen ışığın frekansı, c boşluktaki ışık hızı, η_g yoğun ortamın kırma indisi, θ ışığın geliş açısıdır. Bu değerler Şekil 2.3.’de şematik olarak görülmektedir. Yüzey plazmonunun dalga vektörü Eşitlik 2.2. ile ifade edilir (Matsubara, 1988):

$$K_{sp} = \frac{\omega_o}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad (2.2)$$

Burada ise , K_{sp} yüzey plazmon dalgasının dalga vektörü, ω_o gelen ışığın frekansı, c boşluktaki ışık hızı, η_s dielektrik ortamın kırma indisi, ϵ_m metal filmin dielektrik sabitidir. Gelen ışığın sönümlü dalgası, metal filmdeki serbest salınım yapan elektronlar bir diğer deyişle plazmonlar ile belirli bir geliş açısında rezonansa girer ve böylece yüzey plazmonu uyarılmış olur. Bu durum ışık şiddetinde bir azalma olarak gözlenir. Işık şiddetindeki değişimler algılayıcılar ile belirlenebilir.

2.3.3. Elipsometri

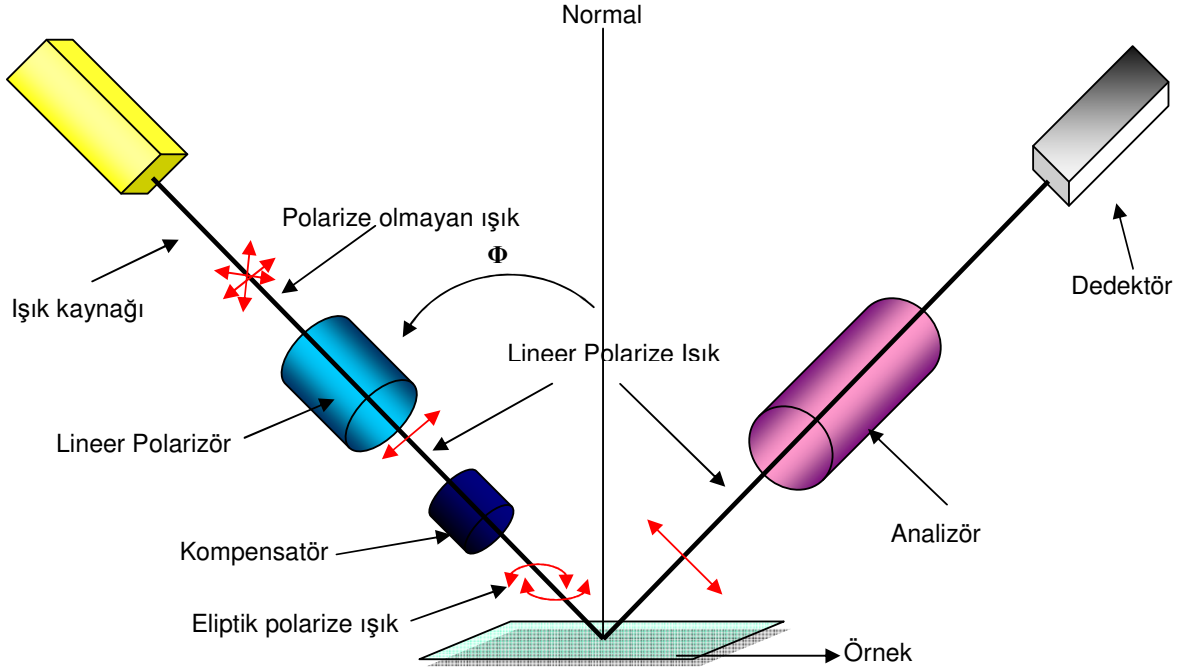
Elipsometri nanometre - mikrometre skalasında kalınlıklara sahip olan transparan ince filmlerin kompleks kırınım indisi veya dielektrik fonksiyonu gibi çeşitli dielektrik özelliklerinin incelenmesini sağlayan çok yönlü ve güçlü bir teknik olarak gündeme gelmektedir (Azzam, 1977). Yarıiletken fiziğinden mikroelektronığe, biyolojiden metalurjiye pek çok farklı alanda uygulama alanı bulmaktadır. En önemli avantajları zarar vermeyen, kesin sonuç elde edilebilen, temassız ve optik bir analitik teknik olmasıdır. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakaların, çok çeşitli substratların, polimerlerin, ince filmlerin karakterizasyonunda fiziksel özelliklerini değiştirmeden kullanılmaktadır. Ayrıca yansıyan ışığın dalga boyundan daha ince tabakalar için ölçüm yapılabilmektedir.

Elipsometri yansıyan ışığın polarizasyonundaki değişim sonucunda bir takım veriler elde eder. Bu veriler kompleks kırınım indisi ve dielektrik fonksiyonu tensörüdür ki bunların yardımı ile morfoloji, kristalinite, kimyasal kompozisyon, film kalınlığı, elektrik iletkenliği gibi çeşitli fiziksel parametrelere ulaşılabilir. İnce film kalınlığı ölçümünde en çok kullanılan teknik elipsometridir.

Temel olarak bir elipsometrenin çalışma prensibi şu basamaklardan oluşur:

1. Işık bir ışık kaynağından yayılmaya başlar.
2. Işık bir polarizörden geçirilerek lineer polarize ışık haline dönüştürülür.
3. Ardından bir kompensatörden geçen ışık eliptik polarize ışık haline geçer.
4. Daha sonra örnek yüzeyine gelen ışık yansıma yapar (bu sırada yine lineer polarize ışıktır.)
5. Yansıyan ışığın bir analizör yardımı ile polarizasyonundaki değişim analiz edilir.
6. Bir dedektör yardımı ile proses verileri bilgisayara aktarılır.
7. Toplanan veriler optik modelleme yardımı ile film kalınlığı ve refraktif indeks hakkında bilgi alımında kullanılır.

Bir elipsometrenin sahip olması gereken bileşenler temel olarak bir ışık kaynağı, bir polarizör, bir kompensatör, bir analizör ve bir dedektördür. Bu bileşenler ve çalışma prensibi şematik olarak Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Temel Elipsometre Bileşenleri

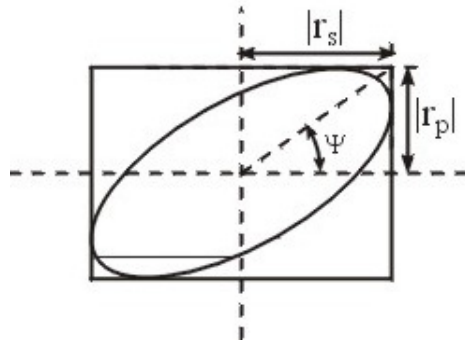
Işık kaynakları farklı dalga boylarında seçilebilirler, örneğin UV, görünür ışık veya IR seçilebilecek ışık kaynaklarından bazıları olabilir. Polarizör çıkışında özel bir polarizasyon durumu sağlanmış ışık üretir. Kompensatör ise gelen ışığın bir bileşeninde faz kayması yaratmak için kullanılır. 45°'ye ayarlandığında lineer polarizasyon eksenine göre lineer polarize ışığı eliptik polarize ışığa çevirir. Analizör yansıyan lineer polarize ışığı saptayan ikinci polarizör olarak düşünülür. Dedektör ise ölçülen polarizasyon değişimini bilgisayara veri olarak iletmektedir.

Işığın polarizasyon durumu s ve p bileşenleri olarak ikiye ayrılır. Örnek yüzeyine paralel olan ve gelen ışık düzlemine dik salınım yapan bileşen p bileşeni, gelen ışık düzlemine paralel salınım yapan bileşen ise s bileşeni olarak isimlendirilir. Bir diğer deyişle paralel polarize ışık p-polarize, bu doğrultuya dik ışık ise s-polarize ışık olarak adlandırılır.

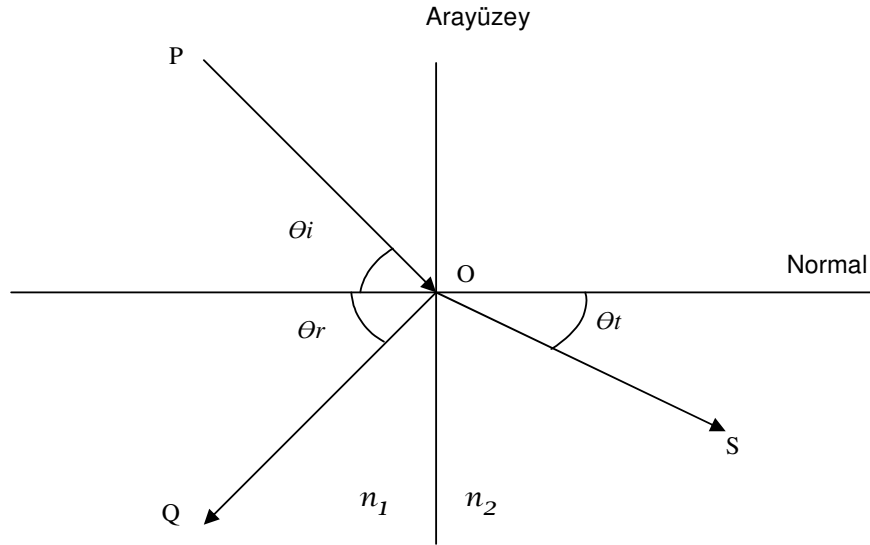
Elipsometre ile kompleks yansım oranı (r_p/r_s) ölçülür. Bu oran yansıyan ışığın polarizasyonunun gelen ışığın polarizasyonuna oranı olarak söylenebilir. Polarizasyon değişimini hesaplamada Eşitlik 2.3. kullanılır;

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan(\Psi)e^{i\Delta} \quad (2.3)$$

Eşitlik 2.3'te $\tan\Psi$ ile gösterilen değer yansım bazlı genlik oranı, Δ değeri ise faz kaymasıdır. Şekil 2.4.'de r_p , r_s , Ψ değerlerine nasıl ulaşıldığı gösterilmektedir.



Şekil 2.4. r_p , r_s , Ψ değerlerinin şematik gösterimi



Şekil 2.5. Gelen ışığın arayüzeyden yansım ve kırılması

Şekil 2.5.'de PO ışık ışını n_1 ve n_2 değerlerinde kırma indislerine sahip iki farklı ortamın arayüzeyindeki O noktasına gelir. Bu ışığın bir kısmı OQ olarak yansırken bir kısmı ise OS olarak kırılır.

Yansıma katsayıları belirtilen açılar ve kırma indisleri kullanılarak Maxwell denkliklerinden çıkarılmış olan Fresnel denklikleri (Eşitlik 2.4. ve Eşitlik 2.5.) kullanılarak hesaplanır.

S-polarize ışık için;

$$R_s = \left[\frac{\sin(\theta_t - \theta_i)}{\sin(\theta_t + \theta_i)} \right]^2 = \left[\frac{n_1 \cos(\theta_i) - n_2 \cos(\theta_t)}{n_1 \cos(\theta_i) + n_2 \cos(\theta_t)} \right]^2 = \left[\frac{n_1 \cos(\theta_i) - n_2 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_i\right)^2}}{n_1 \cos(\theta_i) + n_2 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_i\right)^2}} \right]^2 \quad (2.4)$$

P-polarize ışık için:

$$R_p = \left[\frac{\tan(\theta_t - \theta_i)}{\tan(\theta_t + \theta_i)} \right]^2 = \left[\frac{n_1 \cos(\theta_t) - n_2 \cos(\theta_i)}{n_1 \cos(\theta_t) + n_2 \cos(\theta_i)} \right]^2 = \left[\frac{n_1 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_i\right)^2} - n_2 \cos(\theta_i)}{n_1 \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_i\right)^2} + n_2 \cos(\theta_i)} \right]^2 \quad (2.5)$$

Transmisyon katsayıları ise her bir durum için Eşitlik 2.6 ve Eşitlik 2.7'de görüldüğü şekilde hesaplanır;

S-polarize ışık için;

$$T_s = 1 - R_s \quad (2.6)$$

P-polarize ışık için:

$$T_p = 1 - R_p \quad (2.7)$$

Belirli bir açıda Rp değeri sıfıra yaklaşır ve p-polarize ışık ışını tam olarak kırılır. Bu açı değerine Brewster Açısı adı verilir. Literatüre göre Brewster açısı en genel substrat olan cam için 56° civarındadır.

Daha yoğun bir ortamdan daha az yoğun bir ortama geçişte yani $n_1 > n_2$ durumunda, belli bir açının üzerinde gelen ışığın tamamı yansır. Bu açuya kritik açı adı verilmektedir. Bu fenomen İçten Tam Yansıma (Total Internal Reflection, TIR) olarak bilinir (Marsh, 2002). Cam için literatürde kritik açı değeri 41° olarak verilmektedir.

Yalnız tam yansımanın olduğu durumlarda gelen ışığın elektrik alan bileşeninin bir kısmı karşı ortama nüfuz eder ve bu alana sönümlü alan adı verilir. Bu sönümlü alan ve elipsometre beraberce bir takım parametrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

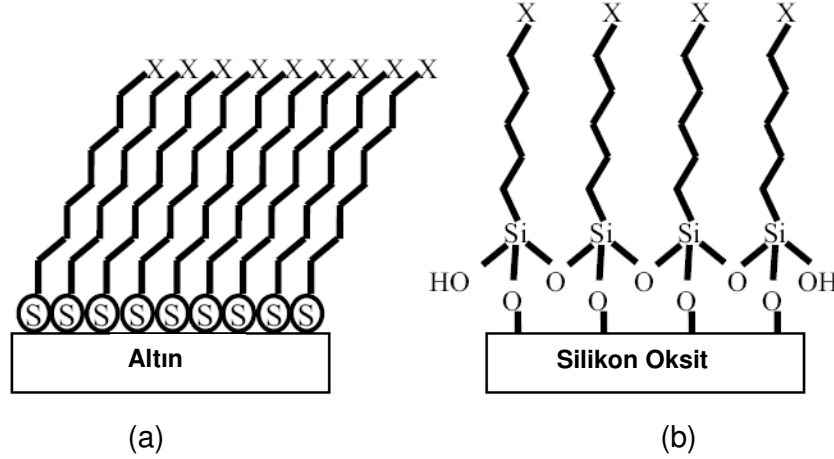
Bu tip sistemlere ise İçten Tam Yansımali Elipsometre adı verilmiştir. (Total Internal Reflection Ellipsometry, TIRE) (Poksinski, 2000; Westphal, 2002; Arwin, 2003).

Elipsometrik sensörler yüzeylerdeki etkileşimleri işaretlemeye gerek duymadan inceleyebilmeleri ile ön plana çıkmaktadır. Literatürde bu tip sensörlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma yer almaktadır. Temel olarak bu sensörler biyolojik spesifikliğe dayanmaktadır. Yüzeyler üzerinde belirlenmiş bölgelerde bulunan spesifik biyolojik moleküller bulunabilmektedir ve bu yüzeyler spesifik testlerde kullanılarak çeşitli tanılara olanak sağlamaktadır. Özellikle antijen – antikor etkileşimlerini inceleyen çalışmalarda yüzey üzerinde belirli bölgelere seçilmiş antijen veya antikorlar immobilize edilir. Bu bölgelerin sayısı binlere kadar artabilir. Böylelikle çok sayıda etkileşimin incelenmesi söz konusu olur. Bu etkileşimler elipsometrik sensörlerde etkileşim sonucunda değişen parametrelerin incelenmesi ile gözlemlenebilir.

2.4. Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar

Küçük moleküllerin bir araya gelerek büyük molekülleri meydana getirmesi aynen doğal bir süreç olan protein sentezi esnasında RNA moleküllerinin bir araya gelmesinde olduğu gibi kendiliğinden düzenlenme sürecidir. Yani kendiliğinden düzenlenme tüm canlılarda doğal olarak var olan bir işlemdir. Çeşitli moleküllerin tek molekül kalınlığına sahip filmler oluşturması da cansız sistemlerdeki kendiliğinden düzenlenme örneğidir. Bu tip filmlere verilebilecek en iyi iki örnek Langmuir – Blodgett filmleri ve kendiliğinden düzenlenen tek tabakalardır. Langmuir - Blodgett (LB) filmleri kısaca su-hava ara yüzeyindeki organik moleküllerin katı bir yüzeye transfer edilmesiyle, oluşan ince filmlerdir (Zasadzinski, 1994).

Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ise bir ucunda herhangi bir substrata özel afiniteye sahip bir grup bulunduran amfifilik moleküllerden oluşan organize tabakalar olarak tanımlanabilir. Bu moleküller aynı zamanda diğer uçlarında başka bir fonksiyonel grup taşımaktadırlar. Bu grup moleküllerin yerleştiği yüzeylerin adesif ve hidrofobik karakterini ve aktifliğini etkilediği için önem taşımaktadır (Wilber, 1999). Şekil 2.6.' da kendiliğinden düzenlenme örnekleri verilmiştir.



Şekil 2.6. Kendiliğinden Düzenlenme Örnekleri (a) Altın yüzey üzerine alkiltiyol moleküllerinin kendiliğinden düzenlenmesi (b) Silikon oksit yüzey üzerine alkilsilan moleküllerinin kendiliğinden düzenlenmesi (Gonsalves, 2008).

Kendiliğinden düzenlenme statik ve dinamik olarak kendi içinde ikiye ayrılabilir. Statik kendiliğinden düzenlenmede sistemi denge konumuna yaklaştırarak serbest enerjisini düşüren düzenli bir durum söz konusudur. Dinamik kendiliğinden düzenlenme ise önceden ortamda bulunan bileşenlerin bazı spesifik lokal etkileşimler ile en uygun desenleri oluşturması olarak tanımlanabilir ki buna bazı disiplinlerde kendiliğinden düzenlenme yerine kendiliğinden organizasyon da denilmektedir (Whitesides, 2002).

Kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakalar tıbbi teşhis, moleküler tanıma, yüzey modifikasyonları, mikro elektromekanik sistemler, biyoteknoloji v.b. gibi birçok uygulama alanına sahiptirler. Kendiliğinden düzenlenme, katı yüzey ile adsorbe olan molekül arasındaki kimyasal etkileşimlerle meydana gelir. Molekül – yüzey arası etkileşimin kuvveti ve tipi düzenlenmeyi etkileyen temel faktörlerdendir. Fiziksel etkileşim kuvveti kimyasal bağlanma kuvvetinden düşüktür. Kimyasal bağlanma dolayısı ile fiziksel etkileşimlerden daha karardır (Smith, 2004). Farklı moleküller ile oluşan yüzeylerin davranışları ve düzenlenmesi farklılık göstermektedir. Örneğin altın yüzeyler üzerinde kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar sülfür içeren (tiyol, sülfid ve disülfidler gibi) maddeler kullanılarak hazırlanırken, SiO_2 yüzeyler üzerine organosilan moleküllerinin düzenlenmesi ile oluşan tek tabakalar organize yapıların üretiminde önemli rol oynar (Smith, 2004; Major, 2001; Klaus, 1997; Zhu, 1999).

2.5. Desenleme Teknikleri

Son yıllarda array teknolojilerindeki hızlı ve olumlu gelişmeler sonucu nanoarray teknolojisinin gündeme gelmesi ile birlikte tek bir molekül düzeyindeki görüntülemeye doğru yeni kapılar açmıştır. Bu alanda array platformlarının hazırlanması kritik bir başlık olarak gündeme gelmekte ve bu konularda oldukça yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Henshaw, 2003). Protein veya DNA arraylerinin hazırlanmasındaki en önemli basamaklardan biri platform yüzeylerinin çeşitli tekniklerle desenlenmesidir. Yüzeylerin desenlenmesi istenilen özellik ve boyutta tasarımları elde etmek için çok çeşitli yöntemler içerir. Yarıiletken entegre devrelerin, nano veya mikro elektromekanik sistemlerin veya çip içi laboratuvar (lab-on-chip) denilen spesifik uygulamaların fabrikasyonları esnasında nano veya mikro mertebede desenlemenin yapılabilmesi için özel litografi teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler soft litografi, fotolitografi, Dip-pen litografi, iletken AFM litografisi, nano-tıraşlama ve nano-aşılama vb. gibi sıralanabilmektedir (Gu, 2004; Kramer, 2003)

2.5.1. Soft Litografi

Soft litografi tekniği özet olarak, üzerinde önceden istenilen şekilde desenlenmiş yapıları bulunduran elastomerik bir kalıp veya damga kullanılarak bu desenlerin array platformu olarak kullanılması düşünülen substrat yüzey üzerine aktarılmasıdır. Bu yöntem kullanılarak kendiliğinden düzenlenen tek tabakaların istenilen desenlerde yüzeye aktarılması mümkün olmaktadır. Bu teknik dahilinde kullanılan yöntemler, mikro temas baskılama, replika döküm, mikro transfer döküm, çözücü destekli mikro döküm olarak sıralanabilir. Mikrotemas baskılama (μ CP) en sık kullanılan soft litografi yöntemi olarak düşünülmektedir (Quist, 2005).

Genel olarak mikro temas baskılama yöntemindeki basamaklar şu şekildedir;

- (i) uygun bir kalıbın hazırlanması,
- (ii) kalıp üzerine elastomerik baskıyı oluşturacak karışımın dökülmesi ve baskının elde edilmesi,
- (iii) baskı üzerine istenen çözültideki moleküllerin aktarılması,
- (iv) baskı ile array platformuna desenleme için gereken baskının yapılması.

Sözü geçen bu basamaklar soft litografinin temel adımları olarak da düşünülebilmektedir. Soft litografi tekniği array platformları üzerine yapılacak desenlemeler için pek çok avantajı beraberinde getirmektedir. Bu avantajlardan bazıları, yöntemin kolay ve ucuz olması, kontrol edilebilirliği, farklı örneklerin eş zamanlı olarak desenlenmede uygulanabilmesi, foto-reaktif yüzeylere ihtiyaç duymamasıdır. Bu avantajların yanı sıra kullanılan elastomerik yapılardan kaynaklanan sınırlamalar, baskılamadaki tekrarlanabilirlik kısıtlamaları, yüzeylerin sebep olduğu sınırlamalar ve baskı sırasındaki temas basıncının sebep olduğu bir takım kısıtlamalar da söz konusudur. Yine de literatürde yöntem üzerine yapılmış çok sayıda araştırma mevcuttur (Rozhok, 2005; Rowan, 2002; Morhard, 2000).

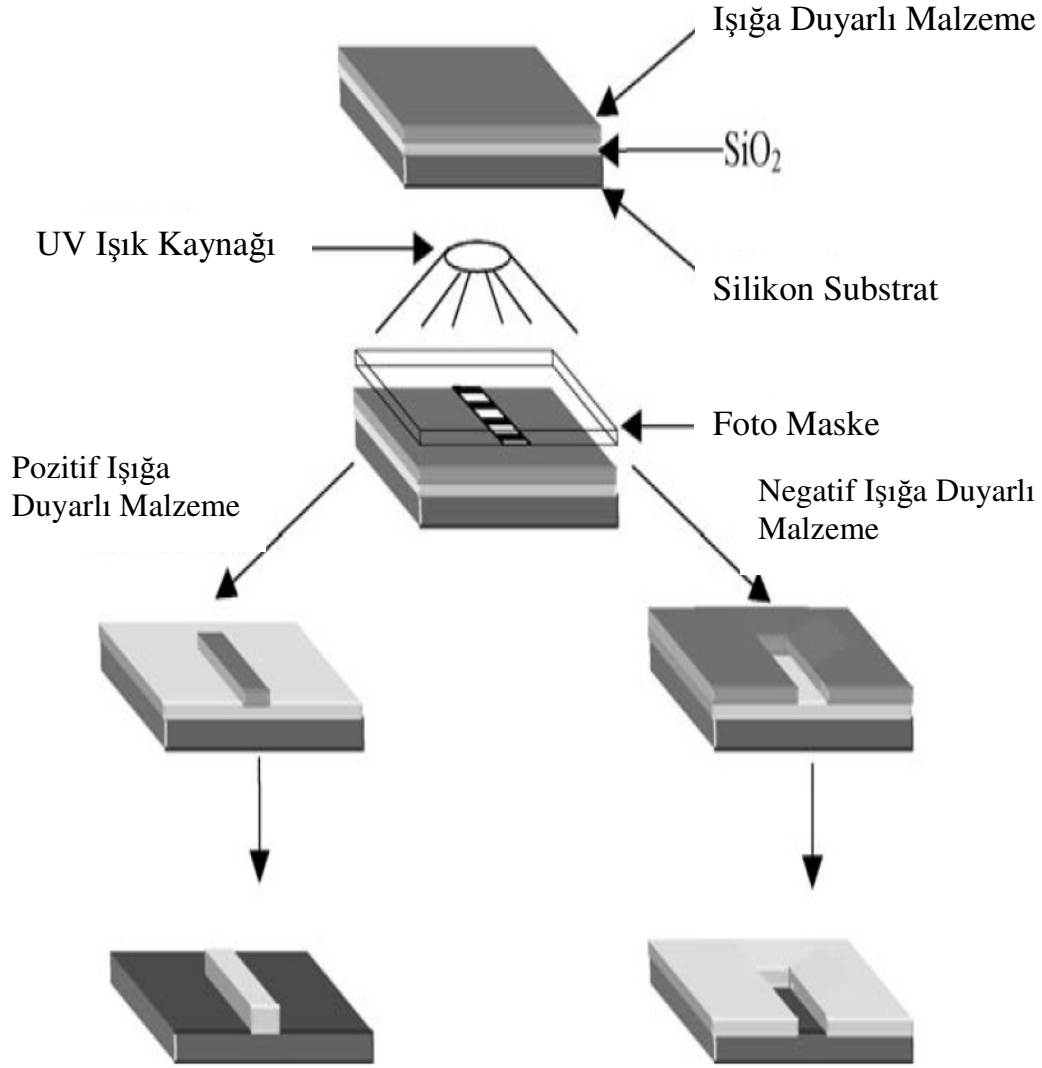
2.5.2. Fotolitografi

Fotolitografi kelimesi yunanca *ışık* anlamına gelen *φωτο* (*photo*), *taş* anlamına gelen *λίθος* (*lithos*) ve *yazmak* anlamına gelen *γράφω* (*grapho*) kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur ve taş üzerine ışıkla yazmak gibi bir anlama gelmektedir. Fotolitografi de günümüzde en çok kullanılan litografi tekniklerinden biridir. Fotolitografinin temel farkı temassız bir desenleme tekniği olmasıdır. Bir diğer yandan da daha tekrarlanabilir sonuçların elde edildiği, daha yüksek verimli ve kontaminasyona sınırlamalar getiren bir tekniktir. Bu teknikte, ışığa duyarlı veya dayanıklı bir takım malzemelerin yardımı ile istenilen şekilde tasarlanan bir foto maske kullanılarak desenleme elde edilir. Yöntem yarı iletken teknolojisinde ve biyosensörler için array platformlarının hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzdeki en başarılı mikrofabrikasyon yöntemlerinden biridir.

Fotolitografinin genel basamakları aşağıdaki gibi sıralanır:

- (i) Substrat yüzeyinin temizlenmesi
- (ii) Işığa duyarlı malzemenin uygulanması
- (iii) Yumuşak pişirme
- (iv) Işığa maruz bırakma
- (v) Develope etme
- (vi) Uzaklaştırma
- (vii) Sert pişirme

Şekil 2.7.'de fotolitografi ile desenleme yöntemi şematik olarak gösterilmiştir (Gonsalves, 2008).



Şekil 2.7. Fotolitografi tekniği ile desenleme yönteminin şematik gösterimi

(i) Substrat yüzeyinin temizlenmesi

Substrat hazırlanırken istenilen desenlemenin oluşturulacağı yüzey herhangi bir kontaminasyonun uzaklaştırılması amacıyla temizlenir. Bu aşamada yüzeyde herhangi bir partikül veya safsızlık kalmamalıdır. Temizleme aşamasından sonra substrat genelde etüvde olmak üzere tüm sudan kurtulmak amacı ile kurutulur.

(ii) Işığa duyarlı malzemenin uygulanması

Işığa duyarlı malzemeler pozitif malzeme ve negatif malzeme olmak üzere iki tiptedir. Pozitif ışığa duyarlı malzeme ultraviyole (UV) ışığı gördüğünde çözünür hale gelir. Yani fotolitografi için, pozitif bir fotoduyarlı malzeme üzerine bir fotomaske yerleştirilir ve UV ışığa maruz bırakılırsa, maske tarafından ışığın geçmesi engellenmiş bölgeler bozunmadan kalacak, ışığı gören bölgeler ise uygun çözücüler kullanılarak uzaklaştırılabileceklerdir. Böylelikle istenilen biçimde tasarlanarak özel maskeler üzerine basılmış desen yüzey üzerinde elde edilmiş olacaktır.

Negatif ışığa duyarlı malzeme ise bunun tam tersi bir prosedür ile çalışmaktadır. Bu tip malzemeler, UV ışığı gördüklerinde polimerleşirler, genelde polimerleşme çapraz bağlanma ile olur, bu da malzemeyi ışığa maruz kaldıktan sonra çözünmez hale getirir. Fotolitografik uygulamalarda negatif ışığa duyarlı malzeme ile kaplanmış yüzey üzerine foto maske yerleştirilerek UV ışığa maruz bırakıldığında, ışığı geçiren bölgeler polimerleşecek, karanlık bölgeler ise çözünür halde kalacaktır. Karanlıkta kalan kısımlar çözücüler ile uzaklaştırılarak maskedeki desenlemenin negatifi yüzey üzerinde elde edilecektir. Mikroelektronik alanında kullanılan ışığa duyarlı malzemeler çoğunlukla etilen glikol, monoetil eter propilen glikol ve metil eter asetat gibi malzemelerdir.

Kısaca bu basamakta hedeflenen desenlemeye yönelik olarak pozitif veya negatif ışığa duyarlı bir malzeme ile temizlenmiş substrat yüzeyi kaplanır. Kaplama için daldırılmalı kaplama (dip coating) veya döndürmeli kaplama (spin coating) gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir.

(iii) Yumuşak Pişirme

Yumuşak pişirmenin amacı ışığa duyarlı malzemenin uygulanması ardından kalan çözücülerin uzaklaştırılmasıdır. Bu aşama aynı zamanda malzeme duyarlılığını da artırmaktadır.

(iv) Işığa maruz bırakma

Bu aşamada hazırlanan foto maske ışığa duyarlı malzeme ile kaplanmış yüzey üzerine yerleştirilir ve ardından malzemenin türüne göre belirlenen bir süre boyunca belirli bir dalga boyunda UV ışığa maruz bırakılır. Maskenin yüzeye yerleştirilmesi üç farklı şekilde yapılmaktadır; kontak baskı yani maskenin doğrudan malzemeye temas ettirilmesi, yakın baskı yani maske ile malzeme arasında bir miktar aralık bırakılarak maske yüzeye yerleştirilmesi veya projeksiyon baskı yani maskenin görüntüsünü yüzeye yansıtan çeşitli araçlarla maske doğrudan değil de görüntü olarak yüzeye yerleştirilmesi.

Maskenin doğrudan malzeme ile temas ettiği durumda çözünürlük mikron mertebesinde ancak bu yöntemde maske üzerindeki herhangi bir safsızlık veya kalıntı malzeme ile temas ettiğinde ışığa maruz bırakma bozuk bir desenleme ile sonuçlanabilir.

Yakın baskıda maske ile malzeme arasındaki doğrudan temasın getirdiği deformasyondan veya kontaminasyondan korunmak için maske bir miktar (10 - 12 µm) aralık bırakılarak maske yüzeye yerleştirilir. Bu aralığın bırakılması çözünürlüğü belli bir miktar düşürebilmektedir.

Projeksiyon baskıda ise maskenin görüntüsü yüzey üzerine aktarılmaktadır. Bu yöntem en yüksek çözünürlükte sonuç veren yöntemdir ancak diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında pahalı ekipmanlar gerektirmektedir.

(v) Develope etme

Develope etme, pozitif ışığa duyarlı malzemenin daha çözünür hale gelmesini veya negatif ışığa duyarlı malzemenin daha az çözünür hale gelmesini sağlar. Pozitif ışığa duyarlı malzeme kullanıldığında bir eşik enerjisine ulaşılan kadar enerji arttıkça malzemenin çözünürlüğü artmaktadır. Bu eşik enerjisine ulaşıldığında ise tüm malzeme çözünür hale gelmektedir. Negatif ışığa duyarlı malzemede ise enerji arttıkça malzeme daha az çözünür hale gelmektedir. Yine bir eşik değerine ulaşıldığında malzeme tamamen çözünmez hale gelir. Develope etme basamağının

tamamlanmasındaki süre ve enerji ön pişirme koşulları, ışığa duyarlı malzeme miktarı, kullanılan kimyasal çözücüler gibi faktörlerle doğrudan ilişkilidir. Bu basamakta ışığa duyarlı malzeme türüne göre değişen uygun kimyasallar ile malzemelere muamele edilir.

(vi) Uzaklaştırma

Uygun çözücüler kullanılarak ışığa maruz kalma adımından ve develop etme basamağından sonra çözünür halde kalan kısımlar yüzeyden uzaklaştırılır.

(vii) Sert pişirme

Fotolitografinin son basamağı olan sert pişirmede yüzeyde desen oluşturan ışığa duyarlı malzeme daha sert bir hale gelir. Bir başka deyişle substrat ile malzeme arasındaki bağ kuvvetlendirilir.

2.5.3. Robotik Baskılama

Bu yöntemde bilgisayar kontrollü olarak baskılanması istenen molekülleri taşıyan özel tasarlanmış bir uç ile yüzey üzerine belirlenen desenleme gerçekleştirilir. Uç molekülleri istenilen oranda bırakarak desenlemeyi tamamlar. Mikro spotlama ve ink-jet baskılama yöntemleri robotik baskılama tekniğinin alt başlıkları olarak incelenebilir.

Mikro spotlama ya da mikro noktalama tekniğinde bir taşıyıcı iğne ya da birden fazla iğne veya uç ile bilgisayar kontrollü olarak seçilmiş prob moleküller yüzey üzerinde hareket ettirilerek istenilen bölge üzerine getirilir. Daha sonra yukarı-aşağı hareket ile yüzeye bir damla bırakılıp çekilir. Aynı şekilde devam edilerek istenilen desenleme elde edilir. Yüzeye bırakılan damlacık hacmi tekniğin tekrarlanabilirliğinde en önemli husustur. (Sheehan, 2003; Balazs, 2001, Gonsalves, 2008). Mikro spotlama yöntemi ile çok sayıda spot içeren çeşitli sensör uygulamaları birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (Balazs, 2001; Sheena, 2003; Diehl, 2001 Al-Khaldi, 2004).

Ink-Jet baskılama tekniği ise ucuz bir baskılama yöntemidir. Masa üstü yazıcılar ile kolayca uygulanabilirliğinden dolayı tercih edilen bir teknik olarak pek çok kişi tarafından kullanılmaktadır. Piezoelektrik kristaller yardımı ile molekül içeren çözeltiler, tıpkı bir yazıcının kağıt üzerine belli miktarda mürekkep bırakması gibi, istenilen şekillerdeki desenlemeyi elde edecek şekilde substrat yüzeyler üzerine, belli hacimlerde bırakılmaktadır (Barron, 2005; Nallani, 2006; Allain, 2004).

2.5.4. AFM Litografisi

Taramalı Tünellemeli Mikroskop (Scanning Tunneling Microscope, STM) prensiplerinin ışığında Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomik Force Microscope, AFM) geliştirilmiş ve pek çok uygulamada kullanılmıştır (Hoh, 1992; Raab, 1999; Kim, 2001; Liu, 2005; van der Heijden, 2006). Atomik kuvvet mikroskobu esnek bir kantileverin altına yerleştirilmiş bir tipe sahiptir. Bu ince ya da moleküler tip örnek yüzeyini tarar. Bu esnada lazer ışığı kantilevere çarpıp yansır. Böylece pozisyonu ve kantilevere çarpma derecesi dedektör yardımı ile belirlenir. Kantileverin lateral pozisyonu ve örnek ile tipin arasındaki uzaklık, piezoelektrik kristaller ile kontrol edilir. Atomik kuvvet mikroskobu ile adından da anlaşıldığı gibi van der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler, hidrofobik kuvvetler gibi pek çok kuvvetin ölçülebilmesi mümkün olduğu gibi, bu cihazlar desenleme araçları olarak da kullanılabilir.

Dip-pen litografi tekniğinde AFM tipi solvent menisküsünü kullanarak molekülleri yüzey üzerine yerleştirir (Demers, 2002; McKendry, 2002; Noy, 2002; Agarwal, 2002; Hampton, 2006). Dip-pen litografi tekniğın basamakları sırasıyla aşağıdaki gibidir;

- (i) Substrat yüzeyin hazırlanması
- (ii) Tipin baskılanacak çözelti ile kaplanması
- (iii) Tipin istenen deseni yüzey üzerine çizmesi

İletken atomik kuvvet mikroskobu litografisi tekniğinde AFM tipine bir voltaj uygulanır. Bu sayede AFM tipi katot olarak davranmaya ve solvent menisküsü elektrolit çözeltisi olarak davranmaya başlar. AFM tipinin yakınında güçlü bir elektrik alan meydana gelir ve bu şekilde elektrokimyasal reaksiyonlar meydana gelir (Ding, 2005).

2.5.5. LIGA

LIGA, Almanca litografi-elektroplakalama-kalıplama kelimelerinden türemiş bir kısaltmadır (*lithographie-galvanoformung-abformung*). LIGA tekniğinde 3 boyutlu polimerik veya metalik mikro ve nano yapıların elde edilmesi mümkündür. Radyasyona duyarlı bir polimer yüzey üzerine bir maske yerleştirilerek 0.2 – 0.6 nm dalga boyundaki derin x-ışını uygulanır ve maske üzerindeki desen substrata aktarılır (Menz, 2001). Işınlamaya maruz kalan polimer develop etme basamağında maruz kalmayan mikro veya nano boyutlu polimer kısımları ardında bırakarak çözücüsü ile uzaklaştırılır. Boşta kalan girintiler altın, bakır veya nikel gibi metal malzemelerle, elektroplakalama yöntemi kullanılarak doldurulur. Yapı x-ışınına ikinci bir kez daha maruz bırakılır ancak bu kez maske kullanılmaz. Böylelikle arda kalan polimerde bir çözücü ile uzaklaşabilir hale gelir. Bu adımda mikro veya nano metalik yapılar elde edilmiş olur. Bu şekilde elde edilen mikro veya nano yapılar, enjeksiyonla kalıplama, sıcak kabartma veya reçine dökümü gibi şekillendirme tekniklerinde kalıp olarak kullanılabilir (Gonsalves, 2008).

2.6. Mikroakışkan Sistemler

2.6.2 Mikroakışkan Sistemler Hakkında Genel Bilgiler

Yarı iletken teknolojisinde minyatürizasyona olan yönelmeye benzer olarak analitik kimya ve biyoloji gibi alanlarda da bu yönelim gözlenmeye başlamıştır. Bu alandaki en etkili araştırmalar ise boyut indirgemeye yönelik bakış açısı ile küçük miktarlardaki akışkanların davranışı, kontrolü ve manipülasyonu ile ilgilenen mikroakışkan sistemlerde olmuştur. Analitik tekniklerin mikroakışkan sistemleri kullanarak minyatürize edilmesi; örnek miktarları ve analitik enstrümanların boyutlarındaki azalma, yüksek hassasiyette ayırma ve tayin olasılıkları, yüksek çözünürlük ve tüm bunların çok kısa sürede olması gibi pek çok avantajı beraberinde getirmektedir. Ek olarak, mikroakışkan sistemler taşınabilir bir çip üzerinde çok sayıda örneğin paralel analizine de olanak vermektedir. Biyomedikal ve analitik uygulamalarda daha hızlı ve sonuçlar elde edildiği için bu tür sistemler dikkatleri çekmeye hızla devam etmektedir. Bu sistemlerin gelişmesi ile örneğin bir hekim bir hastanın teşhis testini hastanın yatağında veya bir kaza anında kazanın olduğu yerde anında yaparak sonuca birkaç

dakikada ulaşabilecektir. Bunun yanında minyatürizasyon laboratuvar güvenliğine de çeşitli avantajlar sağlar. Örnek olarak oldukça düşük miktarlarda örnek kullanılmasına bağlı olarak geleneksel örnek hazırlama prosedürlerinde karşılaşılan dökülmeler, patlamalar ve diğer olası laboratuvar kazaları, problem olmaktan çıkabilirler. Bu sistemlerde daima laminar akış vardır ve yüzey gerilimi her zaman düşüktür, bu sebeple de mühendislik özellikle kimya mühendisliği uygulamalarında pek çok avantaja sahiptirler (Samel, 2007; Tabeling, 2005).

Mikroakışkan sistemler çeşitli kimyasal, biyolojik ve medikal uygulamalarda kullanılmak üzere geliştirilen minyatürize sistemler için bir çekirdek teknoloji olarak tanımlanabilir. Yaşam bilimi araştırmalarında hızla büyüyen bir alan da mikroakışkan sistemlerdir. Yüksek hassasiyetli bu tip minyatür cihazlara olan talep son yıllarda hızla artmıştır. Bu artış özellikle kimyasal ve medikal cihazlar (gen çipleri, işitme aygıtları, ilaç salım sistemleri, biyosensörler, yakıt hücreleri vb.) telekomünikasyon bileşenleri, optik bileşenler (minyatür lensler ve aynalar), mekanik cihazlar (ink-jet printer kafaları, mikro ısı değiştiriciler vb.) gibi tasarımlarda görülmektedir (Tabeling, 2005).

Mikroakışkan sistemlerin ana bileşenleri; örneğin yüklendiği kısım (bazı durumlarda örneğin hazırlandığı kısım), akışkanların mikron boyutlu kanallarca sevkiyatının sağlandığı kısım, vanalar, akışkanların karıştırıldığı kısımlar, sıcaklık kontrol üniteleri vb. gibi bileşenlerdir. Mikro-pompalar, mikro-vanalar, mikro-karıştırıcılar, mikro-akış ölçerler gibi pek çok mikroakışkan sistem bileşeni geliştirilmiş ve başarı ile uygulanmıştır (Manz, 1992; Harrison, 1993; Jacobson, 1994; Harrison, 1991; Weigl, 1998; Evans, 1997; Bohm, 2001; Knight, 1998; Bertsch, 2001; Chaudhari, 1998; Northrup, 1998; Daniel, 1998; Kopp, 1998; Renaud, 2002; Fu, 1998).

Bu tip mikrosistemlerin yapımındaki çözülmesi gereken başlıca sorun mikrofabrikasyondur. Bu cihazların çoğu genellikle kristal silikon (Si) malzemeler üzerinde kurulur ve geliştirilir. Üretim için bu malzemelerin seçilme nedeni, son kırk yılda mikroelektronik endüstrisi için silikon bazlı mikrofabrikasyon metotlarının oldukça hızlı gelişmiş olmasıdır. Özellikle fotolitografi, ıslak veya kuru aşındırma gibi yöntemler doğrudan yarı iletken endüstrisindeki mikrofabrikasyon yöntemlerinden kopyalanarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte başta biyomedikal alanı olmak üzere

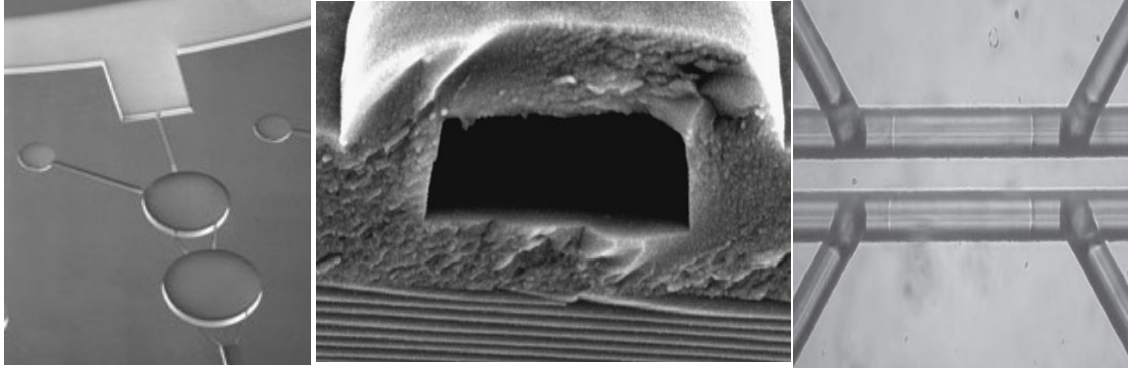
pek çok alanda bu malzemeler için geliştirilen üretim metotları ya çok pahalıdır ya da en uygun berraklıkta, çarpma dayanımında veya biyouyumlulukta üretilmemeleridir. Ayrıca bu malzemeler üzerine yapılacak mikroişlemelerde kullanılan yöntemler temiz oda, glove-box gibi pahalı ekipmanlar gerektirmektedir. Silikon yapılar bunların yanı sıra UV ışığa karşı opak olduğu için optik tanı sistemlerinde kullanılamaz (Li, 2005). Cam malzemeler ise optik olarak geçirgen olması, solventler ile uyumu, yüzey kararlılığı, fabrikasyon yöntemlerinin gelişmiş olması gibi pek çok avantaja sahiptir. Yine de mikroakışkan bir sistemde gerekli olan bileşimlerin fabrikasyonunda cam malzemelerin kullanılması çok da avantajlı olmamaktadır (Li, 2005, Tabeling, 2005).

Hali hazırda minyatür cihazların fabrikasyonunda silikon bazlı olmayan malzemelere, özellikle de çok geniş fizikokimyasal özelliklere sahip olan polimerlere yönelinmiştir. Ayrıca düşük maliyetli olmaları, işlenebilirliklerinin iyi olması, geri dönüşümlü olmaları vb. gibi pek çok avantaja da sahiptirler. Ancak polimer mikrofabrikasyon teknikleri de hala geliştirilme aşamasındadır. Örneğin polidimetil siloksan (PDMS) substratlar cam ve silikon yüzeylerden sonra minyatürize uygulamalarda günümüzde en çok tercih edilen malzemelerdir ancak yeni materyallerin kullanılabilirliği hali hazırda araştırılmakta ve geliştirilmektedir. Örneğin son yıllarda akrilat ve metakrilat bazlı polimerlerin kullanılabilirliği üzerine çalışmalar söz konusudur (Tabeling, 2005).

Polimer bazlı mikro bileşenler yığın ve yüzey işleme teknikleri ile geleneksel imalat metotlarının (döküm, enjeksiyonlu kalıplama, sıcak kabartma vb.) birleşimi ile üretilmektedir. Yine de bu teknikler tam olarak analiz edilebilmiş değildir ve deneme-yanılma ile halen geliştirilmektedirler. Sonuç olarak yeni metotların ortaya çıkarılması ve var olan yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Avrupa ve Japonya'da bu alanda pek çok araştırma yürütülmektedir (Danimarka Teknik Üniversitesi, Mikro ve Nano Teknoloji Bölümü, Danimarka; Max Planck Enstitüsü, Mikroakışkanlar Laboratuvarı, Almanya; vb.). ABD'de de özellikle üniversitelerin araştırma laboratuvarlarında bu konuyla ilgili çalışmalar mevcuttur (Stanford Microfluidics Laboratory, ABD; UCSB Microfluidics Laboratory, ABD; Posner Research Group of Arizona State University, ABD, vb.).

Araştırmacılar ve bilim adamları çok sayıda çeşitli çalışmayı aynı anda gerçekleştirebilecek bir cihaz üretmek üzerine yoğun bir şekilde çalışmaktadır.

Hepsinin ortak amacı bütün bir laboratuvarı tek bir çip üzerine indirgeyebilmektir. Çip üzerinde laboratuvar (lab-on-chip) denilen bu tür bir cihaz sayesinde örneğin bir hastalık teşhisi çok kısa sürede yapılabilecek, hatta hastalar hastaneye gitmeden evlerinde hastalık teşhisi yapabileceklerdir. Bununla birlikte kimyasal tanı sistemi olarak da bu tip cihazlar ile özellikle savunma sanayinde gelişmeler sağlanabilecektir (Lai, 2003). Şekil 2.8.'de bazı mikroakışkan sistem görüntüleri verilmiştir (Minteer, 2006; Tabeling, 2005)



Şekil 2.8. Bazı mikroakışkan sistemlerin SEM görüntüleri

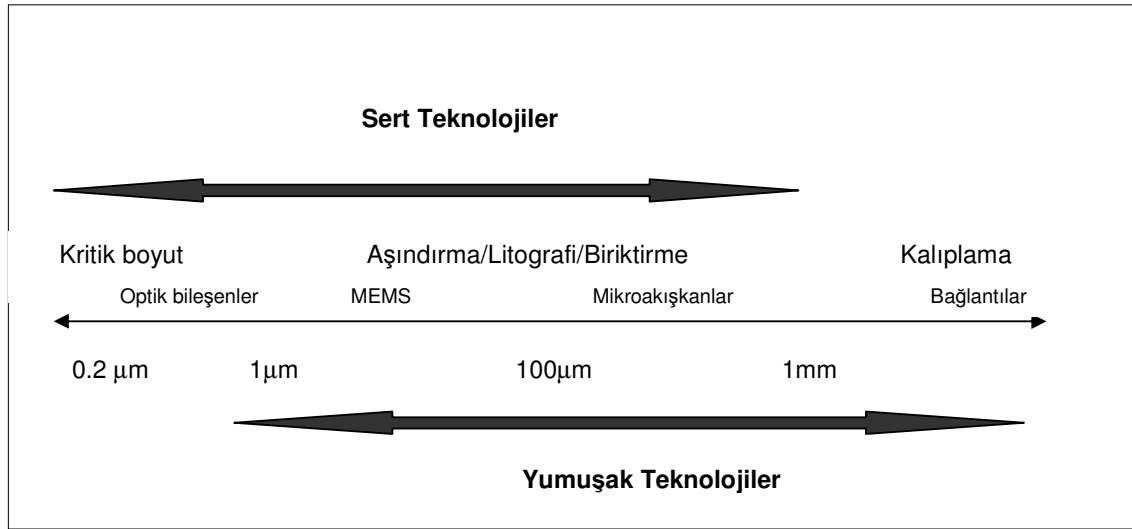
2.6.2 Mikroakışkan Sistemlerin Kullanım Alanları

Mikroakışkan sistemler beraberinde getirdikleri pek çok avantaj sayesinde çok spesifik uygulama alanlarında yer bulmaktadırlar. Mikron boyutlu dolgulu kanallar kullanılarak katı fazda ekstraksiyondan (Reyes, 2002) biyoseperasyona kadar pek çok uygulamaları bulunmaktadır (Tabeling, 2005). İmmunoassay uygulamalarında mikroakışkan sistemlerin kullanılması son birkaç yılda oldukça popüler hale gelmiştir (Gervais, Delamarche, 2009; Xiang, 2006). Minyatürize sistemler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulamalarında (Yung, 2009) , DNA amplifikasyonunda (Zhang, 2009) mikroakışkanlı sistemlerin kullanılmaya başladığı gözlemlenmektedir (atıf). DNA arraylerinde de mikroakışkan sistemlerin kullanılması günümüz araştırma konularından biridir (Cheng, 2009). Biyoyakıt hücresi sistemlerinde de mikroakışkan kanalların kullanılması diğer bir uygulama alanıdır (Togo, 2007). Sinir bilim, kardiyoloji gibi pek çok medikal branşlarında da mikroakışkan kanal kullanımı gündemdedir (Wang, 2009; Gropler, 2008). Çeşitli hücre kültürü uygulamalarında da yer edinen mikrokanallar kromatografik uygulamalarda (gaz kromatografisi, kapiler

elektroforez, kapiler elektro kromatografi vb.), doku mühendisliği uygulamalarında özellikle doku iskelelerinde, diagnostik tanı kiti uygulamalarında (DNA çipleri, hamilelik testleri vb.), ilaç etkileşimlerinin gözlemlenmesinde, protein araştırmalarında olduğu gibi aynı zamanda mikro elektro mekanik sistemler (MEMS), mikro toplam analiz sistemleri (μ TAS) veya diğer bir deyişle çip üzerinde laboratuvar (lab-on-chip) uygulamalarında kullanılmakta ve kullanımları geliştirilmeye devam edilmektedir (Andersson, 2004; Zhang, 2009; Wang, 2002; Weigl, 2008; Kang, 2008).

2.6.3. Mikroakışkan Sistemlerin Geleneksel Mikrofabrikasyonu

Mikroakışkan sistemlerin fabrikasyonun da geleneksel olarak üç ana başlık mevcuttur. Bunlar sert, plastik ve yumuşak mikroteknolojiler olarak bilinmektedirler. Günümüzde sıklıkla kullanılan bu teknolojiler ve kullanılan teknolojiyle elde edilen sistemlerin boyutları Şekil 2.9.'da belirtilmiştir (Tabeling, 2005).



Şekil 2.9. Günümüzde kullanılan mikroteknolojiler ve boyut aralıkları

Aşındırma/Litografi/Biriktirme temelli teknolojiler 0.2 – 500 µm boyut aralığında uygulanabilmektedir. Bu teknolojilere sert teknolojiler denilmektedir çünkü cam veya silikon gibi sert malzemeler kullanılır. Aşındırma, litografi ve biriktirme işlemlerinin birleşimi ile kompleks mikroakışkan aygıtların yapılması mümkün olmaktadır.

Yumuşak teknolojiler ile ise 0.5 – 500 µm aralıkta mikrofabrikasyona ulaşılabilir. PDMS, polimetil metakrilat (PMMA) gibi elastomerik malzemelerin kullanılmasından

dolayı yumuşak teknolojiler adını almışlardır. Kullanılan malzemeye göre mikrofabrikasyonda lazerli teknikler veya replika kalıplama gibi teknikler seçilebilir. Önceden tasarlanan kalıpların kullanılarak elastomerlerin şekillendirilmesi en yaygın yöntemlerden biridir.

Silikon teknolojileri diğer bir deyişle sert teknolojiler uzun yıllardır problemsiz olarak kullanıldıkları için uygulanabilirlikleri oturtulmuş yöntemlerdir ancak plastik ve polimerler son yıllarda gelişmeye başlamış ve hala yoğun bir şekilde araştırılmaktadırlar (Harraldsson, 2006). Plastik teknolojiler maliyet açısından çekici konumdadırlar çünkü günümüz plastikleri silikondan yaklaşık 100 kat daha ucuzdur. Yumuşak teknolojiler hızlı prototiplendirme olanaklarından ötürü de ilgi çekmektedirler. Silikon teknolojilerinde bir mikroakışkan aygıtın üretimi bir hafta kadar sürüyorsa, plastik teknolojisinde bu aygıtın üretimi birkaç saat sürer. Pek çok avantajı sebebiyle son yıllarda silikon yerine çeşitli polimerlerin mikrofabrikasyonuna doğru bir eğilim söz konusudur.

a. Sert Teknolojiler (Silikon Teknolojileri)

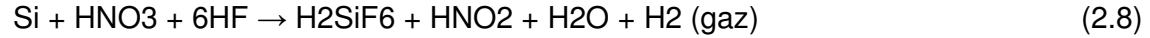
Sert veya silikon teknolojileri; aşındırma, litografi ve biriktirme tekniklerini içermektedir. Bu teknikler temiz oda veya glove box gibi oldukça temiz, safsızlıklarda arındırılmış ortamlarda uygulanmalıdır. Bu ortamlar ise fabrikasyon maliyetini oldukça arttırmaktadır. Silikon için mikrofabrikasyon prosesleri iyi oturmuştur ve çok sayıdadır. Bu proseslerde uygulanan teknikler mikrometre skalasında yüksek hassasiyette sonuçlar vermektedir. Silikonun yapısı kristalografik açıdan bakıldığında kübik kristal şeklindedir. Fizikokimyasal karakteristikleri diğer pek çok proses ile uyumlu bir malzeme olduğunu göstermektedir (Tabeling, 2005). Silikon bunlar gibi pek çok özelliğinden ötürü tercih edilmiş ve çeşitli fabrikasyonlarda başka materyallerin harcanması söz konusu olsa da sıklıkla kullanılmıştır.

Islak Aşındırma

Islak aşındırma belli bölgeleri koruyucu bir maske ile kaplanmış silikon veya cam malzemeyi sıvı fazda kimyasal atağa maruz bırakma ile gerçekleştirilen bir

fabrikasyon yöntemidir. Kendi içinde izotropik ve anizotropik aşındırma olarak ikiye ayrılmaktadır.

İzotropik ıslak aşındırmada genellikle hidroflorik asit (HF), nitrik asit (HNO₃) gibi asitler kullanılır. Genelde cam malzeme için HF kullanılırken, silikon için HF/HNO₃/CH₃COOH karışımı kullanılmaktadır (Tabeling, 2005). Aşınma gerçekleşirken meydana gelen kimyasal reaksiyon şu şekildedir;



Anizotropik ıslak aşındırmada ise litre başına birkaç mol olacak şekilde yüksek konsantrasyonlardaki alkan çözeltileri kullanılmaktadır. İzotropik aşındırmanın tersine anizotropik aşındırmada kullanılan sıvı faz bazik karakterlidir. Bu tip aşındırma günümüzde izotropik aşındırmanın olduğu kadar iyi anlaşılabilmiş değildir.

Kuru Aşındırma

Kuru aşındırma bir substratın gaz veya plazma fazı içerisinde iyonik atağa maruz bırakılması ile gerçekleştirilir. Bu teknikle geometrisi oldukça düzgün fabrikasyonlara ulaşılabilir. Örneğin kristal bir yapıda köşeli mikrokanalların eldesi bu teknik ile gerçekleştirilebilir (Tabeling, 2005). Kuru aşındırmada temel olarak dört ayrı teknik söz konusudur;

- Fiziksel aşındırma
- Kimyasal aşındırma
- Fizikokimyasal aşındırma
- İnhibitör varlığında fizikokimyasal aşındırma

Fiziksel aşındırma bir elektrik alan içerisinde hedef yüzey üzerine ivmelendirmiş iyonların bombardımanı ile gerçekleştirilir. Gelen iyon akısına bağlı olarak yüzeyde fiziksel bir aşınma söz konusudur. Bu tip aşındırma çok seçici değildir. Kimyasal aşındırmada ise elektrik alan içerisinde kimyasal türler hedefe doğru göç ederler ve hedef yüzeyde bir kimyasal reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyon sonucunda uçucu türler oluşur ve yüzeyde delikler meydana gelir. Fizikokimyasal aşındırmada fiziksel

ve kimyasal aşındırma birleştirilmiş, hem iyonların akısından ötürü fiziksel bir aşınma hem de meydana gelen kimyasal reaksiyondan ötürü bir aşınma oluşur. Kuru aşındırma ile mikrofabrikasyonda en çok bu yöntem kullanılmaktadır. İnhibitör varlığında gerçekleştirilen fizikokimyasal aşındırma ise yine fiziksel ve kimyasal atakların söz konusu olduğu ancak koruyucu bir tabakanın aşınması istenmeyen bölgeler üzerine yerleştirildiği oldukça özel bir yöntemdir. Bu şekilde en/boy oranı oldukça düzgün geometriler elde edilir ancak yöntem zahmetlidir (Tabeling, 2005).

Biriktirme

Biriktirme yöntemleri temel olarak ikiye ayrılmaktadır:

- Fiziksel Buhar Birikim (Physical Vapor Deposition, PVD)
- Kimyasal Buhar Birikim (Chemical Vapor Deposition, CVD)

PVD tekniğinde, cam veya silikon malzeme vakum ortamında yüksek enerji ile iyonlaştırılmış plazma fazı ile kaplanmaktadır. İnce film kaplamalarında oldukça etkin olarak kullanılan bir yöntem olan PVD mikroelektronik, tıp gibi alanlarda kullanılmakta günümüzde mikrofabrikasyonda da önemli ölçüde yer bulmaktadır.

Teknik kendi içinde iki yöntemeye ayrılır; termal evaporasyon ve püskürtme. Termal evaporasyonda, kaplanacak substrat ve kaplama malzemesi vakum ortamına yerleştirilir. Ani ısıtma ile kaplama malzemesi süblimleştirilerek substrat yüzeyine istenilen kalınlıkta kaplama yapılır. Püskürtme yönteminde ise soğuk plazma yaratma gerekliliği vardır. Elektrokimyasal olarak kaplama malzemesi ayrıştırılır ve substrat yüzeyine moleküler seviyede kaplama yapılır.

CVD tekniğinde ise hedef yüzey ile temas eden kaplama malzemesi arasında kimyasal etkileşimler sonucu yüzey üzerine kimyasal olarak bağlanmış bileşenler oluşur. Bu durumda iki olasılık vardır, reaksiyon gaz fazında meydana gelerek hedefin yüzeyine adsorplanır veya reaksiyon hedef yüzeyde meydana gelir. CVD üzerine literatürde ayrıntılı çalışmalar mevcuttur (Tabeling, 2005).

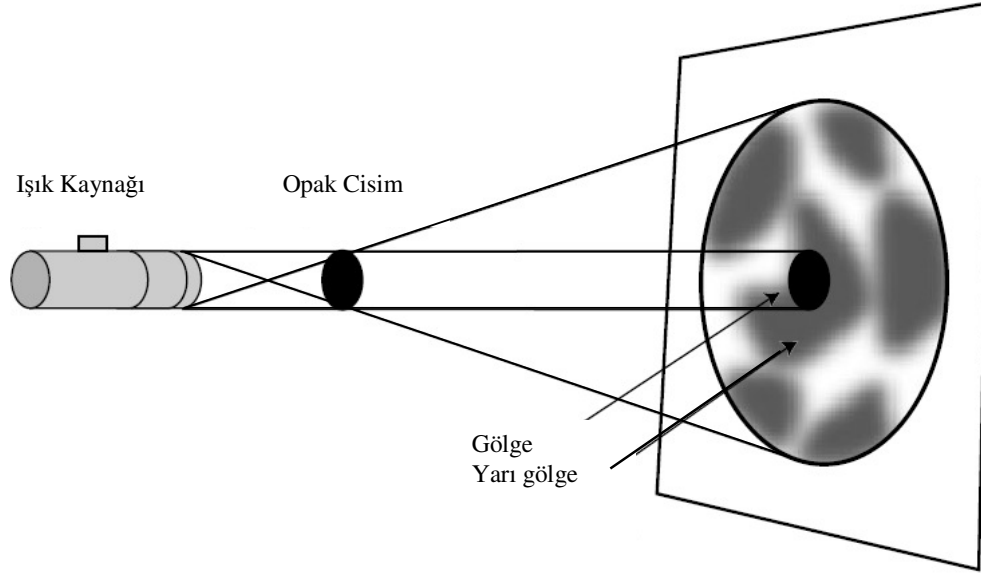
Fotolitografi

Fotolitografi daha öncede bahsedildiği gibi bir fotomaskeden geçen ışık ile yüzey üzerine kaplanmış ışığa duyarlı malzemenin kimyasal özelliklerinde bir değişimin meydana getirilmesi ve daha sonra uygun yöntemler ile yüzeyden uzaklaştırılarak istenen fabrikasyona ulaşılması tekniğidir. Cam ve silikon malzemelerin mikrofabrikasyonunda ana tekniklerden biri fotolitografidir.

Işığa duyarlı malzemeler daldırmalı kaplama (dip coating) veya döndürmeli kaplama (spin coating) yöntemleri ile yüzeye yerleştirilirler. Daldırmalı kaplama yönteminde yüzey basitçe ışığa duyarlı malzeme içine daldırılır ve çekilir. Döndürmeli kaplama yönteminde ise belli bir hızda dönen yüzey üzerine substrat yerleştirilir, ışığa duyarlı malzeme yüzey üzerine dökülür ve belli kalınlıklarda kaplama sağlanabilir. Döndürmeli kaplama yönteminde daldırmalı kaplama yöntemine göre daha tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmektedir. Kaplama işleminden sonra çözücü buharlaştırmak için 70 - 100 °C sıcaklık aralığında kısa bir pişirme basamağı söz konusudur.

Fotolitografi maskeleri genellikle üzerine istenilen desenin krom kaplama ile oluşturulduğu kuvars bir plakadır. Ancak yüksek çözünürlükte baskıların alınabildiği sistemler sayesinde film kağıtları üzerine de maskeler basılabilir. Bu maskeler üzerinden ışığa maruz bırakma işlemi gerçekleştirilir. Işık kaynakları 300 – 450 nm dalga boyu aralığında ışık saçan lambalar olabilmektedir. Fotolitografi işlemlerinde maskenin yüzeye olan yüksekliği önemlidir. Bu yükseklik maske ayarlayıcı sistemler ile istenilen şekilde ayarlanabilmektedir (Tabeling, 2005).

Fotolitografi de bir takım kısıtlamaları olan bir yöntemdir. Bu kısıtlamalar arasında en çok göze çarpanlarından biri yarı ışık etkisi denilen kısıtlamadır. Şekil 2.10.'da daha detaylı görülebileceği gibi ışığa maruz kalmayan karanlık bölgeler ve ışığa maruz kalan aydınlık bölgeler haricinde bir takım optik kurallardan kaynaklı olarak bazı bölgeler orta şiddette ışığa maruz kalmaktadırlar ve bu istenilen yapıyı elde ederken sorunlara yol açabilmektedir. Bu durum kullanılan ışığın dalga boyuna da bağlı olarak maske üzerindeki desenin tam olarak aktarılmasında da kısıtlamalara sebep olmaktadır (Tabeling, 2005).



Şekil 2.10. Yarı ışık etkisinin şematik gösterimi

Işığa duyarlı kaplama malzemelerinin belli özelliklere sahip olmaları gerekir. Bu özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Işığa maruz kalan ve kalmayan bölgeler arasındaki çözünürlük farkının belirgin olması gerekir.
- Yüksek fotoduyarlılıkta olmaları gerekir.
- Bazı kimyasallara karşı yüksek direnç göstermeleri gerekir (örneğin HF).

Silikon yüzeylerde mikrokanal oluşturulması birkaç basamaktan oluşur. Bu basamaklar;

- (i) Silikon yüzeyin termal olarak oksitlendirilmesi
- (ii) Işığa duyarlı malzeme ile yüzeyin kaplanması
- (iii) Foto maske kullanılarak ışığa maruz bırakma
- (iv) Develope etme
- (v) Oksit tabakanın aşındırılması
- (vi) Işığa duyarlı malzemenin kaldırılması
- (vii) Silikonun aşındırılması ve mikrokanalın eldesi
- (viii) Oksit tabakanın temizlenmesi

Cam yüzeyler üzerine mikrofabrikasyonda da silikon mikrofabrikasyonuna benzer olarak ince film birikimi, fotolitografi, aşındırma basamakları yer almaktadır (Li, 2005). Bu basamaklar ise şu şekildedir:

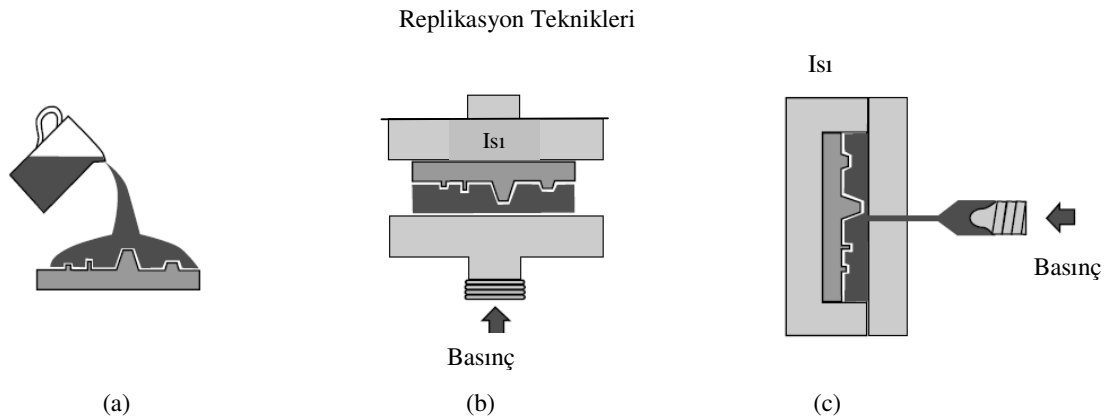
- (i) Cam yüzeyin krom/altın film ve ışığa duyarlı malzeme ile kaplanması
- (ii) Işığa maruz bırakma
- (iii) Develop etme
- (iv) Krom/Altın filmin aşındırılması
- (v) Camın aşındırılması
- (vi) Işığa duyarlı malzeme ve Krom/Altın filmin kaldırılması
- (vii) İkinci bir cam yüzeyin kanal oluşturacak şekilde kapatılması ve mikrokanal eldesi

b. Yumuşak Teknolojiler (Plastik Teknolojileri)

Replikasyon işlemi üç ayrı ana yöntem dahilinde gerçekleştirilir. Bu yöntemler;

- Kalıplama
- Döküm
- Mikro-enjeksiyon ile kalıplamadır.

Bu üç replikasyon yönteminin şematik olarak gösterimi Şekil 2.11.'de verilmiştir (Tabeling, 2005).



Şekil 2.11. Replikasyon yöntemleri (a) Kalıplama (b) Döküm (c) Enjeksiyonlu Kalıplama

Kalıplama

Bu yöntemde basitçe katalizör ve polimer içeren bir karışım bir kalıp üzerine dökülüp ısıtılır. Retikülasyon (ağsı örgü oluşumu) sonrası yapı kalıp üzerinden sıyrılır. Sıyrılan polimer kalıbın şeklinin negatifini almış haldedir. Kullanılacak kalıplar daha önce de bahsedilen mikrofabrikasyon teknikleri kullanılarak hazırlanırlar. Kalıplama tekniği için polimer kalıplar oldukça uygundur. Mikrosistemler için en yaygın kullanılan kalıplama tekniği PDMS bazlı kalıplamadır (Becker, 2000).

PDMS ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$) silikon yağları içeren polimer ailesinin bir üyesidir. Literatürde PDMS ile mikrosistemlerin geliştirilmesi üzerine oldukça fazla sayıda yayın mevcuttur (Chuang, 2009; Zhang, 2009; Dodge, 2006). PDMS bazlı polimerler retikülasyon ajanlarının varlığında polimerizasyon sıcaklığının üzerine çıktığında elastomerik bir yapı oluştururlar.

PDMS bazlı kalıplama temel olarak üç basamaktan oluşur:

- (i) Kalıbın hazırlanması
- (ii) Retikülasyon
- (iii) Ayırma

Döküm

Dökme işleminde şekli değişebilen bir malzeme ısıtılarak kalıp bu malzemenin üzerine preslenir. Soğutmadan sonra ayrılan malzeme kalıbın negatif şeklini almıştır. En çok kullanılan döküm malzemesi katı halde pleksiglas gibi şeffaf plastik halinde bulunan polimetil metakrilattır (PMMA). 170 °C gibi yüksek sıcaklıklara çıkılıp yaklaşık on barlık bir basınç uygulandığında malzeme şekil değiştirebilmektedir. Bu şekilde sıcaklık kontrollü bir sistem ile istenen yapıların bir PMMA kalıbına preslenerek elde edilmesi mümkün olmaktadır. İstenen yapı kalıbın negatifi olacak şekilde elde edilir. PMMA haricinde polietilen (PE), polivinil klorür (PVC) gibi polimerik malzemeler de kullanılmaktadır (Becker, 2000). Döküm işleminde kullanılacak kalıp genellikle silikon bazlı veya metalik malzemelerden üretilir.

Mikroenjeksiyon ile Kalıplama

Isıtılmış bir plastiğin sıvı halde bir kalıp içerisine enjeksiyonu daha sonra ayrılmasına dayanan bir tekniktir. Bu teknikte de diğerlerinde olduğu gibi kalıbın negatif şekli plastiğe aktarılır. Teknik üç ayrı adımda incelenebilir:

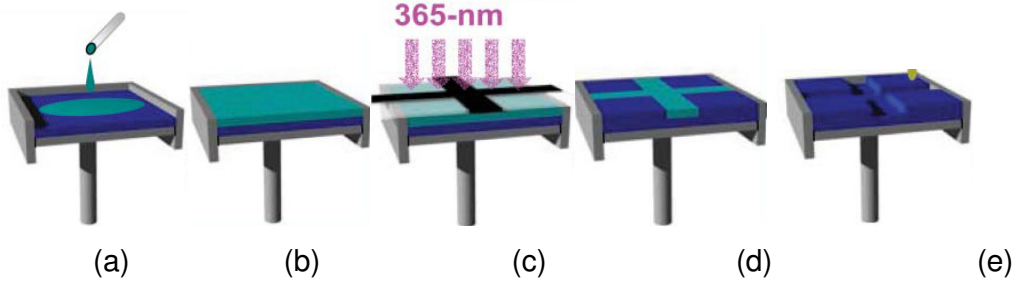
- (i) Sıvı plastik malzeme vakum ortamında ve sahip olduğu camsı geçiş sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta kalıp içerisine enjekte edilir.
- (ii) Sistem camsı geçiş sıcaklığının altında bir sıcaklığa kadar soğutulur.
- (iii) Kalıp çıkarıldıktan sonra kalıbın negatifi bir şekle sahip olan plastik yapı elde edilir.

Bu üç metot haricinde polimerik yapılar lazer ile de şekillendirilebilmektedirler. Birkaç mikronluk çözünürlüklere inilebilen bu yöntemler ile oldukça düzgün yapılar elde edilebilmektedir.

Fotolitografik Polimerizasyon

Son yıllarda dikkat çeken polimerik mikrosistemlerin fabrikasyonunda kullanılan bir diğer yöntem de fotolitografik polimerizasyondur. Teknik fotopolimerizasyonu esas aldığından bir fotobaşlatıcı kullanımını zorunlu kılmaktadır. Bu teknikte de klasik fotolitografide olduğu gibi istenilen desen bir maske üzerine aktarılır. Daha sonra kullanılacak olan polimer yapının sıvı monomerleri, uygun çapraz bağlayıcılar ve fotobaşlatıcılar uygun oranlarda karıştırılarak üzerleri arzu edilen deseni taşıyan maske ile kapatıldıktan sonra uygun ortamlarda (hava, azot gibi çeşitli ortamlar) belli sürelerde UV ışığa maruz bırakılır. Sonuçta maskenin altından ışığı gören kısım çapraz bağlanarak polimerleşecek, ışığı görmeyen kısımlar polimerleşmeden kalacaktır. Uygun çözücüler kullanılarak kalan sıvı monomerler uzaklaştırıldığında istenilen desen elde edilecektir. Bu yöntem literatürde “Temaslı Sıvı Fotolitografik Fotopolimerizasyon” (Contact Liquid Photolithographic Photopolymerisation, CLiPP) yöntemi olarak geçmektedir. (Haraldsson, 2006; Hutchison ve Haraldsson, 2004)

CLiPP yönteminin adımları Şekil 2.12.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.12. CLIPP yönteminin basamakları (a) ve (b) Sıvı monomer karışımı yüzeye dökülür (b) Fotomaske yüzeye yerleştirilerek 365 nm dalga boyunda UV ışık radyasyonuna maruz bırakılır. (d) Maske yüzeyden ayrılır (e) Polimerleşmeyen kısımlar uzaklaştırılarak mikro kanallar elde edilir.

2.6.4 Mikroakışkan Sistemlerin Başlıca Avantajları

Mikroakışkan kanallı sistemleri kullanmanın beraberinde getireceği avantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir (Lai, 2003; Haraldsson, 2005):

- Kullanılan kimyasal sarfiyatının ve atık üretiminin kayda değer olarak azalması
- Her bir analiz başına maliyetin azalması
- Çok kısa sürede (saniye, dakika vs.) sonuç alınması
- Makro çevrede mümkün olmayacak denemelerin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaları
- Kimyasal reaksiyon esnasında reaksiyon koşullarının daha hatasız olarak sağlanabilmesi
- Taşınabilir analiz sistemleri olmaları
- Isı transfer uygulamalarında sistemin minyatürlüğünden kaynaklanan çok hızlı ısı transferleri ve daha homojen bir sıcaklık dağılımı
- Sürekli laminar akış

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar 3 ayrı bölümden oluşmaktadır. Bu çalışmalar ile çalışmalardan elde edilmesi amaçlanan çıktılar ana başlıklar halinde verilmiştir.

Mikroakışkan Kanalların Oluşturulması: Bu kısımda öncelikle cam slaytların uygun çalışma şartlarını ve TIRE yöntemi için uygun optik geçirgenliği sağlayacak şekilde, silikon ve/veya akrilat esaslı polimer üst yapı oluşturmak için monomerleri ile kaplanması amaçlanmıştır. Polimerlerin sentez sonrası şişme özellikleri, yüzey uç gruplarının karakterizasyonu ve yüzey hidrofiliği (temas açıları) gibi özellikleri incelenecek ve en uygun özelliklere sahip olanlar ilerideki aşamalarda kullanılmak üzere seçilecektir. İstenilen kalınlıkta, homojen ve yeterli mekanik sağlamlık ve sertlikte film oluşturmak üzere, polimer konsantrasyonu ve polimerizasyon süresi optimize edilecektir. Polimerin optik-mekanik özelliklerine etki eden en önemli değişken olan çapraz bağlanma miktarının polimer filme etkileri araştırılacak/optimize edilecektir. Silikon yüzeyler uygun prosedür ile temizlendikten sonra dönel kaplama sistemi ile istenen kanal derinliğine ulaşacak kalınlıkta ışığa duyarlı negatif veya pozitif malzeme (fotorezist) ile kaplanacak, kanal tasarımına göre hazırlanmış foto maskeler yüzeylerin üzerine yerleştirilecek ve UV ve/veya mavi ışık radyasyonu ile polimerik tabakanın istenilen desenlemeyi oluşturacak şekilde seçimli çapraz bağlanması sağlanacaktır. Uygun çözücüler kullanılarak kalıp elde edilecektir. Daha sonra kanal yapımında kullanılacak olan elastomer, kalıp üzerine dökülecek ve çapraz bağlandıktan sonra kalıptan ayrılarak mikroakışkan kanallar elde edilmiş olacaktır. Kanalların üst tarafları önceden hazırlanan polimer kaplı cam slaytlar ile uygun yöntem ile kapatılarak sonraki adımlarda kullanılmak üzere mikroakışkan kanallı platformlar hazırlanacaktır. Bir diğer yöntem olan CLiPP metodu ile de mikrokanallar oluşturulacaktır. Bu kısımda öncelikle cam slaytlar, silikon ve/veya akrilat esaslı polimerlerin sıvı monomerleri ile istenilen mikrokanal derinliğini sağlayacak şekilde (<200 µm) kaplanacaktır. Kanal tasarımına göre hazırlanmış foto maskeler yüzeylerin üzerine yerleştirilecek ve UV ve/veya mavi ışık radyasyonu ile polimerik tabakanın istenilen desenlemeyi (mikrokanalları) oluşturacak şekilde seçimli çapraz bağlanması sağlanacaktır. Çapraz bağlanmayan bölgeler uygun çözücüler kullanılarak uzaklaştırılacak ve kanallar elde edilecektir. Kanalların üst tarafları kapatılarak sonraki adımlarda kullanılmak üzere mikroakışkanlı platformlar

hazırlanacaktır. Kanalların boyutları ve kapiler akış, çeşitli görüntüleme yöntemleri yardımıyla belirlenecektir.

Mikroakış Kanallarına Prob İmmobilizasyonu: Bu kısımda akış kanallarının duvarlarının uygun yüzeylerine array platformunu oluşturmak üzere prob moleküllerin immobilizasyonu gerçekleştirilecektir. Hazırlanmış olan array platformunun kanallarına, kanal içerisinde uygun bölgelere Albumin (Human Serum Albumin, HSA) ve/veya Protein A prob molekülleri yerleştirilecektir. Bu modifikasyonlar elipsometre yöntemi ile izlenecek, değişimler belirlenecektir.

Mikroakışkan Kanallı Sensörlerin Performanslarının Belirlenmesi: Elde edilen array platformlarının elipsometre ve/veya içten tam yansımali elipsometre düzenekleri kullanılarak performansları belirlenecektir. Farklı miktarlarda anti-albumin (anti-HSA, aHSA) ve/veya Immunoglobulin G (IgG) içeren sulu çözeltilerin mikroakışkan kanallı arraylerden akışı sağlanacak ve in-situ ölçümler gerçekleştirilecektir. Arraylerin seçiciliği ve hassasiyet sınırları belirlenerek en uygun array platform tasarımı ve uygulama protokolu tanımlanarak çalışma sonuçlandırılacaktır.

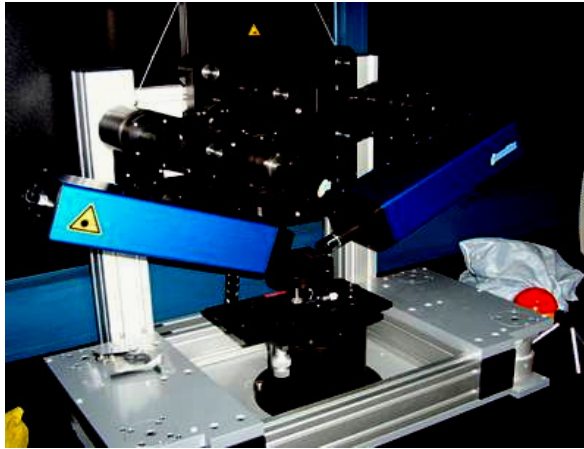
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasal maddeler ve elipsometrik sensör yüzeylerinin kurutulduğu ayrıca foto polimerizasyonun gerçekleştirildiği ortamda kullanılan azot gazı yüksek saflıkta olup satın alma yolu ile temin edilmiştir. Azot gazı BOS firmasından alınmıştır. Protein A (Sigma), HIgG (Sigma), Albumin (Sigma) ve anti-Albumin antikoru (Sigma) analitik saflıktadır. Polimer sentezinde kullanılan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), glisidil metakrilat (GMA) monomerleri (Sigma), çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) monomeri (Sigma), başlatıcı olarak kullanılan 2,2-dimetoksi-2-fenil-asetofenon (DMPAP) (Sigma), fotolitografi uygulamalarında kullanılan ışığa duyarlı malzemeler (fotorezist) (Sigma), tek tabaka oluşumunda kullanılan 3-aminopropiltrioksisilan (APTS) molekülü (Photoresist Kit, Sigma; Positiv 20 Resist, Cramolin), silikon elastomer kiti (Sylgard 184, Dow Corning) satın alma yoluyla temin edilmiş ve ilave saflaştırma işlemi yapılmadan kullanılmıştır. Cam slaytların temizliğinde Sigma-Aldrich tarafından temin

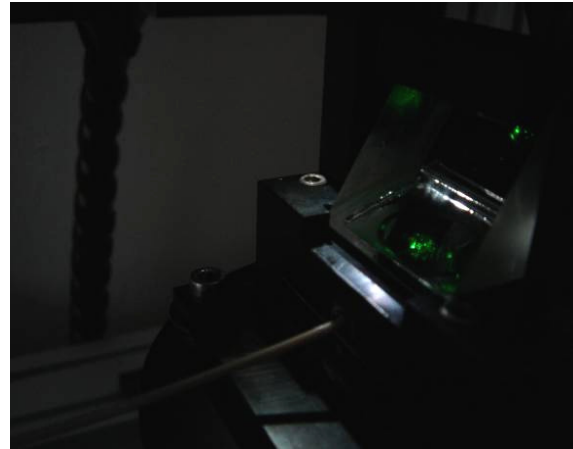
edilen, hidrojen peroksit (H_2O_2) (% 30 v/v), hidroklorik asit (HCl) (% 37,8 v/v), nitrik asit (HNO_3) ve etil alkol- C_2H_5OH (% 99 v/v) kullanılmıştır. Tüm deneyler boyunca tampon çözelti ve yıkama işlemleri için direnci 18 M Ω /cm olan yüksek saflıkta deiyonize su (DI H_2O) kullanılmıştır.

Slayt yüzeyleri hazırlanırken temizleme ve oksitleme işlemi için hava ve oksijen plazma sistemi (Diener Electronics, ABD) kullanılmıştır. Yüzeylerin temas açısı ölçümleri KSV CAM101 (KSV Instruments, Finlandiya) optik temas açısı ölçüm cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Polimer yüzeylerin karakterizasyonunda Thermo Scientific marka NicoletTM 6700 FT-IR cihazı kullanılmıştır.

Hazırlanan yüzeylerin üç boyutlu elipsometrik görüntüleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre cihazı (Nanofilm, EP3SW, Almanya) kullanılarak elde edilmiştir. Protein moleküllerinin immobilizasyonu ve etkileşimi ise aynı cihazın akış hücresi kullanılarak, içten tam yansımali elipsometri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elipsometre akış hücresine istenilen hızda akış verebilmek için ISMATEC (MCP-Process IP 65, Württemberg, Almanya) marka peristaltik pompa, uygun silikon ve teflon hortumlar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan elipsometre cihazı ve akış hücresi Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



(a)

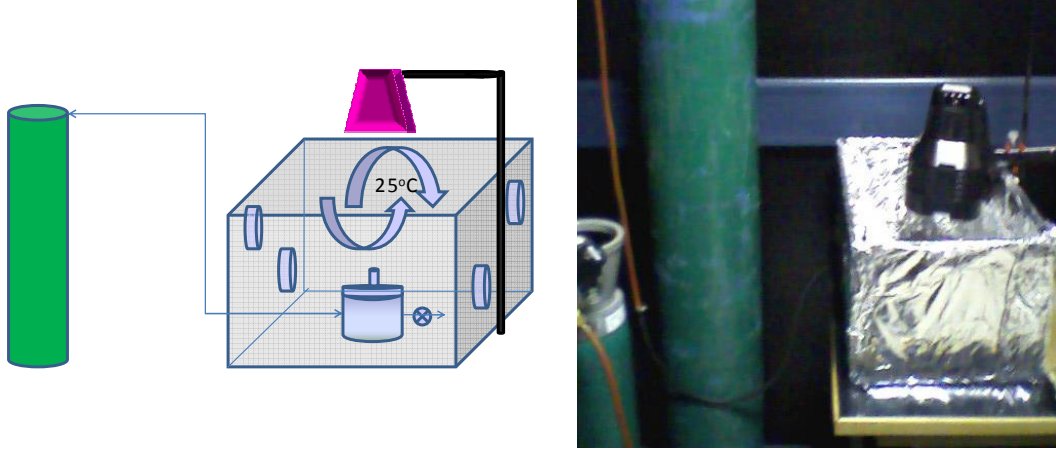


(b)

Şekil 3.1. (a) Elipsometre cihazı (b)TIRE için optik düzen

Oluşturulan mikrokanalların görüntülenmesinde Hitachi TM-1000 (İngiltere) marka mikroskop ve elipsometre cihazı üzerindeki CCD kamera kullanılmıştır. Fotolitografi

işlemlerinde UV ışık kaynağı (Blak-Ray® B-100 UVP, LLC, A.B.D) kullanılmıştır. Fotolitografi sistemi laboratuarda hazırlanmış olup şematik gösterimi ile yapısı Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Kullanılan fotolitografi sistemi

3.2. Mikroakışkan Kanalların Oluşturulması

Tez çalışmasının bu bölümünde öncelikle gerekli cam slaytlar uygun boyutlarda kesilmiş, uygun yöntemler ile temizlenmiş ve gerekli yüzey modifikasyonları yapılarak hazır hale getirilmiştir. Daha sonra protein array platformlarının hazırlanması işleminde mikrokanallarda akış olabilmesi için kapiler etki oluşturmak amacıyla elastomerler ile üretilen mikrokanal sisteminin üst yapısını oluşturacak çapraz bağlı polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Polimerler çapraz bağlı olarak, sıvı monomerler ve fotobaşlatıcı kullanılarak, fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen çapraz bağlı polimerler monomer ve başlatıcı kalıntılarından arındırıldıktan sonra en uygun hacim ve çapraz bağlayıcı oranının seçilmesi için şişme deneyleri ve temas açısı ölçümleri zamana bağlı olarak gerçekleştirilmiş sonuçlar yorumlanarak en uygun oranlar belirlenmiştir.

Bu aşamanın ardından öncelikle istenilen desenlerde maskeler hazırlanmış ve mikro akış kanalı fabrikasyonu için gerekli olan kalıp fotolitografik yöntemlerle oluşturulmuştur. Kalıp üzerine elastomerik monomer karışımı dökülmüş, uygun koşullarda polimerleşme sağlanmıştır. Malzeme kalıptan ayrıldığında kalıptaki desenin tersi malzeme üzerinde oluşmuş, bu şekilde polimerik mikroakışkan kanallar

elde edilmiştir. Malzemenin üzeri yüzey modifikasyonları uygulanarak önceden hazırlanmış polimer filmler ile kapatılmış ve mikroakışkanlı platformlar elde edilmiştir. Mikroakışkan kanallarının oluşturulmasında bir başka metod olan “Temaslı Sıvı Fotolitografik Polimerizasyon” (Contact Liquid Photolithographic Photopolymerisation, CLiPP) metodu da alternatif bir yöntem olarak kullanılmıştır. Mikrokanal fabrikasyonunda en uygun yöntem, her iki metod ile oluşturulan kanalların elipsometrik ve mikroskopik görüntülerinin karşılaştırılması ile seçilmiştir. Optimum kanal boyutları da yine görüntülerin karşılaştırılması ile belirlenmiştir.

3.2.1. Cam Yüzeylerinin Temizlenmesi ve Modifikasyonu

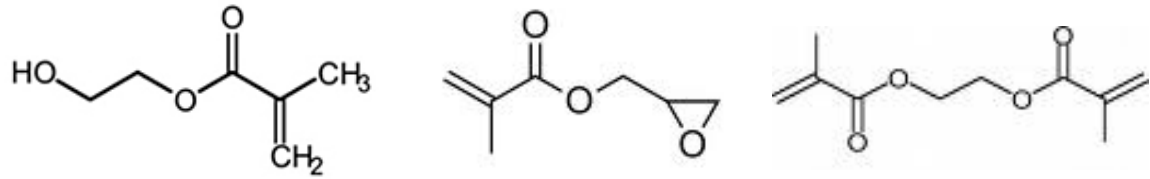
Biyosensör uygulamaları gibi hassas uygulamalarda kullanılacak olan sensör yüzeylerinin temizliği oldukça kritik bir konudur. Bu tip sistemlerde yüzeylerin hazırlanması, immobilizasyon, sinyal alma gibi basamaklarda sorun yaşamamak için, sensör yüzeyleri hazırlanmadan önce oldukça hassas bir biçimde temizlenmelidir. Bu amaçla kullanılacak olan cam slayt yüzeyleri organik ve inorganik kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla dikkatle temizlenmiştir. Temizlik için öncelikle slaytlar etil alkol ve yüksek saflıkta su ile birkaç kez banyo edilmiştir. Daha sonra yüzeydeki gözle görülemeyecek kir ve pürüzleri gidermek üzere slaytlar hacimsel olarak 1:3 oranında H₂O₂ (% 30 v/v) ve H₂SO₄ (%70) içeren çözeltiliye 1 - 5 dakika boyunca daldırılmış, takiben yüzeyler tekrar etil alkol ile durulanıp inert bir gaz olan azot ile kurutulmuştur. Ardından cam slaytlar 1:3 oranında derişik HNO₃ ve H₂O içeren asidik çözeltide 30 dakika boyunca kaynama sıcaklığı olan 80 °C’de bekletilmiştir. Bu işlem ardından etanol ile durulanan slaytlar yine azot püskürtülerek kurutulmuştur. Yüzey üzerinde kimyasal olarak bağlı organik moleküllerin uzaklaştırılması için slaytlar ön temizlemenin ardından 30 dakika boyunca oksijen plazmaya maruz bırakılmıştır. Plazmanın gücü 100 W olarak ayarlanmıştır.

Temizlemeden hemen sonra slaytlar tek tabaka oluşumu için yeterli derişim ve sürede hacimce %3'lük APTS çözeltilisine daldırılmış, 2 saatlik daldırma süresinin sonunda mutlak etanol ile durulanmış ve azot ile kurutulmuştur (Caglayan ve Otman, 2009). Burada amaç cam yüzeyler üzerinde APTS tektabaka oluşumunu sağlamak ve amin sonlandırılmış bir yüzey elde ederek daha sonraki basamaklarda polimer filmlerin sentezleneceği en uygun yüzeyi hazırlamaktır. APTS molekülü silan

grubundan cam yüzeylere bağlanırken amin grubu açıkta kalacak, çapraz bağlanma esnasında polimer filmlerin yüzeye bağlanmasını sağlayarak yüzey üzerinden kalkmalarını engelleyecektir.

3.2.2. Polimerlerin Sentez ve Karakterizasyonu

Öncelikle çapraz bağlı polimer filmler sentezlenmiştir. Bu amaç ile 2-Hidroksietil Metakrilat (HEMA) monomeri ve Glisidil Metakrilat (GMA) monomeri farklı hacim oranlarında karıştırılmış ve her bir numune üzerine farklı hacim oranlarında uygun çapraz bağlayıcı olan Etilen Glikol Dimetakrilat (EGDMA) eklenmiştir. (Şekil 3.3.)



Şekil 3.3. HEMA, GMA ve EGDMA yapısal formülleri

Bu işlemi takiben farklı hacim oranlarında monomer içeren her bir sıvı numuneye UV ışık radyasyonu ile foto-polimerizasyon için gerekli fotobaşlatıcı olan 2,2-dimetoksi-2-fenilasetofenon (DMPAP) ilave edilmiştir. Bu hacim oranları ve eklenen başlatıcı miktarları Çizelge 3.1.'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Monomer, çapraz bağlayıcı ve fotobaşlatıcı oranları

<u>HEMA (mL)</u>	<u>GMA (mL)</u>	<u>EGDMA (mL)</u>	<u>DMPAP (g)</u>
1,00	0	0,50	0,03
1,00	0	1,00	0,04
1,00	0	1,50	0,05
1,00	0	2,00	0,06
0,50	0,50	0,50	0,03
0,50	0,50	1,00	0,04
0,50	0,50	1,50	0,05
0,50	0,50	2,00	0,06
0,25	0,75	0,50	0,03
0,25	0,75	1,00	0,04
0,25	0,75	1,50	0,05
0,25	0,75	2,00	0,06
0	1,00	0,50	0,03
0	1,00	1,00	0,04
0	1,00	1,50	0,05
0	1,00	2,00	0,06

Elde edilen her bir numuneden alınan 200 µL'lik sıvı monomer karışımı önceden temizlenmiş ve yüzeyleri APTS ile modifiye edilmiş cam slaytlar üzerine mikropipet yardımı ile damlatılarak, üzerleri yüzey üzerinde homojen bir kalınlık sağlayabilmek amacıyla UV ışığı geçiren şeffaf bir maske ile kapatılmıştır. Bu maske sayesinde monomer karışımı yüzeye yayılmış, homojen bir kaplama oluşturmuştur. Bu slaytlar azot atmosferinde UV ışık radyasyonuna maruz bırakılarak çapraz bağlı polimer filmler sentezlenmiştir. Maruz bırakılma süresi (60 s - 360 s) optimize edilmiştir. Sentezlenen çapraz bağlı polimerler, monomer ve başlatıcı kalıntılarının uzaklaşması amacı ile etanol içerisinde bir hafta süre ile bekletilmiş, bu sürenin sonunda 40°C sıcaklıkta ve vakum altında 3 gün boyunca kurutulmuştur. Mikrokanal fabrikasyonunda literatürde en sık Polidimetilsiloksan (PDMS) polimerine rastlanmaktadır. Bu polimer ucuzluğu, görünür ve UV ışık geçirgenliği, hidrofobikliği, modifiye edilebilirliği, kolay fabrikasyonu ve çeşitli agresif ortamlara dayanımından ötürü sıklıkla tercih edilmektedir. Bu nedenle PDMS, mikrokanal üretiminde kullanılacak olan polimer olarak seçilmiştir. Bu polimerin sentezinde silikon elastomer kiti, Sylgard 184 (Dow Corning, ABD) kullanılmıştır. Sylgard 184 kiti, PDMS

monomeri, polimerin çapraz bağlanarak sertleşmesini sağlayacak olan çapraz bağlama ajanı ve çapraz bağlama ajanı ile PDMS monomerinin 1:10 oranında karışarak akmasını sağlayan bir sistemden oluşmaktadır. Kit içerisindeki sistem kullanılarak bir miktar PDMS ve çapraz bağlama ajanı, 10:1 oranında karıştırılmış, içerisindeki hava kabarcıkları 10 dakikalık bir vakum uygulaması ile giderilmiştir. Bunun ardından karışım, literatür bilgisi doğrultusunda 100 °C sıcaklıkta 1 saat süreyle bekletilerek çapraz bağlanma işlemi tamamlanmıştır.

3.2.2.1. Çapraz Bağlı Polimerlerin Sentezinde Çapraz Bağlayıcı Miktarının Şişme Derecesine Etkisinin İncelenmesi

Filmler tamamen kuruduktan sonra kuru ağırlıkları Sartorius CP 3245 marka hassas terazi kullanılarak ölçülmüş ve ardından her bir numune yüksek saflıkta deiyonize su içerisine daldırılmıştır. 10 dakika, 20 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 24 saat ve 1 hafta sonunda her bir numune tekrar tartılarak zamana karşı şişme dereceleri aşağıda belirtildiği şekilde (Eşitlik 3.1.) hesaplanmış, yüzde şişme oranları yine bu verilerden elde edilmiştir.

$$\text{Şişme Derecesi} = \frac{\text{Ölçülen Islak Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}}{\text{Kuru Ağırlık}} \quad (3.1)$$

Elde edilen şişme derecesi sonuçları diğer analizler ile beraber değerlendirilerek en uygun oranların belirlenmesinde yol gösterici olmuştur. PDMS için çapraz bağlama ajanı oranı sabit olduğundan şişme derecesi tayini yapılmamıştır.

3.2.2.2. Çapraz Bağlı Polimerlerin Sentezinde Çapraz Bağlayıcı Miktarının Temas Açısına Etkisinin İncelenmesi

Her bir çapraz bağlayıcı oranında sentezlenen her bir metakrilat numunesi için statik temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Her bir örnek üzerine dörder yüksek saflıkta su damlası bırakılıp her damlanın sağ, sol ve ortalama temas açısı değerleri ölçülmüş, her bir damla için bu değerlerin aritmetik ortalaması alınarak elde edilen sonuç numune için ortalama temas açısı değeri olarak kabul edilmiştir. Elde edilen bu temas açısı değerleri şişme dereceleri ile beraber yorumlanarak en uygun monomer,

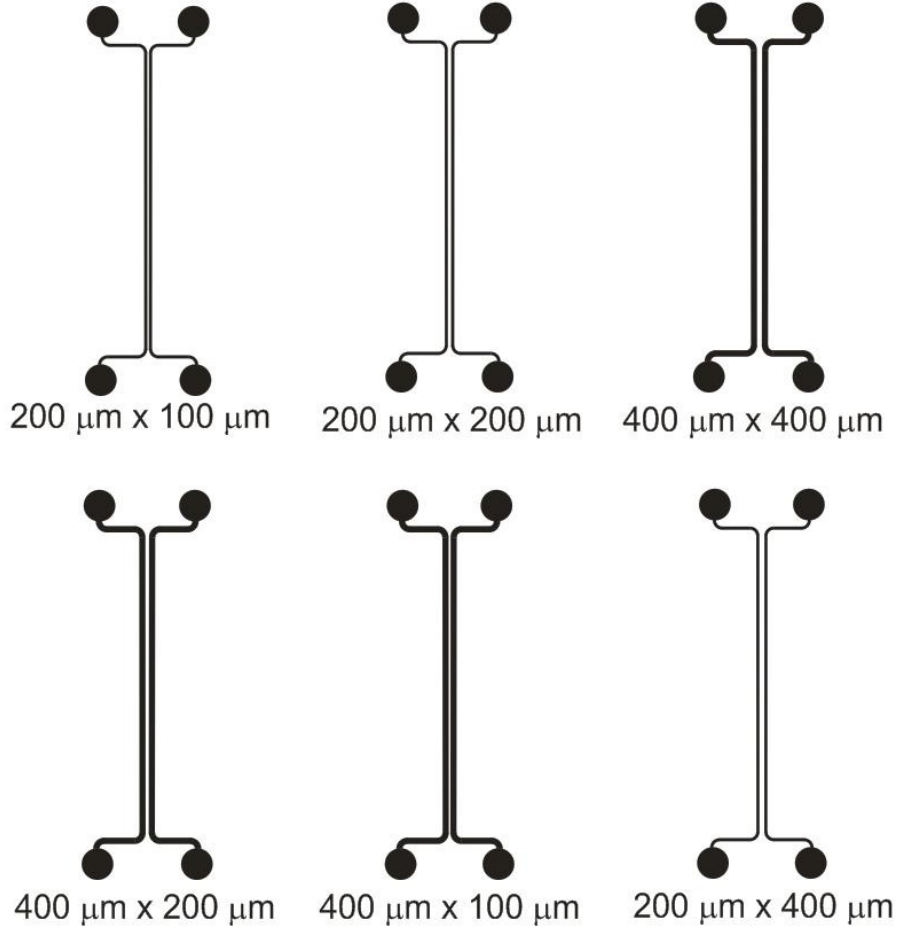
çapraz bağlayıcı ve başlatıcı oranları belirlenmiştir. Bununla beraber PDMS polimerinin de statik temas açısı belirlenmiştir.

3.2.2.3. Yüzey Analizleri

Hazırlanan metakrilat polimer film türlerinden en uygun olanı şişme dereceleri ve temas açıları göz önüne alınarak belirlenmiş, bu polimer için belirtilen çapraz bağlayıcı oranlarında filmler Bölüm 3.2.2.'de belirtilen prosedüre uygun olarak hazırlanmıştır. Filmler başlatıcı ve monomer kalıntılarından mutlak etanol içerisinde bir hafta süresince bekletilerek arındırılmış, daha sonra 40 °C sıcaklıkta 2 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutmanın hemen ardından filmler inert ortam yaratmak üzere azot gazı ile süpürülmüş bu süpürmenin hemen ardından Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflection (FT-IR-ATR) sistemi ile analiz edilmiştir. Bu teknikte azaltılmış tam yansıma (ATR) prensibi ile film yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar belirlenebilmektedir. Bu grupların monomer - çapraz bağlayıcı oranlarına göre değişimi yarı-kantitatif olarak yorumlanmıştır. Aynı şekilde bu grupların monomer oranları değiştikçe yüzey guruplarındaki nitel ve nicel değişimler de raporlanmıştır.

3.2.3. Fotomaske hazırlanması

İstenilen mikrokanal tasarımına uygun maskeler Windows temelli CorelDraw programı kullanılarak bilgisayar yardımı ile çizilmiştir. Çizimlerin film kağıdına yüksek çözünürlüklü baskıları alınmıştır. Şekil 3.4.'de hazırlanan fotomaske tasarımlarından bazıları gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Hazırlanan Fotomaske Tasarımları

3.2.4. Fotolitografik Yöntemler Kullanılarak Silikon Elastomer ile Mikrokanal Fabrikasyonu

Silikon plaka (wafer), etil alkol, metil alkol ve aseton ile iyice temizlendikten sonra azot gazı püskürtülerek kurutulmuş, görülemeyen inorganik, organik kirliliklerin uzaklaşması amacı ile 200 °C'ye ayarlanmış sıcak plaka üzerinde 15 dakika süresince bekletilmiştir. Işığa duyarlı malzemenin kaplanmasında Delta marka 92mmx38mm model 8000 rpm dönüş hızına sahip bir bilgisayar fanı ile ayarlı güç kaynağından ($\pm 0,1$ V ve $\pm 0,1$ A hassasiyetle ayarlanabilen) imal edilmiş el yapımı bir dönel kaplama sistemi kullanılmıştır. Oda sıcaklığına soğuyan plaka el yapımı dönel kaplama sisteminin ilgili kısmına yerleştirilmiş, üzerine 5 mL ışığa duyarlı malzeme damlatılmıştır. Güç kaynağı kullanılarak yaklaşık olarak 500 rpm döndürme hızına tekabül eden voltaj 5 saniye boyunca uygulanmış hemen ardından ise 8 Volt'a

arttırılarak 2000 rpm dönme hızına çıkılmış bu hızda numune 20 saniye daha döndürülmüştür (Minteer, 2006). Işığa duyarlı malzeme silikon plaka yüzeyin kaplandıktan sonra silikon plaka 10 dakika boyunca 80 °C sıcaklıktaki sıcak plakada pişirilmiş, ardından 85 °C sıcaklıktaki etüvde 10 dakika bekletilmiştir. Pişirme işlemi takiben fotomaske, plaka üzerine konumlandırılmış ve 20 cm uzaklıktan 1 dakika süre ile 365 nm dalga boyunda UV ışık radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Bu işlemin ardından yüzey 1 dakika boyunca 90 °C sıcaklıkta tekrar pişirilmiştir. Develope edici malzeme yüzey üzerine 40 saniye süre ile püskürtülmüş ve yüzey etil alkol ile banyo edilmiştir. Azot gazı ile kurutulan yüzey üzerinde istenilen desenleme elde edilmiştir (Minteer, 2006). Diğer tarafta Sylgard 184 kiti içerisindeki monomer ve çapraz bağlama ajanı 10:1 oranında karıştırılmıştır. Karışım dikkatli bir biçimde hazırlanan kalıp üzerine dökülmüştür. 10 dakika boyunca vakum uygulanarak hava kabarcıkları giderilmiş, 100 °C sıcaklıktaki fırında 1 saat süre ile çapraz bağlanma sağlanmıştır. PDMS, kalıptan dikkatli bir şekilde ayrılmış ve istenen mikrokanallar polimer üzerinde oluşturulmuştur. Polimer 1 dakika boyunca 100 W gücünde oksijen plazmaya maruz bırakılıp yüzeyde OH- gruplarının oluşması sağlanmış ve hemen ardından hacmen %1 lik APTS çözeltisine daldırılarak APTS'nin yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. 1 saatlik daldırma süresinin ardından polimer mutlak etanol ile yıkanmış, azot gazı ile kurutulmuştur (Lee, 2009; Minteer, 2006; Li, 2005; Wang, 2003). Epoksi içeren metakrilat bazlı polimer film üzerine APTS ile modifiye edilmiş PDMS yerleştirilmiş, oda sıcaklığında 1 saat süre ile adesif yüzey bağlanması sağlanarak mikrokanallar elde edilmiştir (Lee, 2009). Önceden delinmiş rezervuar kısımlarına uygun et kalınlığı ve uygun çapta ve 2 cm boyutunda kesilmiş silikon borular dik konumda yerleştirilerek örneklerin kanal içerisine gönderilmesini sağlayacak kısımlar oluşturulmuştur. Kanallar mikroskop yardımı ile görüntülenmiştir. Görüntüler yorumlanarak kanal boyutu optimize edilmiştir.

3.2.5. CLiPP Metodu ile Mikrokanal Fabrikasyonu

CLiPP metodu mikrofabrikasyon alanında çok yeni bir yöntemdir (Haraldsson, 2006; Hutchison ve Haraldsson, 2004). Bu yöntemde fotopolimerizasyon kullanılarak istenilen desenleme elde edilebilmektedir. Yöntem özetle şu şekildedir: Öncelikle sıvı monomerler ve çapraz bağlayıcıları istenilen oranlarda karıştırılır. Bu monomerlere mutlak suretle uygun bir fotobaşlatıcı eklenmelidir. Bu adımdan sonra sıvı karışım

rezervuar içerisine veya yüzey üzerine dökülür. İstenen şekilde tasarlanan fotomaskeler yüzey üzerine yerleştirilir ve malzemeler UV ışık radyasyonuna maruz bırakılır. Işığı gören bölgeler çapraz bağlanarak polimerleşir. Maske üzerindeki karanlık bölgelerden ise ışık geçmeyerek bu bölgeler polimerleşmeden kalır. Uygun çözücüler ile bu kısımlar yıkanarak monomer uzaklaştırıldığında istenilen mikro desenler elde edilir.

Tez çalışmasının bu bölümünde GMA monomeri, EGDMA çapraz bağlayıcı monomeri ile hacmen 1:1,5 oranında karıştırılarak 1 mL'lik bir karışım elde edilmiş, karışıma 0.03 g DMPAP eklenmiştir. Mikropipet ile alınan 200 µL karışım önceden APTS ile modifiye edilmiş cam yüzey üzerine damlatılmıştır. Karışımın yüzeyi istenilen fotomaske ile kapatılmış ve 120 saniye süresince UV ışık radyasyonuna maruz bırakılmıştır. Polimerleşmeyi takiben yüzeyler etil alkol ile yıkanıp azot gazı ile kurutulmuş ve istenen mikrokanallar elde edilmiştir. Mikrokanallar mikroskop yardımı ile görüntülenmiştir.

3.3. Polimerik Sensör Yüzeylerinin Hazırlanması

Çalışmanın bu bölümünde elipsometre esaslı polimerik sensör yüzeyleri hazırlanmıştır. Mikroakış kanallarına Albumin (Human Serum, HSA) ve Protein A molekülleri immobilize edilmiş, immobilizasyon kinetiği elipsometre sistemi kullanılarak incelenmiştir.

3.3.1. Mikroakış Kanallarına Albumin Prob İmmobilizasyonu

Hazırlanan polimerik mikroakışkan kanallı platformlar 1 gece boyunca pH 7,4'lük PBS tampon çözeltisi içerisinde bekletilerek şişme dengesine gelmeleri sağlanmıştır. Platformlar elipsometre cihazının akış hücreğine yerleştirilmiş, kapiler boru sistemi düzenlenmiştir. Kanallara öncelikle 10 dakika boyunca fosfat tamponu (PBS, pH 7,4) gönderilmiş, takiben PBS tamponu ile hazırlanan farklı derişimlerde (5 nM – 500 nM) Albumin çözeltisi 180 dakika süre ile gönderilmiştir. Kanal içerisinde Albumin, GMA yüzeyine epoksi – amin etkileşimi sonucu bağlanmış, bağlanma kinetiği elipsometre ile gözlemlenmiştir. Bu veriler ile optimum Albumin konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.3.2. Mikroakış Kanallarına Protein A Prob İmmobilizasyonu

Hazırlanan polimerik mikroakışkan kanallı platformlar 1 gece boyunca PBS tampon çözelti (pH 7,4) içerisinde bekletildikten sonra akış hücresine yerleştirilmiş, kapiler boru sistemi düzenlenmiştir. Kanallara sırasıyla 10 dakika boyunca fosfat tamponu (PBS, pH 7,4) gönderilmiş, takiben PBS tamponu ile hazırlanan farklı derişimlerde (10 nM – 500 nM) Protein A çözeltisi 65 dakika süresince gönderilmiştir. Kanal içerisinde Protein A molekölü GMA yüzeyine epoksi – amin etkileşimi sonucu bağlanmış, bağlanma kinetiği elipsometre ile gözlemlenmiş, optimum Protein A konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.4. Array Platformlarının Performanslarının Belirlenmesi

Bu aşamada Albumin ve Protein A immobilize edilmiş kanallar içerisinde anti-Albumin ve IgG çözeltileri gönderilerek hazırlanan mikroakışkan kanallı array platformlarının seçicilik ve performansları değerlendirilmiş ve optimize edilmiştir.

3.4.1. Mikroakış Kanallı Albumin Sensörünün Performansının Belirlenmesi

Optimum konsantrasyon ile hazırlanan Albumin platformları elipsometre akış hücresine yerleştirilmiş, 10 dakika boyunca PBS (pH 7,4) tamponu gönderilmiştir. Takiben farklı derişimlerde (5 nM – 500 nM) anti-Albumin çözeltisi gönderilerek Albumin – anti-Albumin etkileşimi 125 dakika boyunca incelenmiştir. Etkileşim sonucu elipsometre ile incelenerek hazırlanan Albumin sensörünün performansı belirlenmiştir. Sensöre spesifik olmayan protein molekülleri gönderilerek sensör seçiciliği kontrol edilmiştir.

3.4.2. Mikroakış Kanallı Protein A Sensörünün Performansının Belirlenmesi

Optimum konsantrasyon ile hazırlanan Protein A platformları elipsometre akış hücresine yerleştirilmiş, 10 dakika boyunca PBS tamponu (pH 7,4) gönderilmiştir. Takiben farklı derişimlerde (10 nM – 500 nM) IgG çözeltisi gönderilerek Protein A – IgG etkileşimi 65 dakika boyunca incelenmiştir. Elipsometre ile etkileşim verileri alınmış, bu veriler incelenerek hazırlanan Protein A sensörünün tayin sınırları

belirlenmiştir. Sensöre spesifik olmayan protein molekülleri gönderilerek sensör seçiciliği teyid edilmiştir.

3.4.3. Mikroakış Kanallı Albumin ve Protein A Array Platformlarının Performansının Belirlenmesi

Tez kapsamında bu bölümde belirlenen optimum sonuçlar yardımı ile array platformları tasarlanmıştır. Belirlenen optimum konsantrasyonlarda protein çözeltileri ile elipsometrik sensör cevapları incelenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Protein array platformları çok sayıda proteinin aynı anda tayin edilebilmesine olanak sağlayan sistemlerdir. Kaldı ki bu platformlar minyatürleştirilmiş sistemler ise hem düşük maliyet, hem hızlı cevap alma, hem de örnek hacmi çok düşük olsa dahi tayin edilebilirlik gibi bir takım avantajları beraberinde getireceği için tercih edileceklerdir. Minyatürleştirme ile birlikte pek çok konuda olduğu gibi array platformları alanında da oldukça önemli gelişmeler sağlanmıştır. Örneğin bir proteinin tanısı, klinik araştırmalarda uzun süreler alıyor ve maliyetli oluyorken, mikro boyutlu bir protein tanı kitinin kullanılması ile hem tanı çok kısa sürede gerçekleşebilmekte, hem maliyet kayda değer oranda düşmekte, hem de kullanılan kimyasal miktarları önemli ölçüde azalmaktadır. Mikro sistemlerin gelişmesi ile birlikte mikroakışkan kanallarının klinik alanda kullanımları da söz konusu olmaya başlamıştır. Biyoçip teknolojilerindeki en önemli gelişmelerden biri de mikroakışkan kanallı sistemlerin geliştirilmesidir. Özellikle son yıllarda bu sistemler dikkatleri üzerlerine çekmiş, bu alanda yapılan araştırmaların sayısı ciddi bir artış göstermiştir. Biyoyumluluğa sahip olan çeşitli malzemeler kullanılarak, birçok analiz yöntemi ile birleştirilebilecek mikro kanallara sahip protein çipleri üretilebilir. Bu çipler ile protein-protein, protein-DNA gibi etkileşimleri izlemek mümkündür. En vurucu özellikleri ise kolay bir fabrikasyon ile beraber paralel ölçümlerin aynı anda tamamlanabilmesine olanak tanımalarıdır. Bu tip protein array platformlarının üretiminde önemli bir basamak da kullanılan malzemelerin yüzey özelliklerinin istenilen şekilde ayarlanmasıdır. Bu yüzeylere istenilen prob moleküller immobilize edilerek sensör yüzeyleri hazırlanacağından yüzey üzerinde inorganik veya organik kirliliklerin bulunmaması, yüzeylerin biyoyumlulukları, yüzey üzerindeki moleküllerin amino, epoksi veya tiyol gruplarından protein moleküllerinin kovalent bağlanmasını etkileyen önemli parametrelerdir. Bunun yanı sıra mikroakışkan kanalları kullanan platformlarda bir diğer önemli parametre, kanal içi yüzeylerin hidrofilik ya da hidrofobik olup olmadıklarıdır. Yüzeylerin suya karşı olan afiniteleri kanal içerisindeki akış profilini etkileyeceği gibi protein etkileşimlerini de ciddi anlamda etkilemektedir (Horbett ve Brash, 1995). İçten tam yansıma sistemini kullanan elipsometrik yöntem yani TIRE (Total Internal Reflection Ellipsometry) tekniği, moleküler etkileşimlerin eş zamanlı olarak incelenmesini sağlayan oldukça kuvvetli bir tekniktir. Bu teknik ile mikroakışkan sistemler birleştirilebilir ve protein sensörleri tasarlanabilir. Tez

çalışmasının bu bölümünde çeşitli polimerik malzemeler ile mikroakış kanalları üretilmiş, bu kanallar içerisine protein immobilizasyonu gözlemlenmiş ve TIRE esaslı, mikro akış kanallı, array platformları tasarlanmış/geliştirilmiş, daha sonra hazırlanan bu platformların performansları, kullanılabilirlikleri ve tayin sınırları belirlenmiştir. Mikroakış kanallarının üretimi için metakrilik polimerler olan çapraz bağlı 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve Glisidil metakrilat (GMA) ile silikon bazlı PDMS polimerlerinin kullanılabileceği öngörülmüştür. Bu polimerlerin kompozisyonları çeşitli ölçümler ile optimize edilmiştir. Uygun mikrokanal tasarımı belirlendikten sonra akış kanallı platformlar üretilmiş, kanal içerisindeki uygun yüzeylere Albumin ve Protein A immobilizasyonu gerçekleştirilerek platformlar hazırlanmıştır. Optimum immobilizasyon koşulları belirlenmiştir. Bu platformlar sensör yüzeyi olarak kullanılmış, anti-Albumin ve IgG molekülleri ile spesifik etkileşimler TIRE yöntemi ile gözlemlenmiştir.

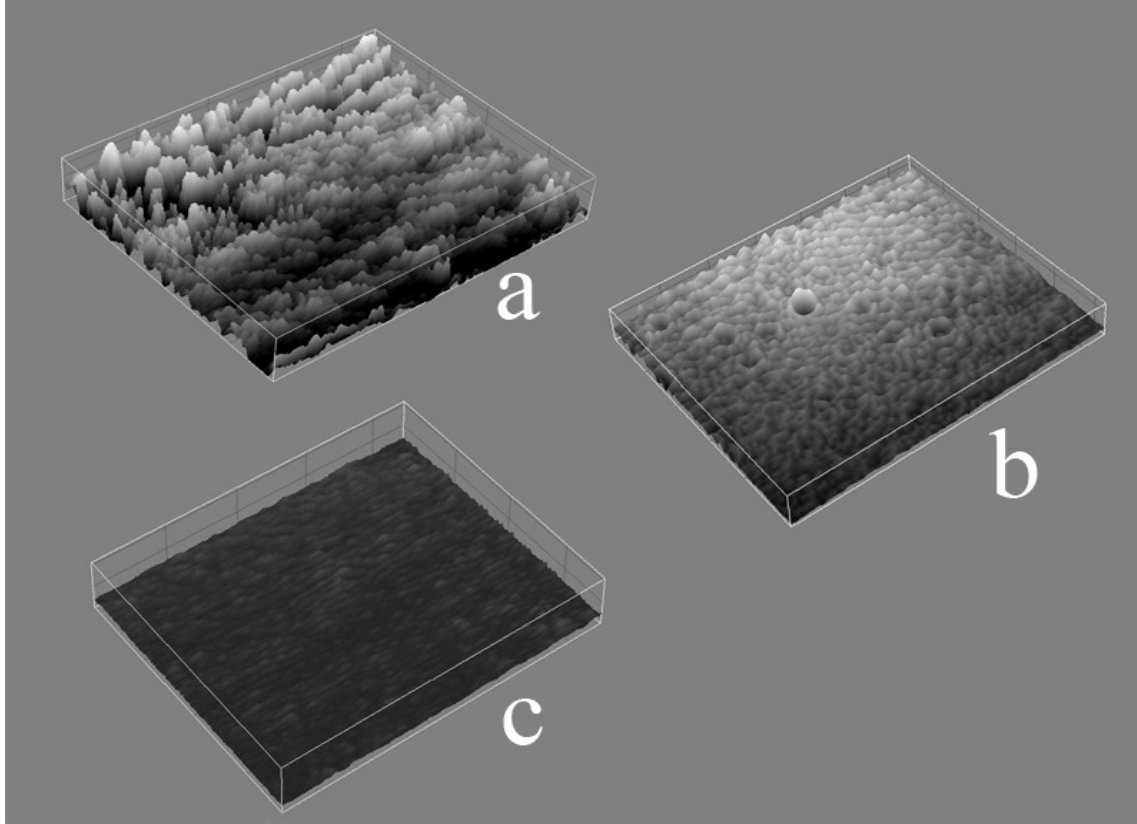
4.1. Mikroakışkan Kanalların Oluşturulması

Bu aşamada öncelikli olarak seçilen polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Polimer filmler cam slaytlar üzerinde sentezlenmiştir. Sentez öncesinde cam slaytlar uygun yöntemler ile temizlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin şişme dereceleri ve temas açıları belirlenmiştir. Daha sonra en uygun polimer ve/veya polimer bileşimi seçilmiş, mikrokanallar iki farklı fotolitografik yöntem ile elde edilmiştir.

4.1.1 Cam Yüzeylerin Temizlenmesi ve Modifikasyonu

Bu aşamada birkaç kez etil alkol ve su ile yıkanan cam yüzeyler hacimsel olarak 1:3 oranında H_2O_2 (% 30 v/v) ve H_2SO_4 (%70) içeren çözeltiye 1 dakika boyunca daldırılmış, takiben tekrar etil alkol ile durulanıp inert bir gaz olan azot ile kurutulmuştur. Ardından yüzeyler 1:3 oranında derişik HNO_3 ve H_2O içeren asidik çözeltide 30 dakika boyunca 80 °C'de bekletilmiştir. Tekrar etanol ile yıkanıp kurutulduktan sonra 30 dakika süre ile 100 W'lık oksijen plazma maruz bırakılarak temizlenmiştir. Plazma sisteminde, fiziksel sınırlamalardan ötürü, gücün 50 W 'dan daha düşük olması oldukça zor sağlanan bir durumdur. Bu durumda plazma kararsız hale gelmektedir. 100 W üzerinde çalışılması ise cihazın fiziksel olarak zarar

görmesini sağlayabilir. Bu nedenle 100 W uygun bir değer olarak alınmıştır. Temizleme öncesi ve sonrasında görüntülenen cam yüzeyler Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Boş cam slayt yüzeylerinin 3 boyutlu elipsometrik görüntüleri a) Temizleme işleminden önce b) Nitrik asit çözeltisi ile kaynatıldıktan sonra c) Plazma işleminden sonra

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü üzere temizleme işleminden önce cam yüzey üzerindeki kirlilik ve pürüzlülük oldukça yoğundur. Asidik ortamda kirliliklerin giderilmesi sonucu bir miktar temizlenme sağlanmış yüzey pürüzlülüğü kayda değer biçimde giderilmiştir. Ancak asit temizlemesinin yeterli olmadığı kimyasal olarak yüzeye tutunmuş kontaminasyonların tamamen giderilmesi plazma ile temizleme sonucunda gerçekleşmiştir.

Temizlenen yüzeyler plazma ile oksitleme işleminin hemen ardından %3'lük APTS çözeltisine 2 saat süresince daldırılmış, ardından mutlak etanol ile durulanıp azot ile kurutulmuştur. Temizliğin son aşamasında mutlak etanol kullanımı zorunludur. APTS

molekölü su varlığında polimerleşerek kendiliğinden düzenlenen tek tabaka oluşumunu bozmakta, istenilen modifikasyonu engellemektedir. APTS ile modifiye edilmiş yüzeyler, modifikasyon işleminin hemen ardından inert bir ortama koyulmalıdır. Hava ortamındaki nemden ve tozlardan ötürü istenilen modifikasyon bozulabilmektedir. APTS moleküllerinin tek tabaka oluşturmak üzere kendiliğinden düzenlenmesi için gerekli olan derişim ve daldırma süresi grubumuzca yapılan bir çalışma ile optimize edilmiştir (Çağlayan ve Otman, 2009; Garıpcan, 2008).

4.1.2 Polimer Sentez ve Karakterizasyonu

Seçilen polimerlerden olan HEMA monomeri hiç kullanılmamış dört adet temiz deney tüpünün her birinin içerisine 1 mL hacimde damlatılmıştır. Üzerlerine hacimleri sırası ile 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL ve 2,0 mL olmak üzere çapraz bağlayıcı olan EGDMA monomeri eklenmiştir. Tüplere sırası ile 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g ve 0,06 g ağırlıklarında fotobaşlatıcı olan DMPAP eklenmiştir. Tüpler sırası ile A, B, C ve D olarak isimlendirilmiştir. Bir diğer monomer olan GMA monomeri de hiç kullanılmamış dört adet temiz deney tüpünün her birinin içerisine 1 mL hacimde damlatılmıştır. Bu tüplere de sırası ile 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL ve 2,0 mL olmak üzere EGDMA monomeri eklenmiştir. Tüplere sırası ile 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g ve 0,06 g ağırlıklarında fotobaşlatıcı olan eklenmiştir. Bu tüpler ise E, F, G ve H olarak isimlendirilmiştir. HEMA ve GMA karışımları için ise öncelikle 0,5 mL HEMA dört temiz tüpe damlatılmış, her bir tüpe 0,5 mL GMA eklenmiştir. Tüplere sıra ile 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL ve 2,0 mL EGDMA monomeri ilave edilmiştir. Sırayla 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g ve 0,06 g ağırlıklarında fotobaşlatıcı koyulmuştur. Tüpler I, J, K, L olarak isimlendirilmiştir. Son olarak her bir tüpe 0,25 mL HEMA eklenip, 0,75 mL GMA ilave edilen dört adet tüpe 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL ve 2,0 mL EGDMA monomeri koyulmuş, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g ve 0,06 g ağırlıklarında fotobaşlatıcı eklenmiştir. Bu tüpler ise M, N, O ve P olarak isimlendirilmiştir Her bir tüp başlatıcınının homojen olarak çözünmesi için 10 saniye ultrasonik banyo içerisine daldırılıp, 5 dakika boyunca köpürmesine izin vermeden, hafifçe çalkalanarak karışımlar elde edilmiştir.

Temizlenmiş ve APTS ile modifiye edilmiş cam slaytlar fotolitografi ünitesinin numune haznesine yerleştirilmiştir. Hemen ardından A karışımından alınan 200 µL hacmindeki karışım yüzey üzerine damlatılmıştır. Üzerine şeffaf ve UV geçirgen film

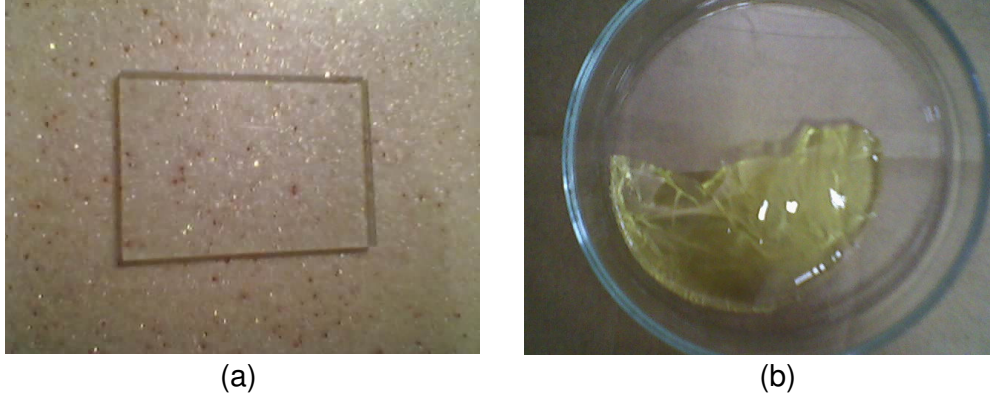
kağıdı kapatılarak karışımın ince bir film halinde tüm yüzeye yayılması sağlanmıştır. Ünitenin kapağı kapatılarak azot gazı açılmış ve inert ortam oluşturulmuş, sıcaklık artışını engellemek üzere kurulan sistem çalıştırılmıştır. Monomer karışımları UV ışık radyasyonuna 60 saniye boyunca, 10 cm uzaklıktan maruz bırakılmıştır. 60 saniyenin sonunda her bir slayt üzerinde jelimsi bir sıvı görülmüştür. Böylelikle 60 saniyelik UV radyasyonunun tam bir çapraz bağlanma için yeterli olmayacağı düşünülmüş süre uzatılmıştır. İkinci bir deneme, aynı sistemi 90 saniye boyunca yine 10 cm uzaklıktan UV ışığa maruz bırakma ile yapılmıştır. 90 saniyenin ardından yüzeylerde bir önceki denemeye göre daha sert bir katı tabaka oluşmuştur ancak bu sürenin polimerizasyon ve çapraz bağlanma için yeterli olmadığı az miktarda jelimsi kalıntının görülmesinden dolayı açıkça bellidir. Bir sonraki polimerizasyonda UV ışığa maruz bırakma süresi 120 saniyeye çıkarılmıştır. Bu sürenin sonunda cam slayt yüzeyi üzerinde pürüzsüz ve tamamen katı bir polimerik film tabakası gözlemlenmiştir. Son olarak denenen 360 saniye deney süresi sonucunda ise yüzeydeki polimer film sertleşmiş ancak film üzerinde bir takım çatlaklar görülmüştür. Aynı işlemler tüm karışımlar için tekrarlanmıştır. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, her bir karışımda benzer bir eğilim gözlemlenmiş ve böylece UV ışığa maruz bırakma süresi 120 saniye olarak optimize edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. UV ışığa maruz bırakma süresi ile çapraz bağlı polimer eldesinde polimer tabakanın görünüşünün değerlendirilmesi.

UV ışığa maruz bırakma süresi (s)	Polimer tabakanın görünüşü
60	Her bir polimer karışımında tamamen jelimsi sıvı görülmüştür, polimer sertleşmesi söz konusu değildir.
90	Her bir polimer karışımında bir miktar jelimsi sıvı bir miktar film gözlemlenmiştir. Polimerleşme kısmen gerçekleşmiştir
120	Her bir monomer polimer karışımı tamamen pürüzsüz sert film halindedir, çaprazbağlı polimer film oluşturmuştur
360	Polimer filmler oluşmuştur ancak yüzeyde bozukluklar, pürüzler, çatlaklar söz konusudur

120 saniyeden daha kısa UV ışığa maruz bırakılan örneklerde yeterli polimerleşme gerçekleşmiştir. 120 saniyenin üzerindeki sürelerde ise UV radyasyon miktarının

artması, alt tabakada bulunan APTS moleküllerini etkilemiş ve oluşan katı polimer filmin yüzeyden kalkmasına neden olmuş olabilir. 360 saniye süresince polimerleştirilmiş HEMA film yüzeyi Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Burada görüldüğü gibi düzgün bir film oluşmamış, bir kısım pürüzler ve çatlaklar oluşmuştur.



Şekil 4.2. Farklı sürelerde UV ışığa maruz bırakılmış çapraz bağlı polimerler (a) 120 Saniye süre ile UV ışığa maruz bırakılmış çapraz bağlı GMA polimeri (b) 360 Saniye süre ile UV ışığa maruz bırakılmış çapraz bağlı HEMA polimeri

UV ışına maruz bırakma süresinin 120 saniye olarak optimize edilmesinden sonra polimer filmlerin sentezlenmesi işlemi optimize edilmiştir. Her bir karışım azot atmosferinde, APTS ile modifiye edilmiş slaytlar üzerinde film halinde yayılarak, 120 saniye boyunca UV ışık radyasyonu ile çapraz bağlanarak polimerleştirilmiştir. Sentezlenen polimer filmlerin her biri uygun çözücüleri olan etil alkol içerisinde 1 hafta boyunca bekletilmiştir (Wang, 2005). Burada amaç sentezlenen çapraz bağlı polimer filmlerin içerisinde kalmış olabilecek monomer ve başlatıcı kalıntılarının uzaklaştırılmasıdır. Polimer filmler içerisinde monomer veya başlatıcı kalıntılarının olması sonraki aşamalarda protein immobilizasyonunu ve kanal fabrikasyonunu zorlaştırmaktadır. 1 haftalık sürenin sonunda polimerler vakum etüvünde 2 gün boyunca kurutularak çözücü sıvıdan arındırılmış ve nem içerikleri tamamen giderilmiştir.

Seçilen bir diğer polimer olan PDMS, kit halinde satın alındığından kitin kullanımının detaylı anlatımına literatürden ulaşılabildiği için herhangi bir optimizasyona gerek duyulmadan belirtilen şekilde sentezlenmiştir. Kit PDMS monomeri, çapraz bağlama ajanı ve bu karışımın 10:1 oranda birleşmesini sağlayan bir aparatтан oluşur. Aparat sayesinde 10:1 oranında karışarak akan PDMS ve çapraz bağlama ajanı temiz bir

plastik kap içerisinde karıştırılmış, alüminyum ile kaplanmış cam petri kabı içerisinde dökülmüştür. Bu aşamada içerisinde oldukça fazla miktarda hava kabarcığı mevcut olduğundan, giderimi için 10 dakika vakum ortamında bekletilmiştir. Vakum işleminin ardından karışım, çapraz bağlanmanın gerçekleşebilmesi için, 100 °C sıcaklıkta 1 saat boyunca pişirilmiştir. Elde edilen elastomer istenilen fiziksel esneklik ve sağlamlığa sahiptir.

4.1.2.1. Çapraz Bağlı Polimerlerin Sentezinde Çapraz Bağlayıcı Miktarının Şişme Derecesine Etkisinin İncelenmesi

Kurutularak tamamen nemden arındırılan polimer film numuneleri etüvden çıkarılarak kuru olarak hassas terazi yardımı ile tartılmıştır. Bu aşamada çalışma hava ortamında yapılmıştır. Polimerlere ait kuru ağırlık ölçümleri Çizelge 4.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen polimerlerin hassas terazi ile ölçülen kuru ağırlıkları

Polimer	HEMA – GMA Yüzdeleri ve Çapraz Bağlayıcı Oranları (Hacmen)	Kuru Ağırlık (g)
A	%100 HEMA , 1:0,5 EGDMA	1,3140
B	%100 HEMA , 1:1,0 EGDMA	1,9952
C	%100 HEMA , 1:1,5 EGDMA	1,2617
D	%100 HEMA , 1:2,0 EGDMA	1,4175
E	%100 GMA, 1:0,5 EGDMA	1,7466
F	%100 GMA, 1:1,0 EGDMA	1,7411
G	%100 GMA, 1:1,5 EGDMA	1,7467
H	%100 GMA, 1:2,0 EGDMA	1,7392
I	%50 HEMA , 1:0,5 EGDMA	1,1678
J	%50 HEMA , 1:1,0 EGDMA	1,0750
K	%50 HEMA , 1:1,5 EGDMA	2,2560
L	%50 HEMA , 1:2,0 EGDMA	0,8510
M	%25 HEMA , 1:0,5 EGDMA	1,2636
N	%25 HEMA , 1:1,0 EGDMA	1,3419
O	%25 HEMA , 1:1,5 EGDMA	1,1842
P	%25 HEMA , 1:2,0 EGDMA	1,2873

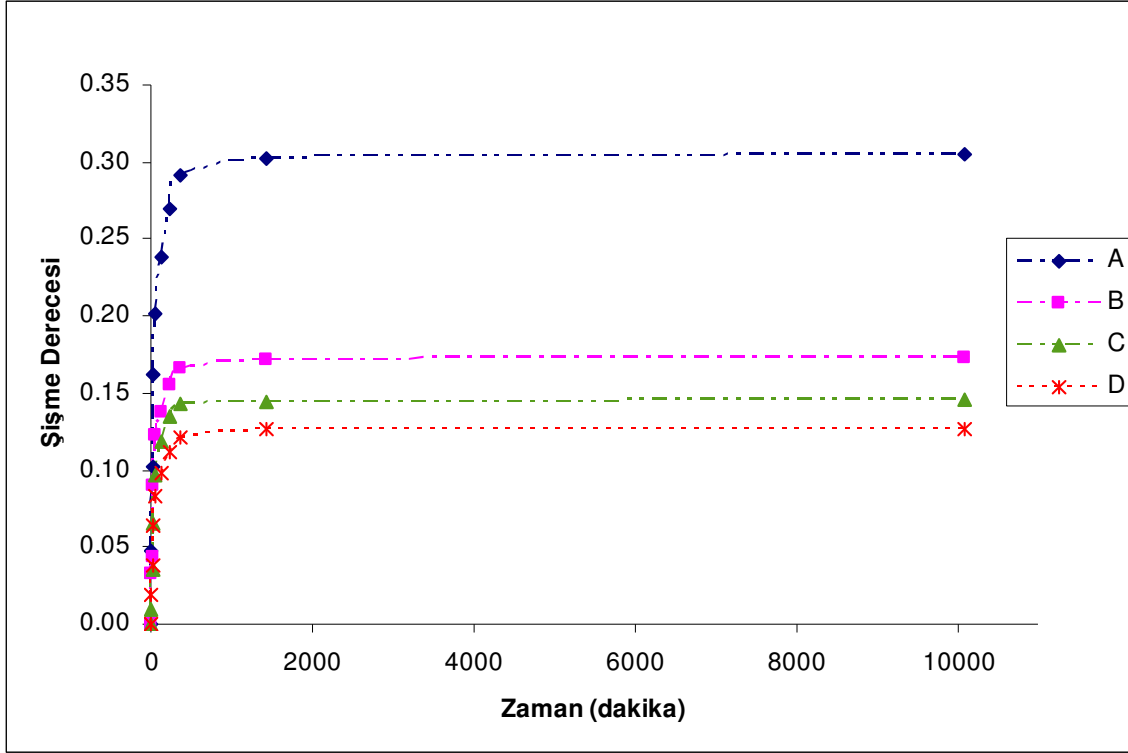
Tartım işlemleri gerçekleştirildikten sonra polimer filmler deiyonize su içerisine daldırılmıştır. Daldırma işleminden 10 dakika, 20 dakika, 30 dakika, 60 dakika, 120 dakika, 240 dakika, 360 dakika, 1 gün ve 1 hafta sonra her bir numune ıslak olarak tartılarak zamana karşı şişme kapasiteleri belirlenmiştir. Polimerler çapraz bağlı olarak sentezlendiklerinden dolayı belli bir miktar suyu mutlaka bünyelerine alacaklar, bir miktar hacim ve ağırlık değişimi mutlak suretle gözlenecektir.

Polimerlerin kuru ağırlıkları ve zamanla değişen ıslak ağırlıkları ölçüldükten sonra tüm bu veriler kullanılarak polimer filmlerin zamana bağlı olarak şişme dereceleri gözlemlenmiştir. Filmlerin gravimetrik şişme dereceleri Eşitlik 4.1 yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Derecesi} = \frac{\text{Ölçülen Islak Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}}{\text{Kuru Ağırlık}} \quad (4.1)$$

Ağırlık artışı ve şişme derecelerine bakıldığında anlaşılmaktadır ki sentezlenen metakrilat bazlı çapraz bağlı polimerler bir miktar suyu bünyelerine almış ve belli oranlarda şişme eğilimi göstermişlerdir. Bu eğilimin nedeni yapının çapraz bağlı olması, çapraz bağların aralarındaki boşlukların su alabilir olmasıdır. Bu tip hidrojel yapılar çapraz bağlanma miktarına göre su içerisinde şişerler. Gravimetrik şişme deneyi sonuçları göstermektedir ki çapraz bağlayıcı miktarının artması ile polimerin şişme miktarı azalmaktadır. Bunun nedeni çapraz bağ oranı arttıkça yapının içerisinde su alabilecek boşlukların azalmasıdır. Polimerlerin ölçülen ağırlıklarının 6. saatten sonra birbirlerine yakın seyrettiği görülmüştür. Belli bir miktar su polimer bünyesine penetre olduktan sonra şişme dengesi yavaş yavaş sağlanmaya başlar. İlk birkaç saatte şişme oldukça hızlı iken bir süre sonra giderek yavaşlar ve dengeye gelir.

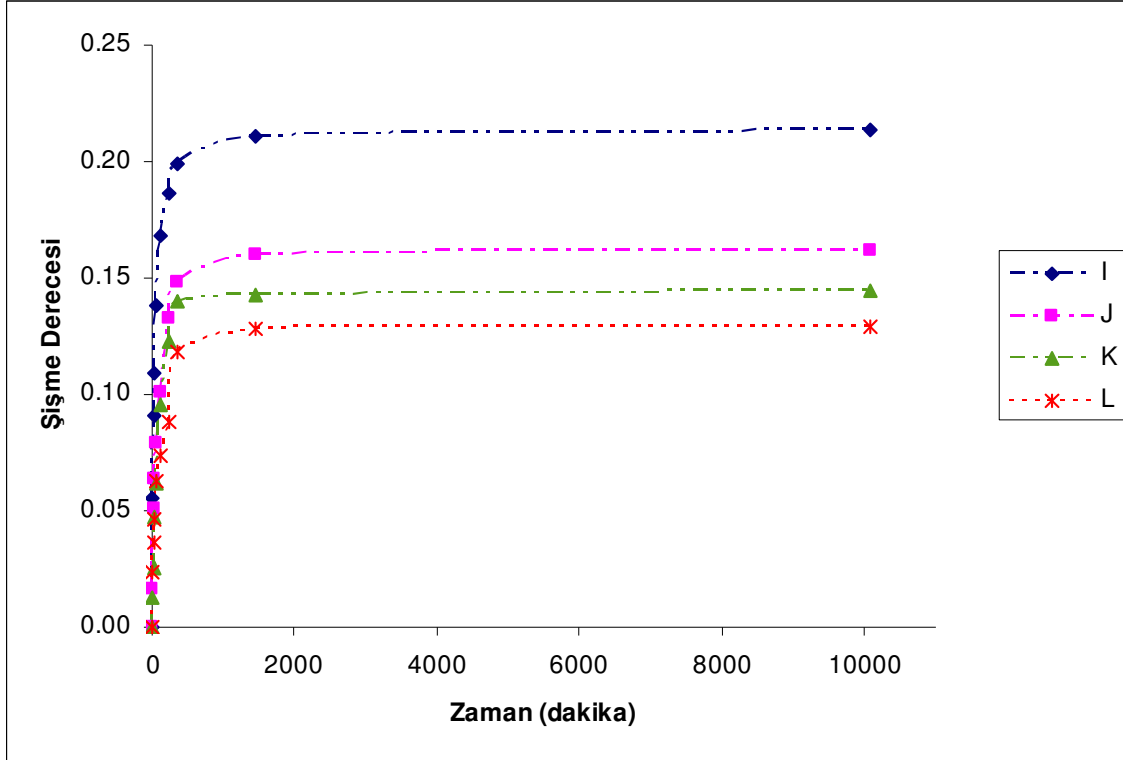
Farklı polimer gruplarının şişme dereceleri zamana karşı çizilen grafikler yardımı ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.3.'de çapraz bağlı HEMA monomeri için farklı çapraz bağlayıcı oranlarındaki şişme dereceleri zamana karşı olarak grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 4.3. A, B, C ve D polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi

Şekil 4.3.'de yalnızca HEMA monomeri ve çapraz bağlayıcı içeren A, B, C ve D polimerlerinin zamana karşı şişme derecelerindeki değişim eğrileri görülmektedir. Bu grafik incelendiğinde çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça hidrojel yapısının şişme eğiliminin kayda değer bir biçimde azaldığı görülmektedir. Örneğin 1:0,5 hacim oranında çapraz bağlayıcı miktarı dengedeki şişme derecesi yaklaşık 0,30 gibi bir değer iken 1:1,0 oranında çapraz bağlayıcı eklendiğinde bu değer yaklaşık 0,17'ye düşmüştür. Çapraz bağlayıcı oranı bir miktar daha arttırıldığında, yani hacmen 1:1,5 oranında eklendiğinde şişme derecesi yaklaşık olarak 0,14'e gerilemiş, monomer hacminin iki katı oranında çapraz bağlayıcı eklendiğinde ise şişme derecesi yaklaşık 0,12'ye kadar düşmüştür. Bu verilere bakıldığında çapraz bağlı HEMA polimerinin görece yüksek çapraz bağlayıcı oranlarında dahi şişmeye oldukça eğilimli olduğu görülmektedir. Grafik incelendiğinde yalnızca HEMA monomeri ve çapraz bağlayıcı içeren polimer grubu için şişme dengesi yaklaşık olarak 4. saatte elde edilmektedir.

Şekil 4.4.'de %50 oranında HEMA ve %50 oranında GMA monomeri içeren polimer grubunun farklı çapraz bağlayıcı miktarlarında zamana karşı şişme dereceleri grafiğe geçirilmiştir.

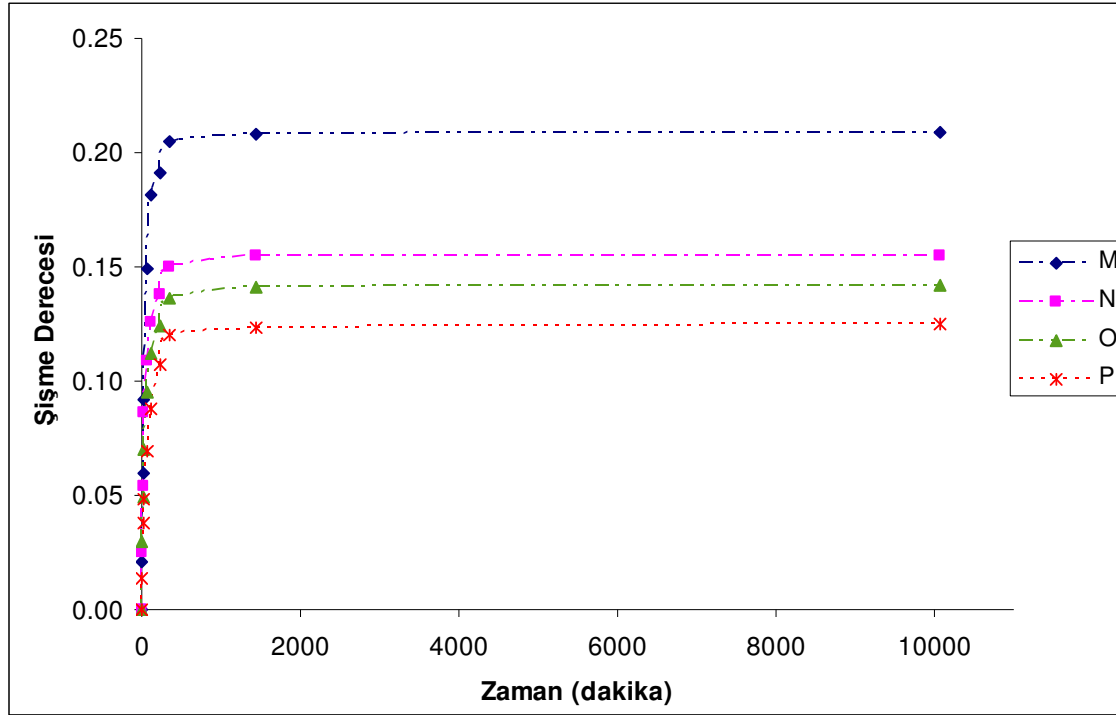


Şekil 4.4. I, J, K ve L polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi

Şekil 4.4.'de görüldüğü üzere yapıya GMA monomerinin girmesi düşük çapraz bağlayıcı oranlarındaki şişme derecesinin bir miktar azalmasına sebep olmuştur. Sadece HEMA polimerinde hacmen 1:0,5 oranında çapraz bağlayıcı eklendiğinde şişme derecesi 0,30 civarında iken HEMA ile eşit oranda GMA monomeri ilave edildiğinde aynı çapraz bağlayıcı miktarında şişme 0,20 civarına gerilemiştir. Bu düşüş GMA yapısındaki farklı fonksiyonel gruplardan kaynaklanmış olabilir. Ancak çapraz bağlayıcı miktarı arttığında ise HEMA polimerindeki şişme dereceleri ile hemen hemen aynı şişme dereceleri gözlemlenmiştir. Yapıya 1:1,0 oranında çapraz bağlayıcı eklendiğinde şişme derecesi 0,16 civarına ancak gerilemiş, şişme oranında daha fazla bir düşüş gerçekleşmemiştir. Yine aynı şekilde çapraz bağlayıcı oranı 1:1,5 olduğunda şişme derecesi 0,14 civarına, 1:2,0 olduğunda ise 0,12 civarına gerilemiştir. Bu durum ise şu şekilde açıklanabilir, düşük çapraz bağlayıcı oranlarında

yapıya su girişini GMA monomerindeki farklı fonksiyonel gruplar engellemiş, ancak çapraz bağlanma oranı arttıkça bu grupların şişme üzerindeki etkileri azalmıştır.

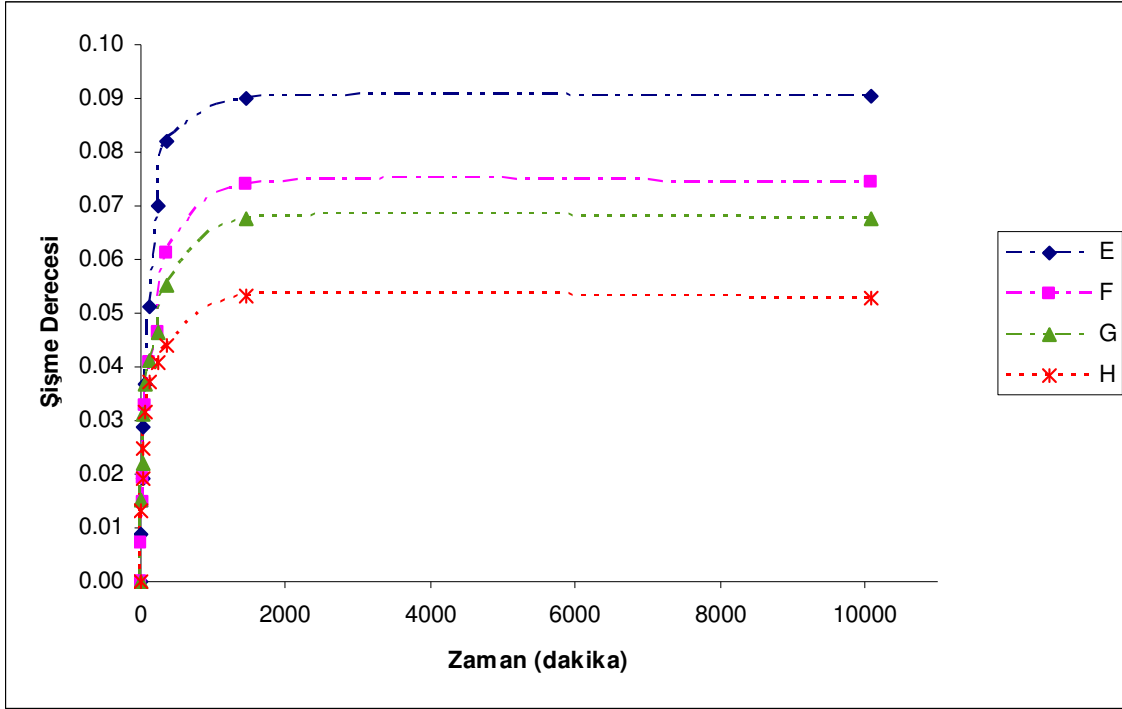
Şekil 4.5.'de hacmen %25 oranında HEMA monomeri ve %75 oranında GMA monomeri içeren, farklı çapraz bağlayıcı miktarlarında sentezlenmiş polimer filmlerin zamana karşı şişme dereceleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5. M, N, O ve P polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi

Şekil 4.5.'de görüldüğü gibi bu polimer grubunda da bir önceki grup ile benzer bir durum söz konusudur. Düşük çapraz bağlayıcı oranlarında şişme derecesi yalnız HEMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimere nazaran bir miktar daha düşüktür. Bu düşme GMA monomerinin yapısından kaynaklanmaktadır. Ancak çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça düşüş ilk polimer grubunda olduğu gibidir. 1:0,5 oranında EGDMA eklenmiş polimer için şişme derecesi 0,21 civarındadır, yani saf HEMA çapraz bağlı polimerinden daha az şişmektedir, ancak, 1:1,0 oranında EGDMA eklendiğinde şişme 0,15'e gerileyerek HEMA polimeri ile hemen hemen aynı değere düşer. 1:1,5 çapraz bağlayıcı oranında şişme derecesi yine HEMA grubu ile aynı olan 0,14 civarına, 1:2,0 EGDMA oranında yine HEMA grubuna eşdeğer olan 0,12 civarına gerilemiştir.

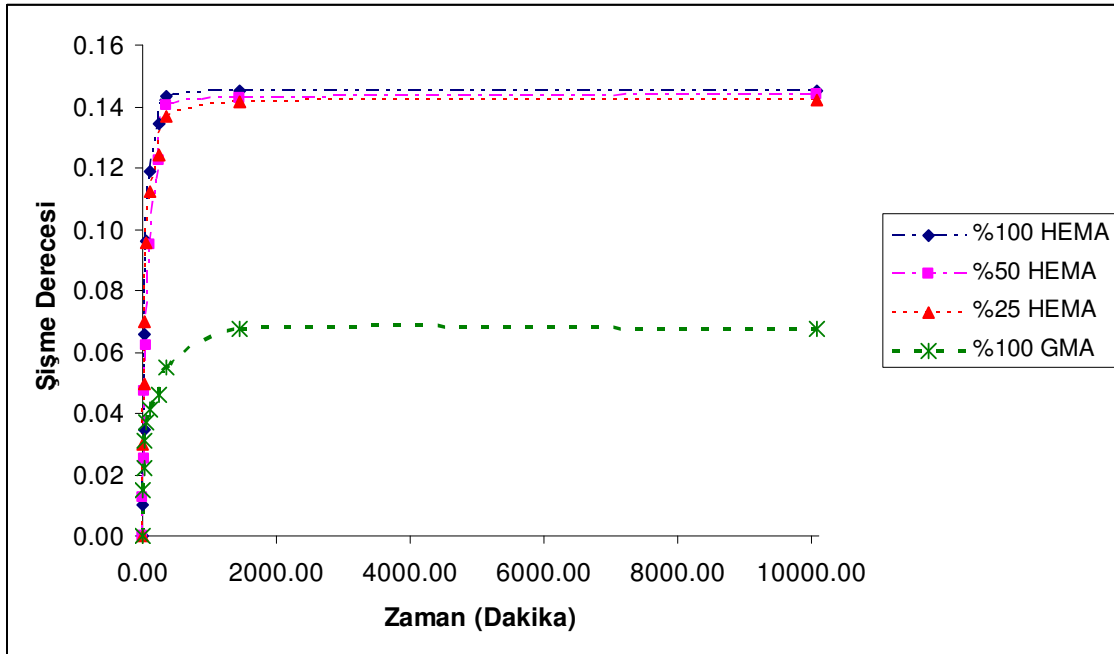
Şekil 4.6.'da yalnızca GMA monomeri ve EGDMA çapraz bağlayıcı monomeri kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerik filmlerin zamana karşı şişme dereceleri grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 4.6. E, F, G ve H polimerleri için zamana karşı şişme derecesi değişimi

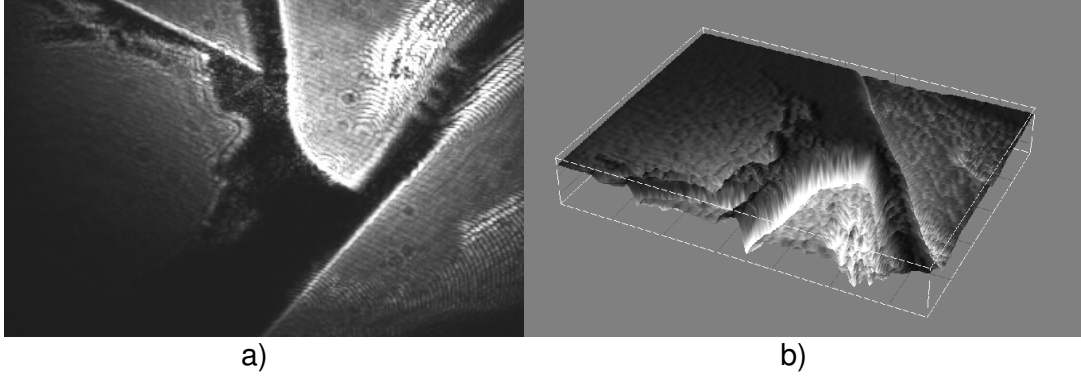
Yalnızca GMA monomeri ve EGDMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimer grubunun zamana karşı şişme dereceleri grafiği incelendiğinde şişme derecelerinin yapısında HEMA bulunduran diğer polimer gruplarına nazaran oldukça düşük olduğu görülmektedir. Hacmen 1:0,5 çapraz bağlayıcı eklendiğinde şişme derecesi yaklaşık 0,09 civarındadır ki bu yapıda yalnızca HEMA bulunduran hidrojelinde şişme derecesinin yaklaşık üçte biri kadardır. Açıkça görülmektedir ki HEMA polimeri oldukça hidrofilik bir yapı olup su içerisinde yüksek oranlarda şişmektedir. Yapıya GMA katılması ile bu şişme oranı bir miktar azalsa bile yüksek çapraz bağlayıcı oranlarında bu azalma kayda değer olmamaktadır. 1:1,0 oranında EGDMA içeren çapraz bağlı GMA polimeri yaklaşık olarak 0,075 gibi bir şişme derecesi değerine sahiptir. Artan çapraz bağlayıcı oranları ile bu değer 1:1,5 oranında yaklaşık 0,065'e, 1:2,0 oranında ise yaklaşık olarak 0,055'e gerilemiştir. Bu değerler incelendiğinde yapıda HEMA bulunması şişme açısından bir dezavantajdır ve istenmeyen bir

durumdur. Şişme ile birlikte istenilen sensör cevabı net bir biçimde alınamayacak, hatta oluşturulan mikrofabrikasyonda deformasyonlar meydana gelebilecektir. Şekil 4.7'de de görüldüğü gibi 1:1,5 oranında çapraz bağlayıcı eklenmiş polimer gruplarının şişme eğilimleri karşılaştırıldığında HEMA içeren polimerler yaklaşık aynı oranlarda şişerken, yalnızca GMA monomeri içeren çapraz bağlı polimerik filmler en az hidrofilik yapılar olup en uygun şişme eğilimini göstermektedirler. Her biri hacmen 1:1,5 monomer / çapraz bağlayıcı oranında hazırlanmış %100 HEMA, %50 HEMA ve %50 GMA, %25 HEMA ve %75 GMA ve %100 GMA içeren polimer filmlerin şişme derecelerinin karşılaştırılması Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Polimer filmlerin şişme derecelerinin karşılaştırılması

Tüm polimer gruplarında çapraz bağlayıcı oranının artması şişme derecelerinin düşmesine neden olmuştur. 1:0,5 oranında EGDMA eklenen yapılar en fazla şişerken, 1:2,0 oranında EGDMA eklenen yapılar en az şişme eğilimi göstermişlerdir. Ancak 1:2,0 oranında çapraz bağlayıcı eklendiğinde oluşturulan polimerik filmlerin yüzeylerinde zamanla bir takım çatlama, kırılmalar meydana gelebilmektedir. Bu da sensör uygulamaları için dezavantaj olacaktır. Şekil 4.8.'de bu kırılmalardan bir örneğin 2 ve 3 boyutlu elipsometrik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.8. Polimer film yüzeyinin bozulmasının elipsometrik 2 boyutlu (a) ve bu kısma ait 3 boyutlu (b) görünüşü

PDMS polimeri, kit halinde satın alınıp sentezlendiği, çapraz bağlayıcı miktarı daima sabit olduğu için şişme deneyleri yapılmamıştır.

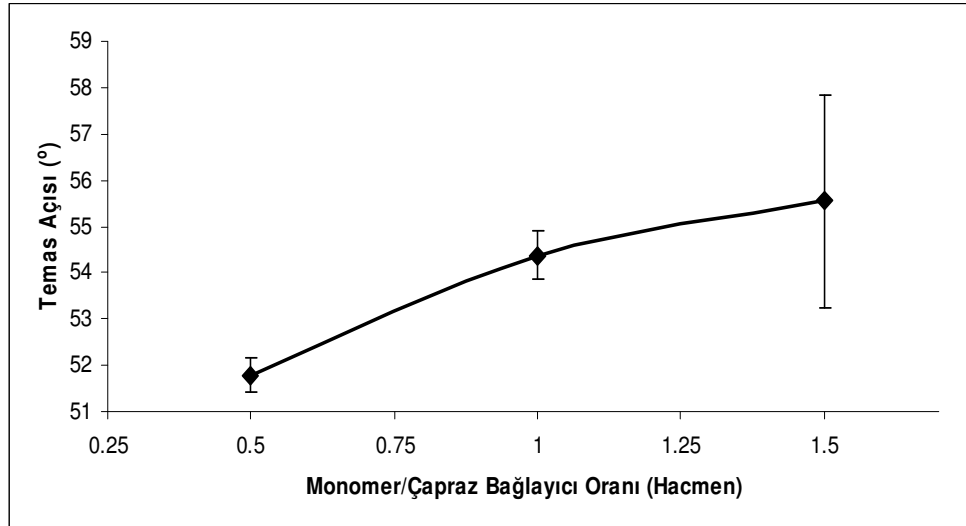
4.1.2.2. Çapraz Bağlı Polimerlerin Sentezinde Çapraz Bağlayıcı Miktarının Temas Açısına Etkisinin İncelenmesi

Daha önce de bahsedildiği gibi hacmen 1:2,0 oranında EGDMA eklenerek sentezlenen filmlerde bir takım fiziksel bozukluklar meydana gelebilmektedir. Bu nedenle bu oranda sentezlenmiş polimer filmlerin temas açıları ölçülmemiştir. Tez kapsamında bu aşamada şişme dereceleri incelenmiş olan polimerler etüvde 2 gün boyunca bekletilerek tamamen kurutulmuştur. Kurutulan polimerlerin her biri için optik temas açısı ölçüm sistemi kullanılarak statik temas açıları ölçülmüştür. Bu ölçümler yapılırken her bir film için 4 damla kullanılmış, her damla hacmi 1 μL olarak belirlenmiştir. Her damla için sağ, sol ve ortalama temas açıları ölçülmüş, hepsinin aritmetik ortalamaları alınarak raporlanmıştır. Her bir ölçüm 3 defa tekrarlanmıştır. Çizelge 4.3.'de yalnızca HEMA içeren çapraz bağlı polimer filmler için ölçülen temas açısı değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. Yalnızca HEMA içeren çapraz bağlı polimer filmler için ölçülen temas açısı değerleri

		1. Damla	2. Damla	3. Damla	4. Damla	Ortalama
A	Sağ	50,36	52,21	52,26	51,24	51,79
	Sol	52,20	51,52	51,99	52,50	
	Ortalama	51,28	51,87	52,13	51,87	
B	Sağ	55,51	53,41	55,15	54,93	54,38
	Sol	54,29	54,15	53,15	54,44	
	Ortalama	54,90	53,78	54,15	54,67	
C	Sağ	56,21	55,41	51,15	54,06	55,55
	Sol	59,41	57,27	53,55	57,30	
	Ortalama	57,81	56,34	52,35	55,68	

Çizelge 4.3.'de görüldüğü üzere çapraz bağlı HEMA polimerinin temas açısı değeri çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça artmaktadır. Bir başka deyişle çapraz bağlayıcı molekül yapıya hidrofobik bir etkide bulunmaktadır. Yalnızca HEMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerik filmlerin temas açısı değerlerinin, çapraz bağlayıcı miktarına göre değişim grafiği Şekil 4.9.'da görülmektedir.



Şekil 4.9. Yalnızca HEMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerik filmlerin temas açısı değerlerinin, çapraz bağlayıcı miktarına göre değişimi.

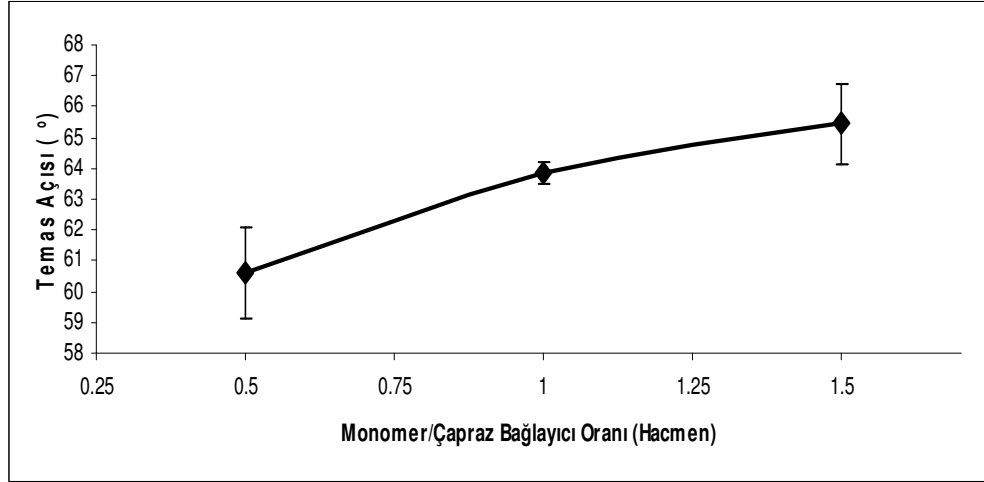
Burada da görüldüğü üzere EGDMA çapraz bağlayıcısı, oldukça hidrofilik bir yapıda olan HEMA polimerine az da olsa bir miktar hidrofobiklik katmaktadır. Polimer filmin hidrofilik olması nedeniyle suyu sevmesi ve şişmeye karşı eğilimli olması sensör uygulaması açısından istenmeyen bir durumdur. Şekil 4.10'da yalnızca HEMA kullanılarak hazırlanan polimerik filmlerden 1:1,5 çapraz bağlayıcı oranında sentezlenen filmin temas açısı ölçümlerinde kullanılan damla görüntüsü verilmiştir.

%50 oranında GMA içeren çapraz bağlı polimer filmin temas açısı ölçüm sonuçları Çizelge 4.4.'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. %50 oranında GMA içeren çapraz bağlı polimer filmler için ölçülen temas açısı değerleri

		1. Damla	2. Damla	3. Damla	4. Damla	Ortalama
I	Sağ	58,85	61,72	60,11	61,14	60,61
	Sol	59,09	62,05	59,48	62,41	
	Ortalama	58,97	61,885	59,795	61,78	
J	Sağ	63,72	64,64	64,13	62,89	63,85
	Sol	64,47	63,79	63,24	63,91	
	Ortalama	64,1	64,22	63,66	63,4	
K	Sağ	66,62	66,64	64,28	62	65,43
	Sol	66,05	66,8	65,17	65,87	
	Ortalama	66,34	66,72	64,73	63,94	

Bu sonuçlarda temas açısı değerleri yapıya GMA eklenmesi ile yükselmiştir. Bir başka deyişle GMA, HEMA'dan daha hidrofobik bir yapıdadır. Bunun nedeni HEMA'nın üzerinde hidroksil grubu barındırması ile kazandığı hidrofilik karakterin güçlü olması, aynı şekilde GMA molekülü üzerinde epoksi halkasının çapraz bağlanma süresince açılmadan kalması olabilir. Ayrıca yapıya çapraz bağlayıcı eklendikçe yapının temas açısı artmakta yani hidrofilik karakteri azalmaktadır. Yine bu etki EGDMA molekülünün yapıya katılmasıyla HEMA molekülündeki –OH grubunun hidrofilik etkisinin bastırılması ile açıklanabilir. Şekil 4.10.'da bu değişimler grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.10. %50 oranında GMA içeren çapraz bağlı polimerik filmlerin temas açısı değerlerinin, çapraz bağlayıcı miktarına göre değişimi

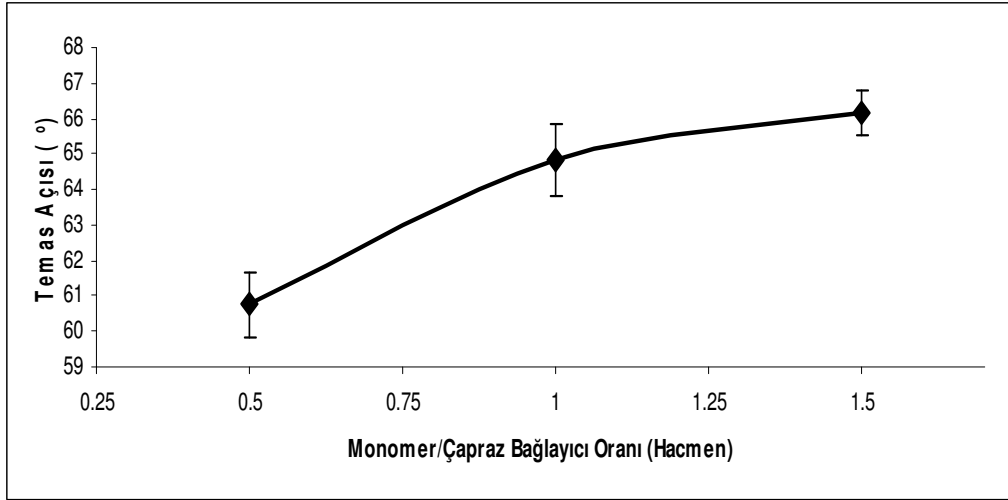
Çizelge 4.5.'de hacmen %25 oranında HEMA içeren GMA çapraz bağlı polimerinin çapraz bağlayıcı miktarına göre temas açısı değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.5. Hacmen %25 oranında HEMA içeren GMA çapraz bağlı polimerinin çapraz bağlayıcı miktarına göre temas açısı değerleri

		1. Damla	2. Damla	3. Damla	4. Damla	Ortalama
M	Sağ	60,95	60,66	62,5	59,92	60,76
	Sol	61,36	60,07	61,14	59,43	
	Ortalama	61,16	60,36	61,82	59,68	
N	Sağ	65,13	65,54	65,83	64,04	64,83
	Sol	64,48	66,13	64,69	62,79	
	Ortalama	64,81	65,84	65,26	63,42	
O	Sağ	66,65	66,68	65,79	64,68	66,17
	Sol	66,04	67,02	66,46	66,02	
	Ortalama	66,35	66,85	66,13	65,35	

Çizelge 4.5.'de görüldüğü üzere HEMA miktarının azalmasına orantılı olarak yapının temas açısı değeri artmakta yani yapı bir miktar daha hidrofobik olmaktadır. Azalan –OH grupları buradaki en büyük etken olarak gösterilebilir. Özellikle çapraz bağlayıcı miktarının artışı ile diğer polimer gruplarında olduğu gibi temas açıları bir miktar

artma görülmüştür. Bu artık diğer gruplar ile hemen hemen aynı orandadır, bir başka deyişle çapraz bağlayıcı miktarı bu artıştaki temel parametredir. Şekil 4.11.'de bu artış grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 4.11. Hacmen %25 oranında HEMA içeren GMA çapraz bağlı polimerik filmlerin temas açısı değerlerinin, çapraz bağlayıcı miktarına göre değişimi

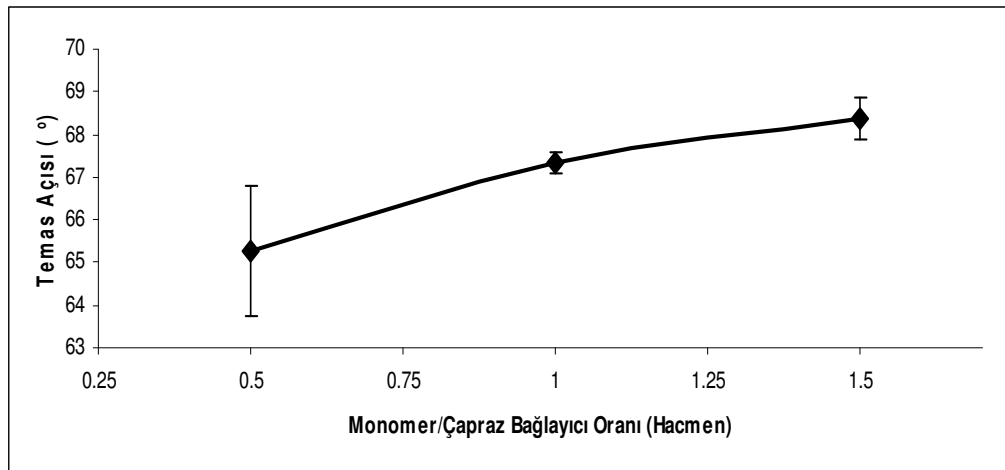
Burada da görüldüğü gibi EGDMA yapının hidrofiliğini düşürmüş, hidrofobikliğini yükselterek temas açısının artmasına sebep olmuştur. Yapıda HEMA baskınlığı ne kadar azalır, temas açısı o denli artmaktadır.

Sadece GMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerlerin çapraz bağlayıcı oranına bağlı temas açısı değişimleri Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Sadece GMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerlerin çapraz bağlayıcı oranına bağlı temas açısı değişimleri

		1. Damla	2. Damla	3. Damla	4. Damla	Ortalama
E	Sağ	65,34	64,50	64,13	66,88	65,27
	Sol	61,60	64,58	69,03	66,12	
	Ortalama	63,47	64,54	66,58	66,50	
F	Sağ	67,37	67,09	67,23	67,80	67,33
	Sol	67,55	66,97	67,27	67,34	
	Ortalama	67,46	67,03	67,25	67,57	
G	Sağ	68,35	68,95	68,03	68,19	68,38
	Sol	67,05	67,93	69,11	69,43	
	Ortalama	67,70	68,44	68,57	68,81	

Sadece GMA kullanıldığında yapı HEMA'dan gelen –OH gruplarını içermediği için, Çizelge 4.6.'de de görüldüğü üzere hidrofobiklik, bir başka deyişle temas açıları kayda değer biçimde yükselmiştir. GMA ile elde edilen filmlerde temas açısı değerlerinin yaklaşık olarak 67° – 68° civarında olması bu polimerin sensör uygulamalarında kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Yine önceden olduğu gibi EGDMA molekülünün yapıdaki miktarının artması temas açısının artmasına neden olmuştur. Bu durum Şekil 4.12.'deki grafik ile de oldukça açık bir biçimde açıklanmıştır. Yapının hidrofilikliğinin nasıl değiştiği burada net olarak görülmektedir.

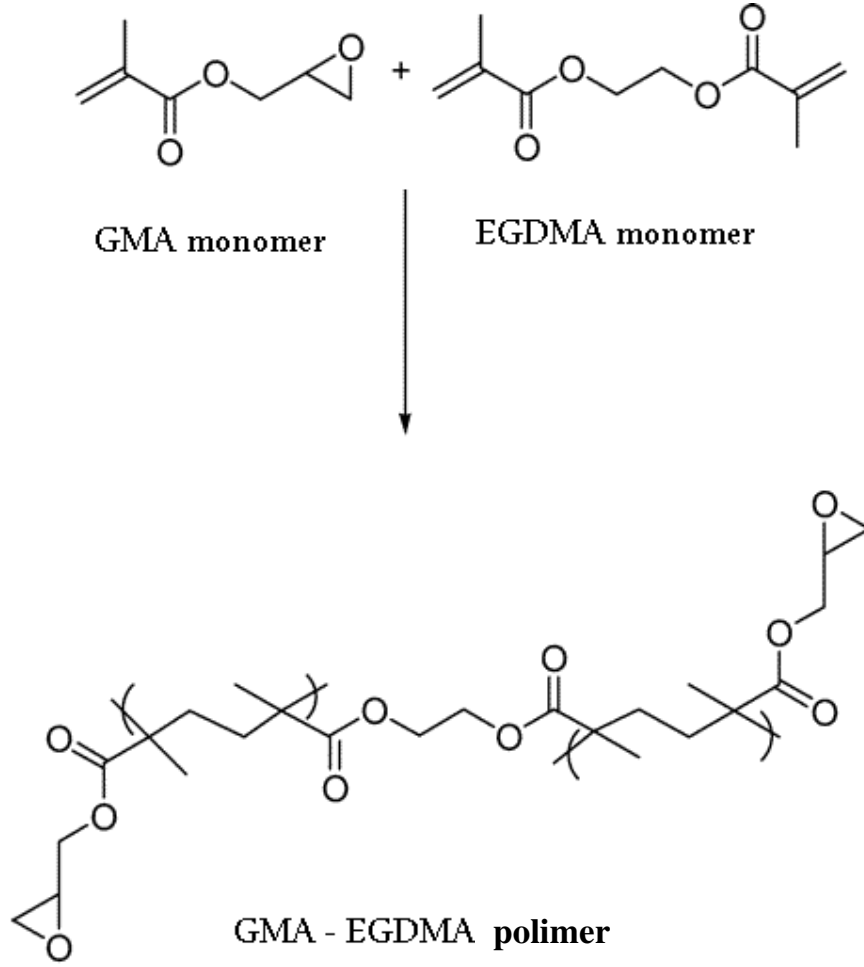


Şekil 4.12. Sadece GMA kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı polimerlerin çapraz bağlayıcı oranına bağlı temas açısı değişimi

Tüm bu ölçümler birlikte dikkate alınır, HEMA monomeri içeren bir polimerik filmin sensör uygulamasında kullanılmasının şişme nedeniyle uygun olmadığı görülür. Bu tip bir film uygulandığında, sensörde akış sırasında kullanılacak taşıyıcı matris (çözeltiler) hidrofilik polimer tarafından emilecektir. GMA ise HEMA'ya göre daha hidrofobik karakterde olduğu için tercih edilebilir. Ayrıca GMA molekülü üzerinde kendiliğinden var olan reaktif epoksi fonksiyonel grubu bu molekülü protein array platformlarında substrat olarak kullanmaya elverişli kılar. Bu molekül ile sentezlenen çapraz bağlı polimer filmin herhangi bir kimyasal modifikasyona ihtiyacı yoktur. Proteinler ile epoksi halkası doğrudan etkileşeceği için bu seçim çok yerinde ve uygun olacaktır (Malik, 2004; Sun, 2009).

EGDMA çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça, tüm polimer gruplarının temas açılarında artış gözlemlenmiştir. Bu molekülün yapının çapraz bağ miktarını arttırdığını düşünürsek, yapıların hidrofilik karakterlerindeki bu değişim normaldir. Çapraz bağ miktarı arttıkça azalan gözeneklilik yapının içine su girişini engelleyecektir.

Tüm bu sonuçlar yorumlandığında 1:2,0 oranında EGDMA kullanımının sentez sonrası kırılma ve bozulmalardan ötürü uygun olmadığı, HEMA kullanmanın sensör uygulamalarında hidrofiliklik/hidrofobiklik bir diğer deyişle şişme özellikleri açısından uygun olmadığı görülmüştür. EGDMA kullanımı hidrofilikliği düşürdüğünden ötürü yüksek miktarda çapraz bağlayıcı kullanılması öngörülmüştür. GMA kullanmanın hem hidrofiliklik/hidrofobiklik açısından hem de yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplar açısından uygun olacağına karar verilmiş, %100 GMA içeren çapraz bağlayıcı olarak farklı oranlarda EGDMA eklenecek polimer bileşimi en uygun bileşim olarak bundan sonraki tüm tez çalışması kapsamında kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu polimer türünün kullanılması tez kapsamında çok yönlü avantajlar sunacaktır. Polimer sentezinin kolaylığı en önemli avantajlarından biri iken diğer bir avantaj ise GMA polimerinin epoksi halkası taşımasıdır. Epoksi halkası herhangi bir modifikasyon ya da aktivasyon (karbodiimid vb. gibi) gerektirmeden protein yapıları ile doğrudan etkileşime girmektedir. Bu özelliği kullanarak sensör yüzeyleri GMA monomerinden üretilebilir ve herhangi bir yüzey modifikasyonuna (kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar gibi) veya aktivasyonuna gerek duyulmaz.



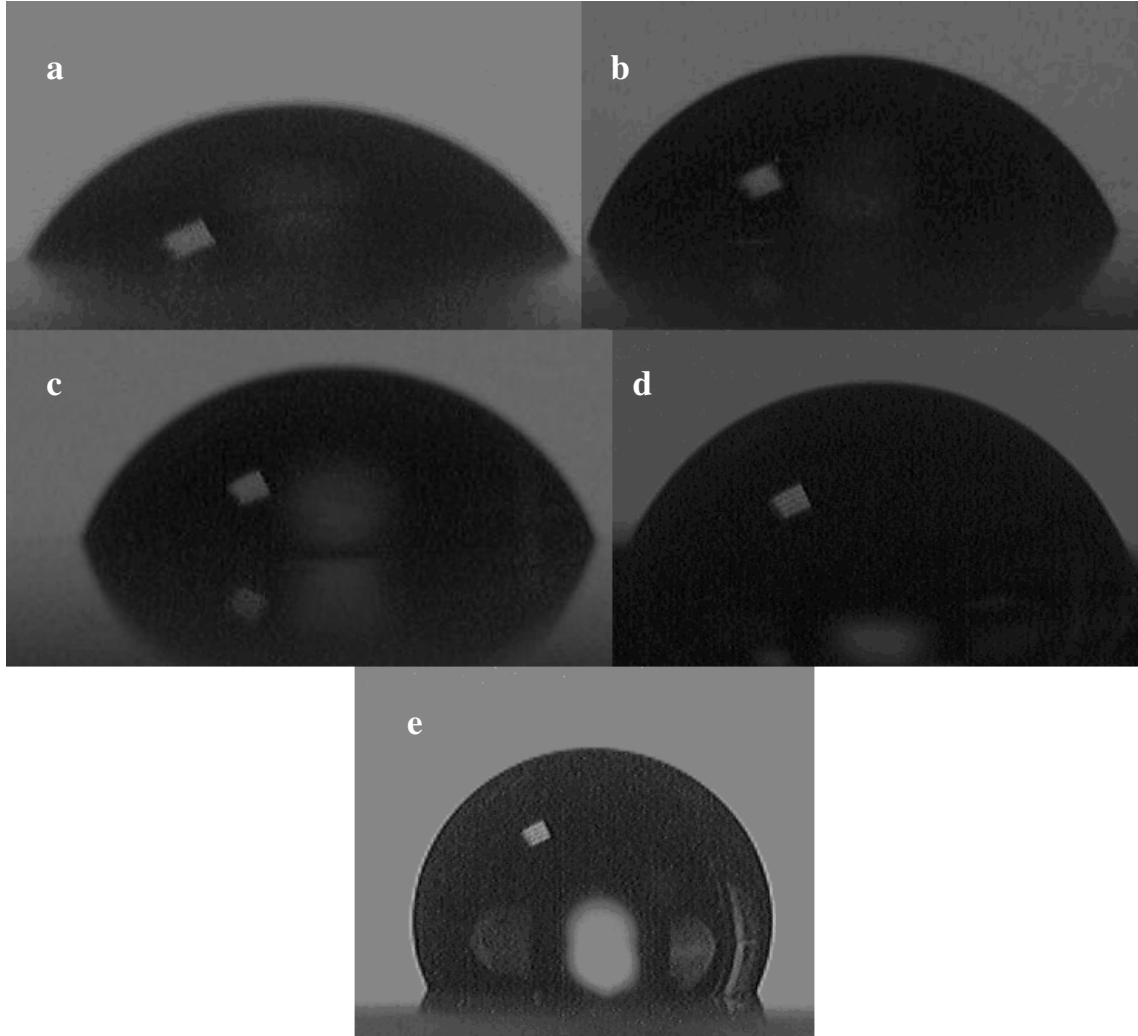
Şekil 4.13. GMA, EGDMA monomerlerinin yapıları ve çapraz bağlı GMA-EGDMA polimerinin yapısı

Şekil 4.13.'de GMA ve EGDMA monomerleri ile elde edilen polimerik yapı gösterilmiştir. Görüldüğü gibi yapı üzerinde epoksi halkaları açık (bir başka deyişle engellenmemiş) bir şekilde bulunmaktadır. Bu polimer ile protein molekülleri epoksi halkasından dolayı rahatlıkla etkileşebilmekte, gerekli immobilizasyonlar herhangi bir ek işleme gerek duyulmadan gerçekleştirilebilmektedir.

PDMS polimerinin statik temas açısı $115,73^\circ$ olarak ölçülmüş, bu değer literatür değeri olan $116,6^\circ$ ile karşılaştırıldığında oldukça yakın olduğu görülmüştür (Lee, 2009).

PDMS polimeri oldukça hidrofobik bir yapıya sahiptir. Bu özelliği ile çeşitli biyoçip uygulamalarında oldukça uygun bir yüzey olarak kullanılabilirliği gündeme gelmektedir. Özellikle mikroakış kanalı ve soft litografi uygulamalarında PDMS çok sık tercih edilen bir polimerdir. Tez kapsamında PDMS polimerinin de kullanılmasına da bu aşamada karar verilmiştir.

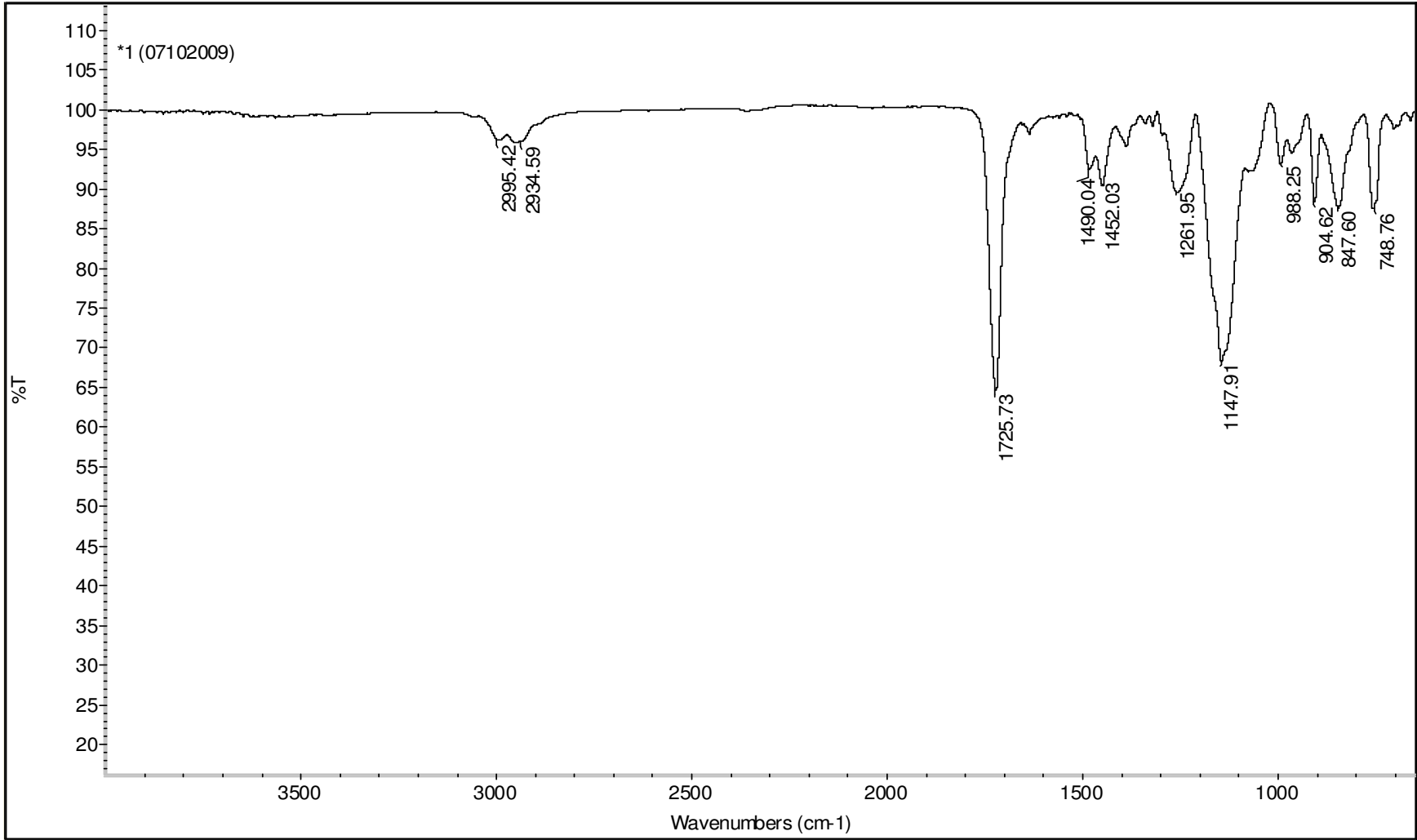
Şekil 4.14.'de çeşitli yüzeyler üzerinde su damlası görüntüleri verilmiştir.



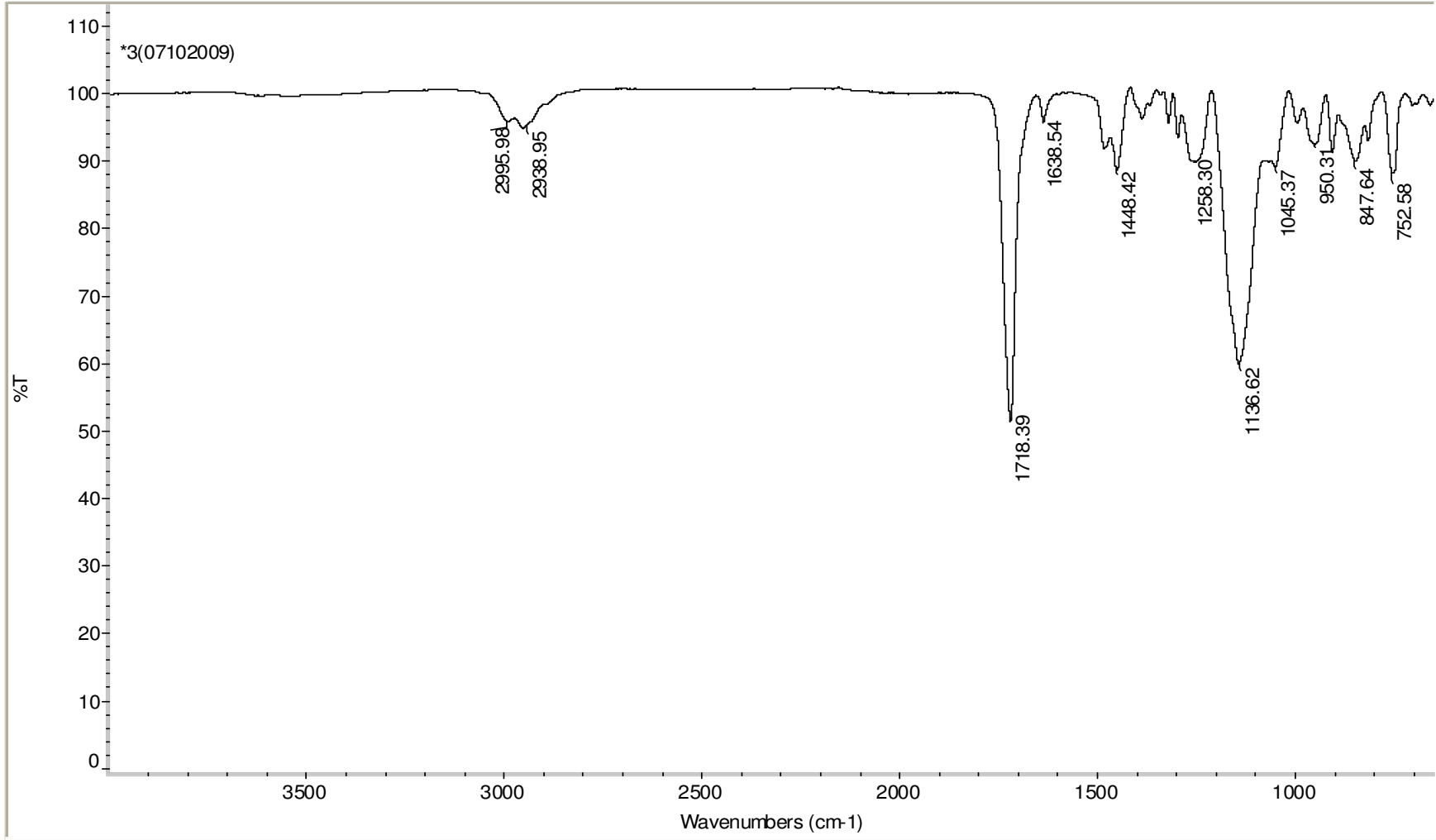
Şekil 4.14. Çeşitli yüzeyler üzerinde su damlası görüntüleri (a) Polimerik HEMA filmlerden 1:1,5 çapraz bağlayıcı oranında sentezlenen film (b) %50 HEMA kullanılarak ve hacmen 1:1,5 oranında EGDMA eklenerek sentezlenen film (c) Hacmen % 25 HEMA, %75 GMA içeren, 1:1,5 oranında EGDMA eklenmiş çapraz bağlı polimerik film (d) 1:1,5 oranında EGDMA eklenmiş GMA film.

4.1.2.3. Yüzey Analizleri

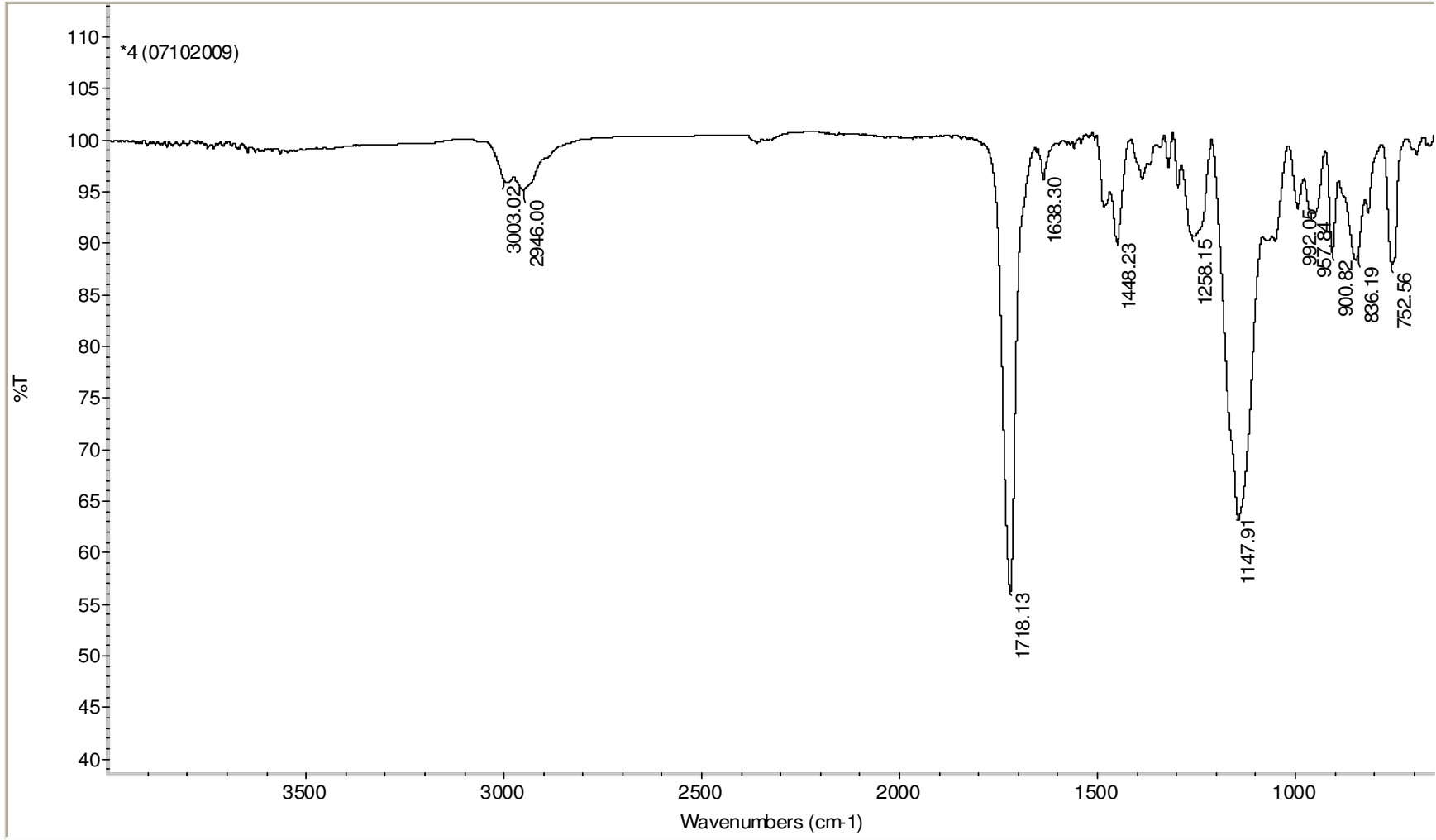
Tez kapsamında bu bölümde, GMA çapraz bağlı polimer filmlerinin FTIR- ATR tekniği ile yüzey analizleri yapılmıştır. Bu teknik ile ince filmlerin yüzeyindeki çeşitli fonksiyonel grupların kalitatif analizleri yapılabilmektedir. Aynı zamanda bağıl olarak kantitatif analizler de yapılabilir. Bu bağlamda sırası ile monomer / çapraz bağlayıcı oranları hacmen 1:0,5; 1:1,0 ve 1:1,5 olarak sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer filmleri için ATR ölçümleri yapılmıştır. ATR ölçümleri sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Monomer / çapraz bağlayıcı oranı hacmen 1:0,5 olarak sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer film için ATR ölçüm sonucu

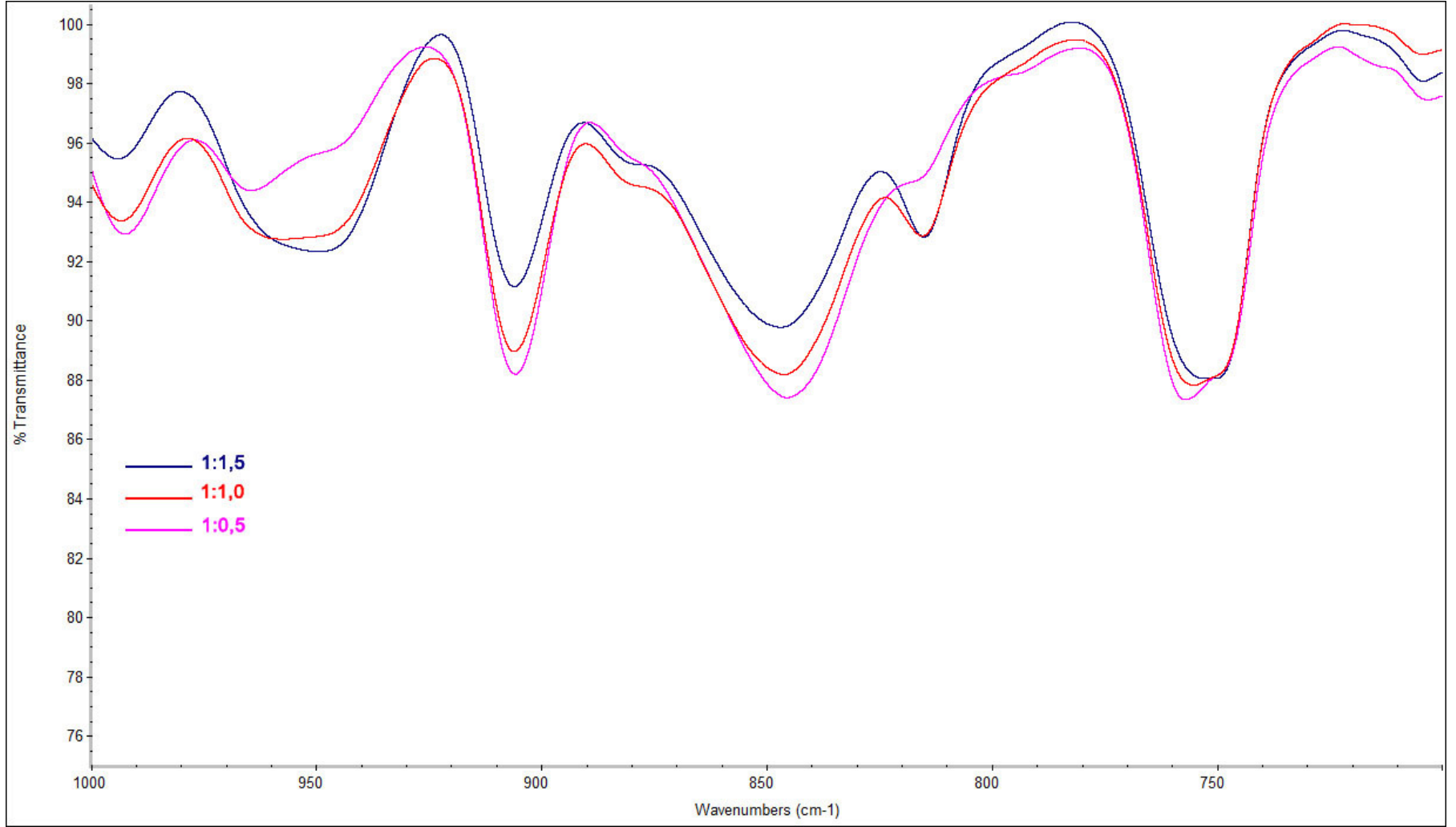


Şekil 4.16. Monomer / çapraz bağlayıcı oranı hacmen 1:1,0 olarak sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer film için ATR ölçüm sonucu



Şekil 4.17. Monomer / çapraz bağlayıcı oranı hacmen 1:1,5 olarak sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer film için ATR ölçüm sonucu

Çalışmada üç farklı oranda GMA ve EGDMA içeren polimerik filmler hazırlanmıştır. Hazırlanan filmlerin her biri için FTIR-ATR spektrometresi kullanılarak alınan spektrumlar Şekil 4.15., Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.'de görülmektedir. FTIR-ATR spektrumlarında görülen bandlar şu şekildedir; ester (C=O) bandı hacmen 1:0,5 oranında çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlenen film için 1725.7 cm^{-1} 'de, hacimce 1:1,0 oranında çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlenen film için 1714.3 cm^{-1} 'de, 1:1,5 oranında çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlenen film için 1718.4 cm^{-1} 'de görülmüştür. Gözlemlenen bu bandların dalga boyundaki kaymalar C=O gruplarının kimyasal çevrelerindeki değişime bağlıdır. Ayrıca değişen GMA oranıyla birlikte GMA monomerindeki fonksiyonel grubun (epoksi halkası) bandında da değişimler gözlemlenmiştir. Epoksi grubunun bandı $1100 - 800 \text{ cm}^{-1}$ 'de görüldüğü literatürde belirtilmektedir (Fedoseev, 1996; Evtushenko, 2003; Kunita, 2005). Farklı monomer/çapraz bağlayıcı oranlarında hazırlanan çapraz bağlı polimerik filmlerin her birinde de beklendiği üzere bu bölgelerde bandlar mevcuttur. Değişen GMA oranı ile özellikle 847 cm^{-1} ve 904 cm^{-1} civarında elde edilen pikte değişimler görülmüştür. Bunun nedeni GMA içerisinde bulunan epoksi halkası miktarının değişik oranlarda farklılık göstermesi olarak belirtilebilir. Azalan GMA miktarı ile epoksi halkası miktarı da azalmıştır. Bu durum, epoksi halkasına ait olan 847 cm^{-1} ve 904 cm^{-1} 'de görülen bandın değerinde buna paralel olarak azalmanın görüldüğü Şekil 4.18.'de üst üste çakıştırılan 3 spektrumda bağlı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Hacmen 1:0,5; 1:1,0; 1:1,5 monomer / çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenmiş çapraz bağlı GMA polimer filmlerinin üst üste çakıştırılan ATR ölçüm sonuçları

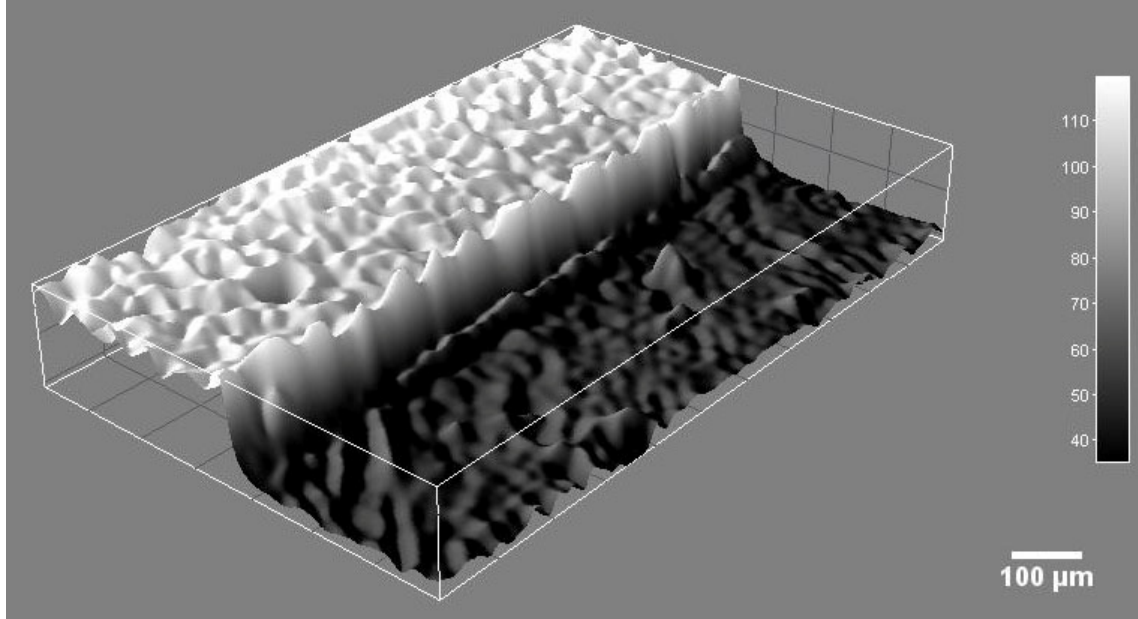
Tüm bu sonuçlar birlikte yorumlandığında, GMA miktarının fazla olduğu polimer filmi kullanmak protein-epoksi halkası etkileşimi yoluyla immobilizasyonu sağlamak açısından en uygun durum olacaktır. Ancak hacmen 1:2 oranında çapraz bağlı polimer kullanılarak sentezlenen filmlerin yüzeyinde çatlama meydana gelmiş, APTS molekülü ile modifiye edilmiş yüzeyler üzerinde sentezlendiğinde, sentez sonrasında polimer filmin yüzeyden kısmen kalktığı gözlemlenmiştir. Bu oranda sentezlenen film için ATR ölçümleri yapılamamıştır. Bu nedenlerden ötürü en uygun monomer / çapraz bağlayıcı oranı 1:1.5 olarak seçilmiş, bundan sonraki tüm aşamalar için bu oran kullanılmıştır.

4.1.3. Fotolitografik yöntemler kullanılarak Silikon Elastomer ile Mikrokanal Fabrikasyonu

Mikrofabrikasyonda kullanılan malzemeler cam, silikon veya çeşitli polimerler olabilmektedir. Polimerik malzeme kullanıldığında başvurulan yeni mikrofabrikasyon tekniklerinin arasında en sık kullanılan yöntem fotolitografik mikrofabrikasyondur. Bu yöntemle genellikle PDMS gibi elastomerik polimerler kullanılmaktadır. Yöntem özetle ışığa duyarlı bir malzeme ile seçilen yüzeyler üzerinde istenilen kalınlıkta kaplamalar oluşturmak, bu kaplamalar ile ışık radyasyonu kullanılarak istenen desende kalıpları elde etmek, bu kalıplar üzerinde polimerin çapraz bağlanması ve kalıptan ayrılması şeklindedir.

Tez kapsamında bu aşamada öncelikle silikon plaka yüzeyleri aseton ile temizlenerek sonrasında metanol ve etil alkol ile birkaç kez yıkanmış, ardından azot ile kurutulmuştur. Kalmış olabilecek organik ve inorganik kirliliklerin uzaklaşması için 200°C'lik sıcak plaka üzerinde 15 dakika boyunca tutulmuştur. Eğer bu temizleme işlemi yapılmaz ise, ışığa duyarlı malzeme yüzey üzerine homojen olarak kaplanamamakta, kirli olan kısımlarda bozukluklar meydana gelmektedir. Oda sıcaklığına ulaşan plakalar el yapımı dönel kaplama cihazına yerleştirilmiştir. Yüzeyin eğimli olup olmadığı küçük su terazisi yardımı ile belirlenmiştir. Düz bir şekilde yerleştirilen plaka üzerine ışığa duyarlı malzeme 5 ml hacimde damlatılarak sistem 5 saniye 500 rpm hızda, 20 saniye 2000 rpm hızda döndürülmüştür. Plaka 80°C'de homojen olarak pişirilmiştir. Bu pişirme ile malzeme yüzey üzerine bozulmayacak biçimde kaplanmıştır. Bu kaplamanın yaklaşık kalınlığının 100 µm olması

beklenmektedir (Li, 2005). Şekil 4.19.'da görüldüğü gibi elipsometre ile alınan üç boyutlu görüntülerde de bu kaplamanın kalınlığının yaklaşık olarak 100 μm olduğu görülmektedir.

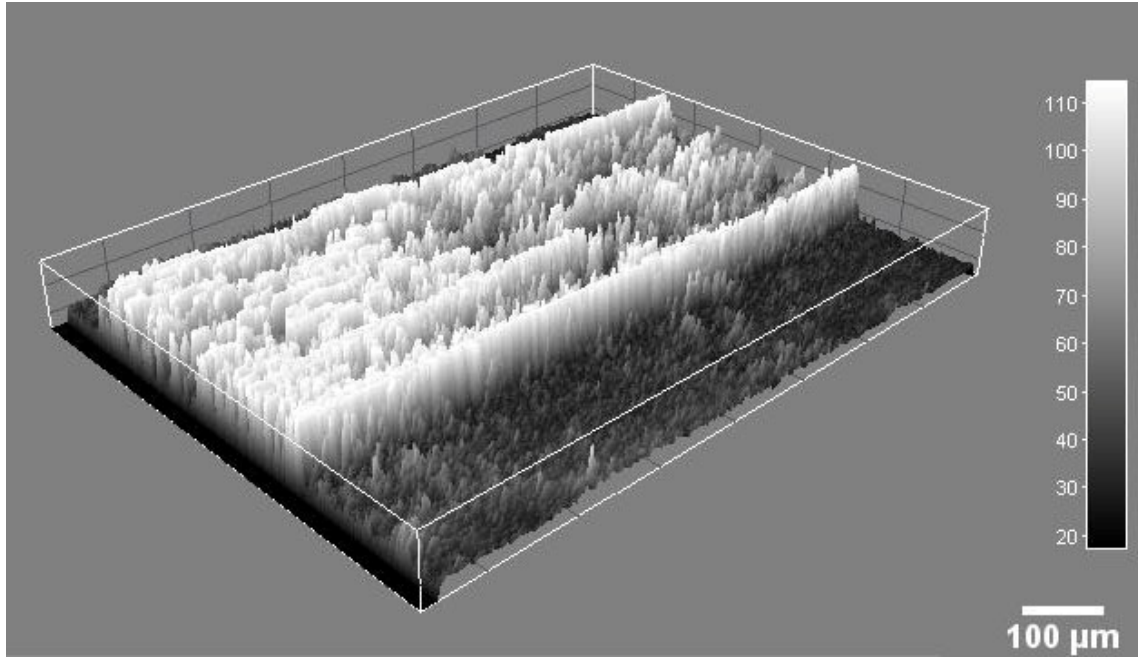


Şekil 4.19. Silikon plaka üzerine kaplanan ışığa duyarlı malzemenin kaplama kalınlığı

Kaplama işleminin ardından plaka UV lambanın altına yerleştirilmiştir. Öncelikli olarak 400 μm daha sonra 200 μm ve son olarak da 100 μm kanal genişliğine ve sırası ile 400 μm , 200 μm , 100 μm kanal aralıklarına sahip olacak şekilde tasarlanmış maskeler yüzeye yerleştirilmiştir. Kanal tasarımları elipsometre cihazının fiziksel sınırlamaları da göz önüne alınarak yapılmıştır. Elipsometre cihazında lazer spotu yaklaşık 1 mm çaplı dairesel bir alana düştüğünden, kamera ile 600 μm boyutunda bir kare alan uygun bir şekilde gözlenebilmektedir. Bu nedenle, örneğin kanal genişliği 400 μm olduğunda kamera ile yalnızca tek bir kanal tam olarak görüntülenebilmektedir. Maskelerin yerleştirilmesinin hemen ardından 1 dakika boyunca, 20 cm uzaklıktan, 365 nm dalga boyuna sahip UV ışık radyasyonu verilmiştir. Bu radyasyon boyunca, ışığa duyarlı malzemenin özelliğinden ötürü ışığı gören bölgelerde, malzemenin kimyasal yapısı değişecek diğer bölgeler ise aynı kalacaktır. Kullanım kılavuzu doğrultusunda UV ışık radyasyonuna maruz bırakılan yüzey 1 dakika boyunca 90 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tekrar bir pişirme işlemine tabi tutulmuştur. Işığa duyarlı malzeme ile birlikte temin edilen develop edici çözelti bir sprey yardımı

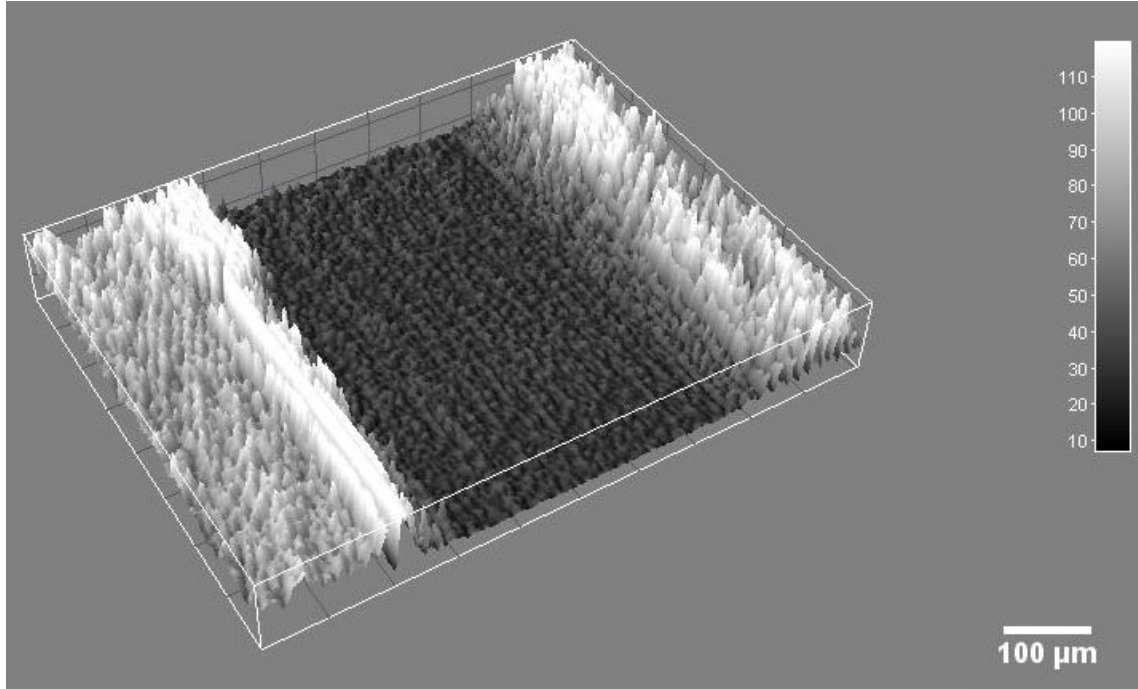
ile 40 saniye süreyle yüzey üzerine püskürtülmüştür. Malzeme hemen ardından etil alkol ile banyo edilmiştir. Azot gazı ile kurutma sonucunda yüzey üzerinde maskeler ile tasarlanan kanal deseni elde edilmiştir.

Şekil 4.20.'de silikon plaka üzerinde ışığa duyarlı malzeme ile elde edilen 400 μm genişliğe sahip kanal fabrikasyonunda kullanılacak kalıbın elipsometrik üç boyutlu görüntüsü görülmektedir. Bu şekilde de görüldüğü üzere kaplama yüksekliği 100 μm iken kanal genişliği yaklaşık olarak 400 μm ' dir. Şekle bakıldığında kanal tasarımı için kullanılması planlanan kalıpta kanal genişliği 400 mm den biraz daha azdır. Bunun nedeni maskenin ışığı geçirmeyen bölgelerinden, ışığın kırılması ve yansımalar sonucunda malzemenin ışığı görmediği tahmin edilen bölgelerinde de değişiklikler meydana gelmesidir. Bununla doğru orantılı olarak, hazırlanan kalıpta kanal genişliği miktar azalmıştır. Bu etki fotolitografi uygulamalarında en sık karşılaşılan problemdir. Bu durum tamamen optik kurallardan kaynaklanmakta olup engellenmesi mümkün değildir. Maske yüzeye tamamen temas ettirilerek etki en aza indirilmiştir.



Şekil 4.20. Kanal tasarımında kullanılacak olan kalıbın elipsometrik 3 boyutlu görüntüsü.

Hazırlanan kalıp alüminyum folyo ile kaplanmış bir petri kabına alınmış, üzerine 10:1 oranında karıştırılan PDMS ve çapraz bağlama ajanı karışımı dökülmüştür. Petri kabı alüminyum folyo ile kaplanmıştır çünkü PDMS çapraz bağlandığında cam veya plastik yüzeylere yapışabilmektedir. Bu yapışma sonucu polimer kalıptan düzgün bir şekilde ayırlamayabilir ve istenilen kanallarda bozukluklar meydana gelebilir. Petri kabı vakumda bekletilerek 10 dakika boyunca gaz giderme işlemi ile karışım hava kabarcıklarından arındırılmıştır. Takiben 100 °C'lik fırında 1 saat boyunca çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir. PDMS kalıptan dikkatli bir şekilde ayrılmış, yüzey üzerinde istenilen mikrokanalların olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.21.'de oluşturulan 400 µm genişlikteki polimerik mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü görünmektedir.

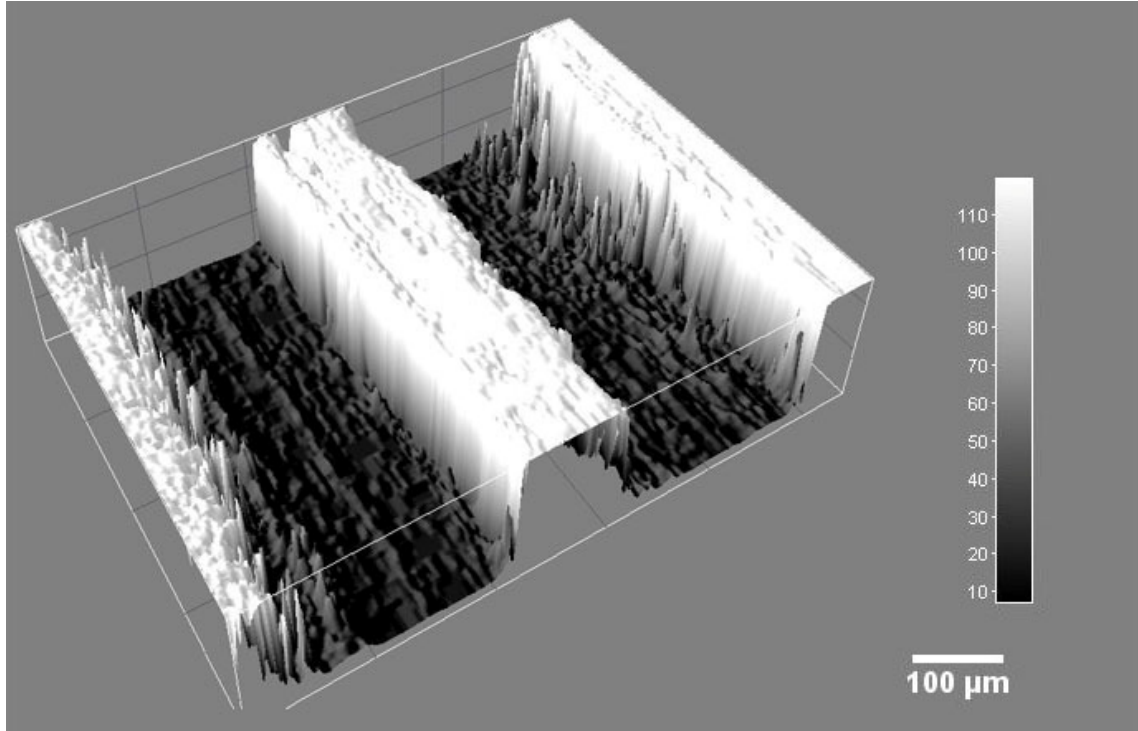


Şekil 4.21. 400 µm genişliğe sahip polimerik mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü

Görüldüğü üzere fotolitografik olarak üretilen kalıp kullanılarak PDMS üzerinde mikrokanal oluşumu gerçekleştirilebilir. Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi kanal genişliği, oluşturulan kalıp tasarımındaki genişlikten bir miktar daha fazladır. Görüntüye bakıldığında, kanalların köşe kısımlarda yüksekliğin bir miktar daha az olduğu gözlemlenmektedir. Bunların nedeni hazırlanan PDMS ve çapraz bağlama ajanı

karışımının kalıp üzerine dökülmesi esnasında kanalların tamamını kaplayamamış olması, köşe kısımlara tam olarak erişilememiş olmasıdır. Bu durum monomer karışımının oldukça viskoz olması nedeniyle mikrokanalları tam olarak doldurmamasının sonucu olabilir.

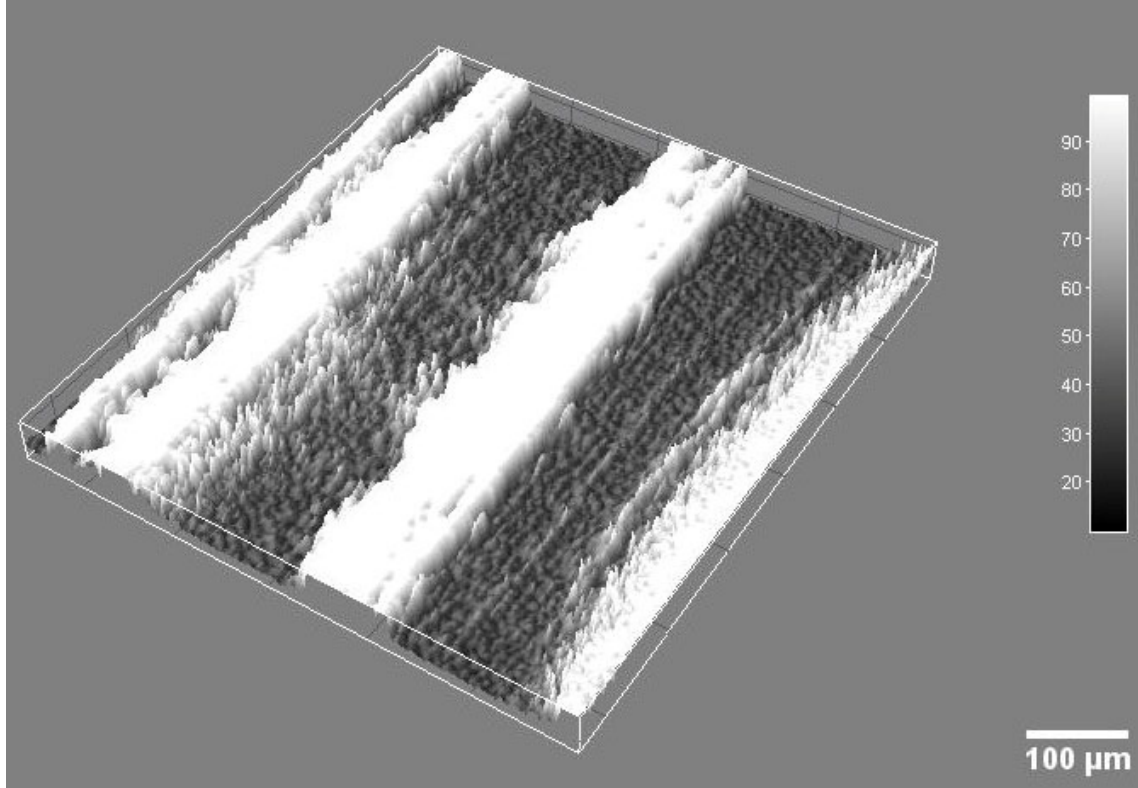
Şekil 4.22.'de aynı yöntemler ile elde edilmiş 200 μm genişliğinde PDMS mikrokanalların elipsometrik görüntüleri görülmektedir. Burada da kanalların arzu edilen kalınlık olan 200 μm 'den biraz daha geniş olduğu gözlemlenmiştir. Yine aynı şekilde bu genişlik artışı da monomer karışımının kalıp üzerindeki tüm boşlukları tamamen dolduramamış olmasıdır. Yine aynı şekilde kanalların köşe kısımlarında kanal derinliğinde azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4.22. 200 μm genişliğindeki polimerik mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü

Burada kanal kenarlarında derinlikteki azalmanın 400 μm kalınlığındaki mikrokanallarda olduğundan daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun sebebi kanal tasarımında boyutun küçülmesinden ötürü monomer karışımının kalıptaki kanalların kenarlarına tam olarak dolamamasıdır.

Şekil 4.23.'de ise 100 μm genişliğe sahip kanallara ait elipsometrik 3 boyutlu görüntü verilmiştir.



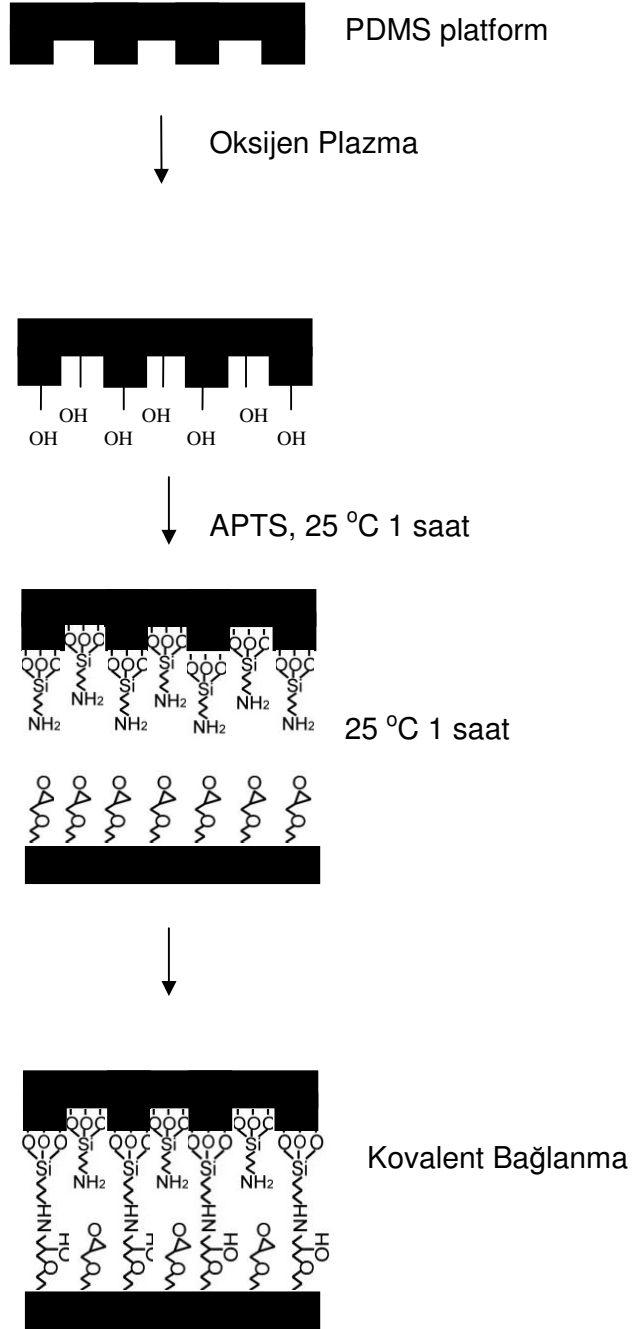
Şekil 4.23. 100 μm genişliğe sahip kanallara ait elipsometrik 3 boyutlu görüntü

Şekil 4.23.'de görüldüğü gibi kanal boyutu 100 μm olması tasarlandığında, küçülen boyutla doğru orantılı olarak kanal kenarlarındaki derinlik azalması artmıştır. Aynı zamanda kanal boyutları 100 μm 'den göreceli olarak oldukça fazladır. Monomer karışımı bu boyutta ana kalıptaki kanal kenarlarına ulaşamamıştır. Bundan kaynaklı olarak kanalların simetrisinde bozukluklar meydana gelmiştir.

Kanal genişliği 400 μm olarak dizayn edildiğinde bu yöntem ile oldukça simetrik kanallar elde edilmekte, kenar kısımlarında derinlik azalması ihmal edilebilecek kadar az olmakta ancak elipsometrenin fiziksel sınırlamaları doğrultusunda aynı anda ancak bir kanal üzerinde çalışılabilmektedir. Kanal genişliği 200 μm olarak dizayn edildiğinde ise yine simetrik kanallar elde edilebilmekte ancak kenar kısımlarda derinlik azalması bir miktar daha fazla olmaktadır. 200 μm kalınlığındaki kanallar ile

elipsometre sisteminde paralel olarak iki kanal kullanılabilir. Genişlik 100 μm olarak ayarlandığında ise elipsometre hücrelerine 3 paralel kanal sığdırılabilir ancak boyut bu kadar küçüldüğünde kanalların simetrisi bozulmakta, istenilen kanal boyutuna ulaşılamamakla beraber kenar kısımlarında kanal derinliğinin azalması sorun teşkil etmektedir. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurularak bu yöntem için optimum kanal genişliği 200 μm olarak seçilmiştir.

200 μm genişliğinde iki adet kanal içeren PDMS yüzey önceden belirtilen fotolitografik yöntem ile üretilmiştir. Rezervuar kısımları oluşturulduktan sonra polimer yüzey, 1 dakika boyunca 100 W gücündeki oksijen plazmaya maruz bırakılmıştır. Plazma işleminin hemen ardından literatür bilgisi doğrultusunda hacmen %1 lik APTS çözeltisine daldırılmış, 1 saatlik daldırma süresinin ardından mutlak etanol ile yıkanmış, azot gazı ile kurutulmuştur (Lee, 2009). APTS ile modifiye edilen polimerik kanalların üstleri önceden belirtilen yöntemler ile sentezlenmiş polimer filmler kullanılarak örtülmüş, 1 saat boyunca bekletilmiştir. Burada amin - epoksi etkileşimi sonucu iki yüzey birbirlerine kimyasal olarak bağlanacaktır (Lee, 2009). Böylelikle kapiler etki sağlanmış ve kanallar içerisinde akış gözlemlenmiştir. Şekil 4.24.'de bu bağlanmanın şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 4.24. Amin - epoksi etkileşimi sonucu iki yüzeyin birbirlerine kimyasal olarak bağlanmasının şematik gösterimi

GMA yüzeyi ve mikrokanalların bulunduğu, APTS ile modifiye edilmiş PDMS yüzeyi arasındaki bağlanma fiziksel olarak gözlemlenmiştir. Böyle bir kanal fabrikasyonunda

kanalların iç kısımlarında GMA yüzeyi üzerinde epoksi grupları reaksiyona hazır halde bulunmaktadır. Bu gruplar ile kanal içerisinde akan protein çözeltileri etkileşebilecektir. Ancak PDMS yüzeyi modifiye edilerek amino grubu ile sonlandırıldığı için herhangi bir etkileşim gözlenmeyecektir. Ayrıca PDMS yüzeyinin amin içeren APTS molekülü ile modifikasyonu sonucu yüzeyin temas açısı ortalama 68.34°'ye düşmüş, GMA polimer filminin temas açısı değerine yaklaşmış ve PDMS'in karakteristik özelliği olan hidrofobiklik azalmıştır. Yani APTS tabakası sayesinde protein etkileşimleri yalnızca GMA yüzeyinde olacak, tabaka kısmen protein birikmelerini engelleyici bir koruyucu katman görevi görecektir.

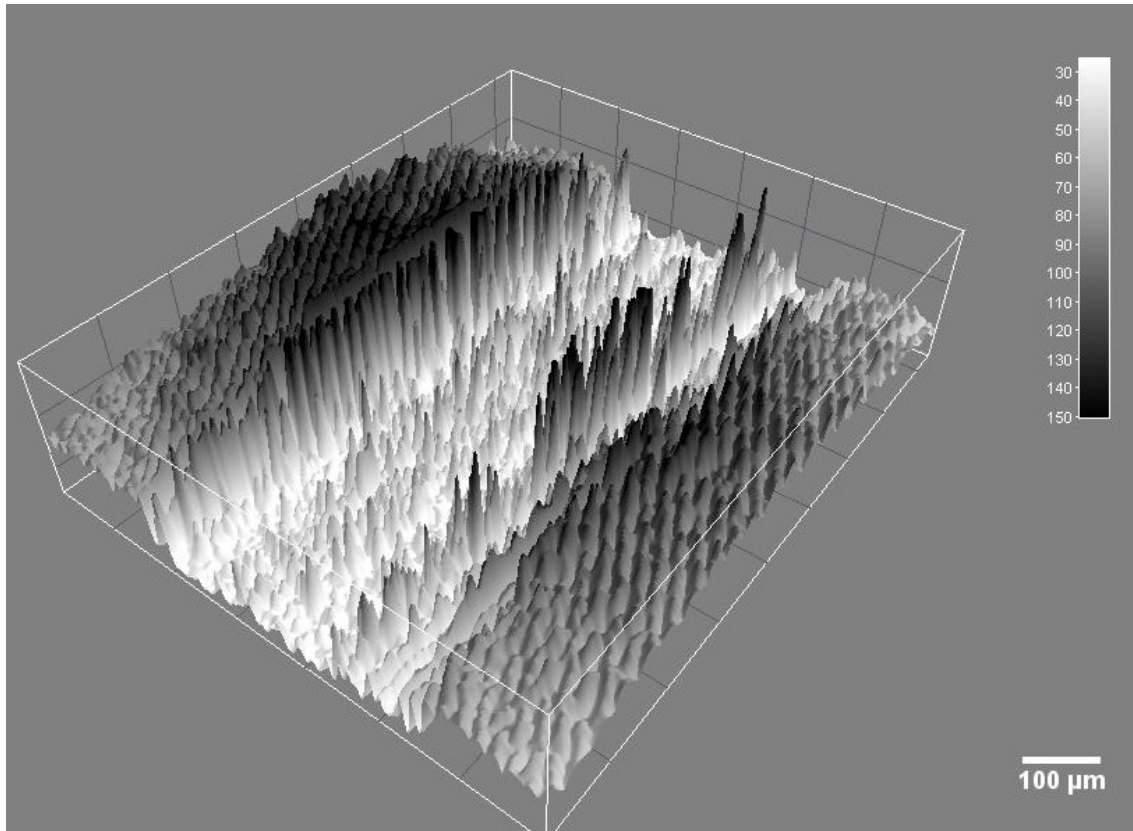
4.1.4. CLiPP metodu ile Mikrokanal Fabrikasyonu

CLiPP metodu ile mikrofabrikasyon son yıllarda geliştirilmiş ve hala gelişme aşamasında olan çok yeni bir yöntemdir. Bu fenomen polimer mikrofabrikasyonuna çok sayıda avantaj sağlayabilecek, güçlü bir teknik olarak gündeme gelmektedir. Örneğin mikrokanal geliştirilmesinde, fabrikasyon süresini saatlerden dakikalara indirebilir. Aynı zamanda dolaylı bir yöntem olmaması, doğrudan fabrikasyona olanak tanınması, kullanılacak malzemelerin çok sayıda olması yöntemin diğer bazı avantajlarıdır. Ancak çok yeni bir yöntem olması hala tam olarak çözümlenemeyen pek çok sıkıntıyı da beraberinde getirmektedir. Örneğin polimerizasyon esnasında oksijen varlığının fabrikasyonu olumsuz etkilemesi, fotolitografik yöntemlerde de sıkça karşılaşılan yarı ışık etkisi (ışığın optik düzeneğe bağlı olarak belli bölgelerde yarı gölge oluşturması) gibi olumsuzluklar bu teknikte hala aşılmaya çalışılan problemlerdir. Bu yöntem günümüz teknolojisinde oldukça pahalı bir sistem olan "maske ayarlayıcı" sisteminin kullanılmasıyla en iyi sonuçları vermektedir. Tez kapsamında bu aşamada CLiPP metodu kullanılarak mikrokanal fabrikasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar süresince fotomaskeler el ile yerleştirilmiştir. Çalışmalar oksijen inhibisyonunu engellemek üzere azot ortamında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle belirlenen oranda hazırlanan monomer - çapraz bağlayıcı - fotobaşlatıcı (GMA – EGDMA – DMPAP) karışımı, siyaha boyanmış bir teflon plaka üzerine yerleştirilen APTS ile modifiye edilmiş cam yüzey üzerine 200 µL hacminde damlatılmıştır. Fotomaskenin, arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde karışım ile

teması sağlanmıştır. Sistemin kapağı kapatılarak azot ortamı oluşturulduktan sonra daha önce optimize edilen polimerizasyon süresi uygulanarak UV ışığa maruz bırakılmıştır. Polimerizasyon sonrası polimerleşmeyen kısımlar çözücü olarak etil alkol kullanılarak uzaklaştırılmış, oluşturulan yüzey azot ile kurutulmuştur. Bu çalışma tasarlanan farklı fotomaskeler için tekrar edilmiştir.

Şekil 4.25.'de CLiPP yöntemi ile 400 μm genişliğinde kanallara sahip olan maske tasarımı kullanılarak hazırlanan mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü görülmektedir.

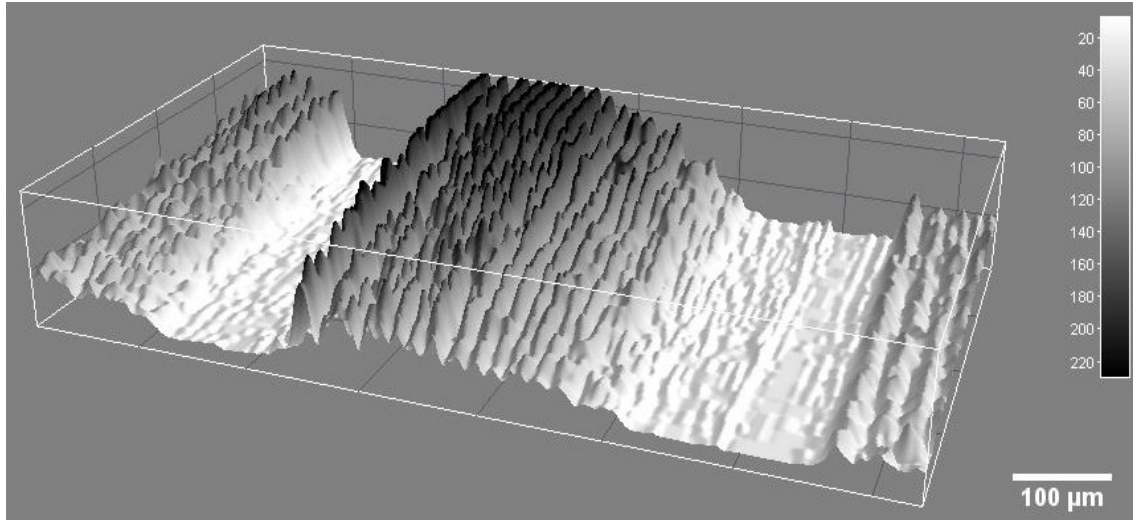


Şekil 4.25. 400 μm genişliğinde hazırlanan mikrokanalların elipsometrik üç boyutlu görüntüsü.

Şekil 4.25.'de görüldüğü gibi, yaklaşık 140 μm derinlik 400 μm genişliğe sahip mikrokanallar CLiPP yöntemi kullanılarak elde edilebilmiştir. Kanal içerisinde ise çeşitli pürüzlerin olduğu açıkça görülmektedir. Bu pürüzler optik bir problem olan yarı ışık etkisinden kaynaklıdır. İstenmemesine rağmen ışığın bir kısmı maskenin opak

bölgesinin altına ulaşarak yarı aydınlık bölgeler oluşturmuş ve bu bölgelerde de kısmi polimerleşmeler gerçekleşmiştir. Kanalların arasındaki bölgelerde ise maske ile temas, maskenin yüzeyden düzgün ayrılamaması, maske üzerinde mevcut olabilecek ve polimere geçmiş olabilecek kirlilikler, maske yüzeyindeki bozukluklar gibi pek çok farkı sebepten kaynaklanabilecek bozukluklar görülmektedir.

Şekil 4.26.'da 200 μm genişlik ve 200 μm kanal aralığına sahip iki kanal içeren maske kullanılarak CLiPP metodu ile üretilen mikrokanalların alınan elipsometrik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.26. 200 μm genişlik ve 200 μm kanal aralığına sahip mikrokanalların elipsometrik görüntüsü.

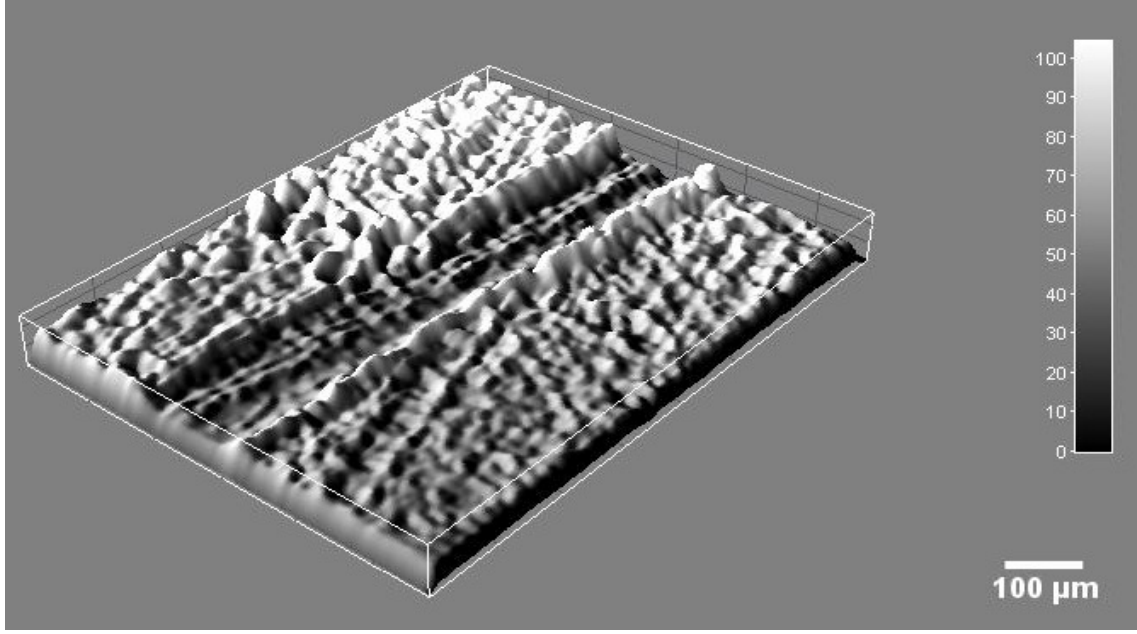
Yukarıda görüldüğü gibi 400 μm kanal boyutuna sahip olan platformun üretiminde karşılaşılan hemen hemen aynı sorunlar 200 mikronluk kanallar için de geçerlidir. Yine aynı biçimde kanallar arası yüzeylerde yükseklik farklılıkları göze çarpmaktadır. Ek olarak kanal boyutu ve kanalların arasındaki uzaklık küçüldüğünde ışık kırılmasına bağlı olarak kanallar arasında daha fazla polimerleşme görülmüştür. Bu durum özellikle sol kanala bakıldığında açıkça görülmektedir. Öz olarak kanal boyutu küçüldüğünde istenilen kanal boyutuna ulaşmak zorlaşmaktadır. Aynı zamanda bu şekilde kanal üretimi yapıldığında kanal kenarlarında sert bir dönüş görülmemekte, kenarlar yuvarlak hatlara sahip olmaktadır. Yine bu durum, ışığın kırılması ile açıklanabilir. Yüzeylerin yerleştirildiği yüzey siyah olduğundan ışığın yansımaları söz konusu olmayacaktır, bu durumda kanal şeklinin tam olarak alınamaması ışığın opak

bölgelerden kırılması, saçılması ile açıklanabilir. Şekil 4.26.'de elde edilen kanalların derinliği, skala incelendiğinde bir önceki tasarıma nazaran yüksektir. Bunun nedeni ise, yüzeye yerleştirilen fotomaske boyutunun, kesimden ötürü farklılık göstermesi ve bunun sonucu olarak, sıvı monomer karışımının üzerine binen ağırlığın değişmesi sonucu meydana gelen kalınlıktaki değişimdir. Şekil 4.27.'de elde edilen kanallardaki bozuklukların mikroskop ile alınmış görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.27. 200 μm genişlik ve 200 μm kanal aralığına sahip mikrokanalların mikroskop görüntüsü

100 μm kanal genişliğine sahip olan tasarımlar ile çalışıldığında kanalların boyutları iyice sapmış, kanallar arası boşlukların boyutları, ışık kırılmasından ötürü büyümüştür. Elde edilen 100 μm genişliğine sahip bir kanal Şekil 4.28.'de gösterilmiştir.



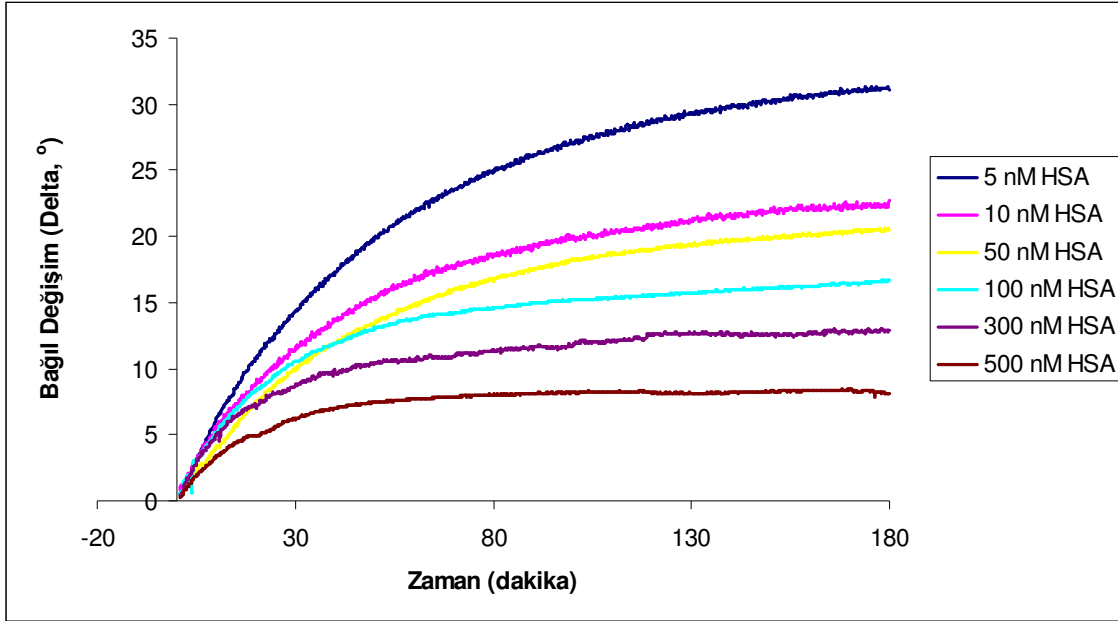
Şekil 4.28. 100 µm genişliğe sahip mikrokanalların elipsometrik görüntüsü

Tüm sonuçlara bakıldığında CLiPP metodu ile oluşturulan tüm mikrokanallar mükemmellikten uzaktır. Bu metoda kanal boyutu azaldıkça, mikrofabrikasyon zorluğu artmaktadır, bununla beraber kanallar arasındaki polimer kalınlığının ışık kırılmaları doğrultusunda arttığı gözlemlenmiştir. CLiPP yöntemi ile mikrokanallar elde edildiğinde kanalların her bir yüzeyi polimer filminden oluşacaktır. Tez çalışmasının ileri aşamalarında bu kanallar kullanılırsa GMA polimeri ile oluşturulan mikrokanalların her bir yüzeyindeki epoksi grupları ile protein molekülleri arasında etkileşim gerçekleşecek, ancak elipsometrik sensör ile yalnızca tek bir kanal yüzeyi incelenebileceğinden, bu durumda, diğer üç kanal duvarına da protein birikmesi olacak ve sensör sinyalinin düşmesi beklenecektir. Tüm bu durumlar göz önüne alınarak CLiPP metodu ile polimerik mikrokanal oluşturulmasından vazgeçilmiş, optimum yöntem olarak PDMS polimeri kullanılarak, fotolitografik yöntemlerin kullanılması ile mikrokanal fabrikasyonu seçilmiş, hazırlanacak tüm array platformları için bu yöntem kullanılmıştır.

4.2. Elipsometre Bazlı Mikroakışkan Sistemleri Kullanan Polimerik Sensör Yüzeylerinin Hazırlanması

4.2.1. Mikroakış Kanallarına Albumin Prob İmmobilizasyonu

PDMS polimeri ile daha önce belirlenen yöntemlerle hazırlanan optimize edilmiş mikrokanallar, üzerleri GMA filmi ile kapatılarak belirtilen yöntemlerle hazırlanmıştır. Delta değişimini etkilememesi adına PBS tampon içerisinde (pH 7.4) şişme dengesine getirilen sistemler elipsometre cihazı akış hücresine yerleştirilmiştir. Albumin – epoksi etkileşiminin optimizasyonu için pH 7.4'lük PBS tamponu ile farklı derişimlerde (5 – 500 nM) hazırlanan Albumin (HSA) çözeltileri akış kanallarına gönderilmiştir. Albumin, GMA yüzeyine epoksi gruplarından kimyasal olarak bağlanmıştır. Bağlanma kinetiği 180 dakika boyunca gözlemlenmiştir. Farklı derişimlerde elde edilen kinetik bağlanma eğrileri Şekil 4.29.'da gösterilmiştir.



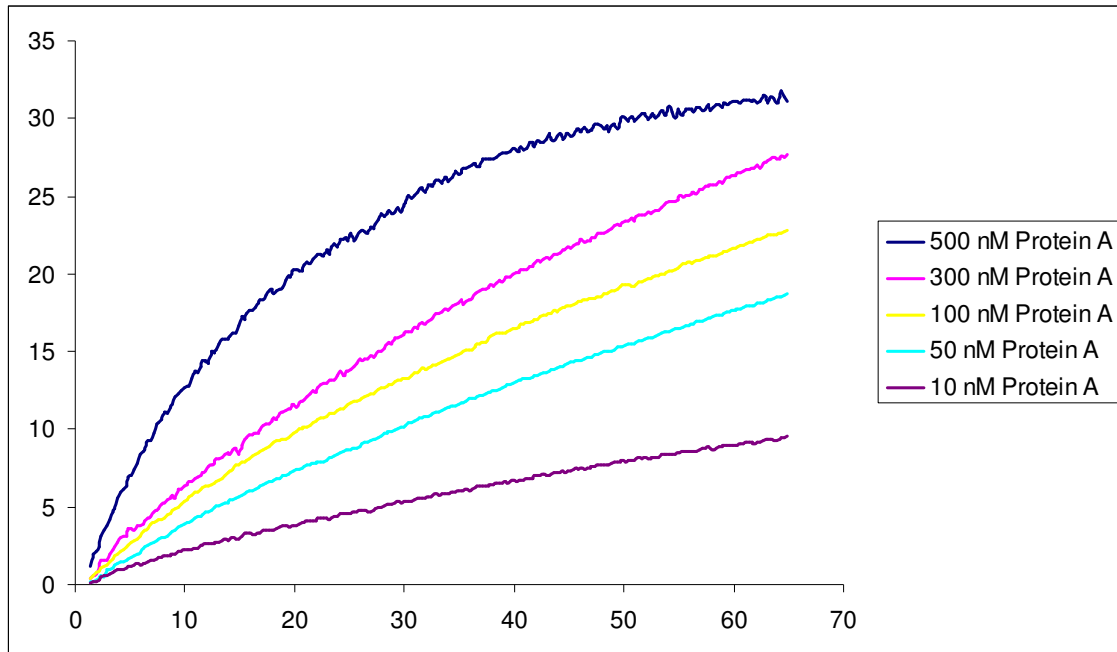
Şekil 4.29. Farklı Albumin derişimlerinde elde edilen kinetik bağlanma eğrileri

Şekil 4.29.'da görüldüğü üzere Albumin derişiminin artması ile bağıl değişim yani delta değeri azalmıştır. 5 nM'lık çözelti mikroakış kanalından geçirildiğinde delta değerindeki değişim yaklaşık olarak 31° civarındadır. Çözelti derişimi 10 nM'a artırıldığında değişim hızla 22° civarına düşmüştür. Derişim beş katına yani 50 nM'a çıkarıldığında ise delta değişimi 20° ye, on katına yani 100 nM'a çıkarıldığında ise

yaklaşık 16°'ye gerilemiştir. Albumin konsantrasyonu 300 nM olduğunda delta değişimi azalmaya devam etmiş, 13° civarına düşmüş, 500 nM'lık bir çözelti kullanıldığında ise 8°'ye kadar düşmüştür. Çözelti derişiminin artması ile birlikte bağıl değişiminde gözlenen düşüş, protein molekül miktarının çözelti içerisinde artması ile yüzeye bağlanma gerçekleşirken meydana gelebilecek sterik engellemelerden ötürü olabilir. Grafik incelendiğinde en düşük derişim değeri olan 5 nM'lık çözelti kullanıldığında 30°'lik bir delta değişimi gözlemlenmiştir. Bu delta değişimi analizler için oldukça yeterli olduğundan, daha yüksek derişimlerde ise daha düşük delta değişimi gözlemlendiğinden 5 nM protein sensör platformunun hazırlanmasında optimum derişim olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Mikroakış Kanallarına Protein A Prob İmmobilizasyonu

Şişme dengesinde bulunan polimerik sensör içerisinde Protein A – epoksi etkileşiminin optimizasyonu için pH 7.4'lük PBS tamponu ile farklı derişimlerde (10 – 500 nM) hazırlanan Protein A çözeltileri akış kanallarına gönderilmiştir. Protein A, hazırlanan mikrok kanalın GMA yüzeyine epoksi gruplarından kimyasal olarak bağlanmıştır. Bağlanma kinetiği 1 saat boyunca gözlemlenmiştir. Farklı derişimlerde elde edilen kinetik bağlanma eğrileri Şekil 4.30.'de gösterilmiştir



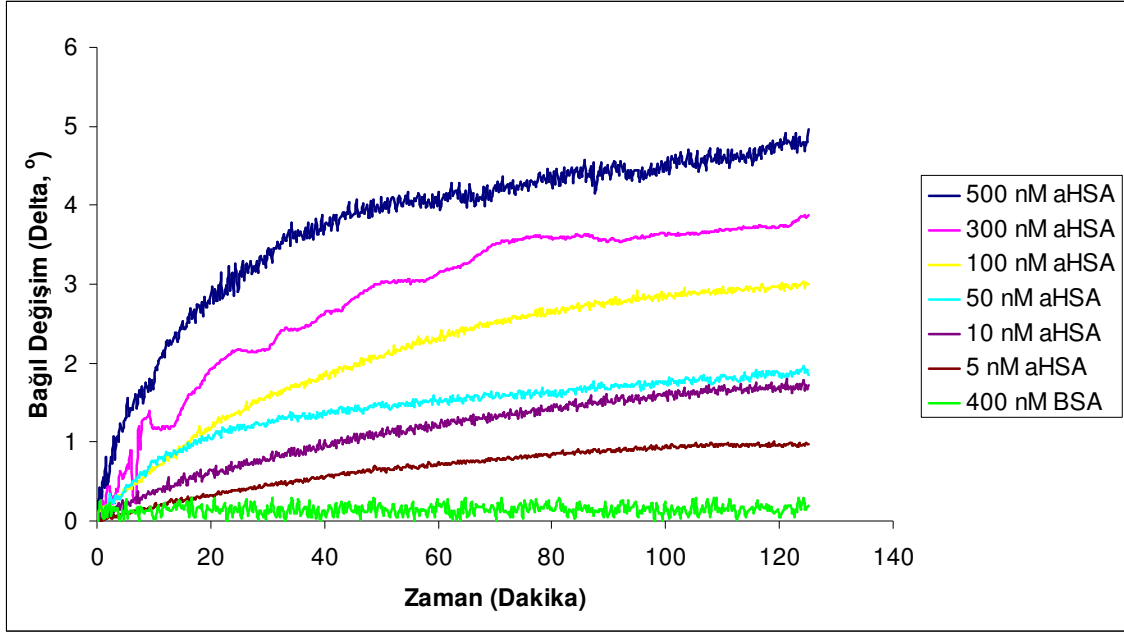
Şekil 4.30. Farklı Protein A derişimlerinde elde edilen kinetik bağlanma eğrileri

Şekil 4.30.'da görüldüğü üzere Protein A derişiminin artması ile bağıl değişim yani delta değişim değeri artmaktadır. 500 nM'lık çözeltili mikroakış kanalından geçirildiğinde delta değerindeki değişim yaklaşık olarak 30° civarındadır. Çözeltili derişimi 300 nM'a düşürüldüğünde değişim 27.7° civarına düşmüştür. Derişim 100 nM'a azaltıldığında ise delta değişimi 22.8°'ye, 50 nM'a azaltıldığında ise yaklaşık 18.7°'ye gerilemiştir. Protein A derişimi 10 nM olduğunda da delta değişimi azalmaya devam etmiş, 9.56° civarına düşmüştür. Protein A oldukça büyük bir moleküler yapıya sahiptir (40 – 60 kDa). Protein çözeltilisinin derişimi azaldıkça bağlanmadaki azalma, çözeltili içerisindeki sürücü kuvvetin azalmasından kaynaklanmaktadır. Grafik incelendiğinde en yüksek derişim değeri olan 500 nM'lık çözeltili kullanıldığında oldukça yüksek bir delta değişimi gözlemlenmiştir. Bu delta değişimi analizler için yeterli olacağından, daha düşük derişimlerde ise daha düşük delta değişimi gözlemlendiğinden 500 nM protein sensör platformunun hazırlanmasında optimum derişim olarak belirlenmiştir.

4.3. Mikroakışkan Kanallı Protein Array Platformlarının Performanslarının Belirlenmesi

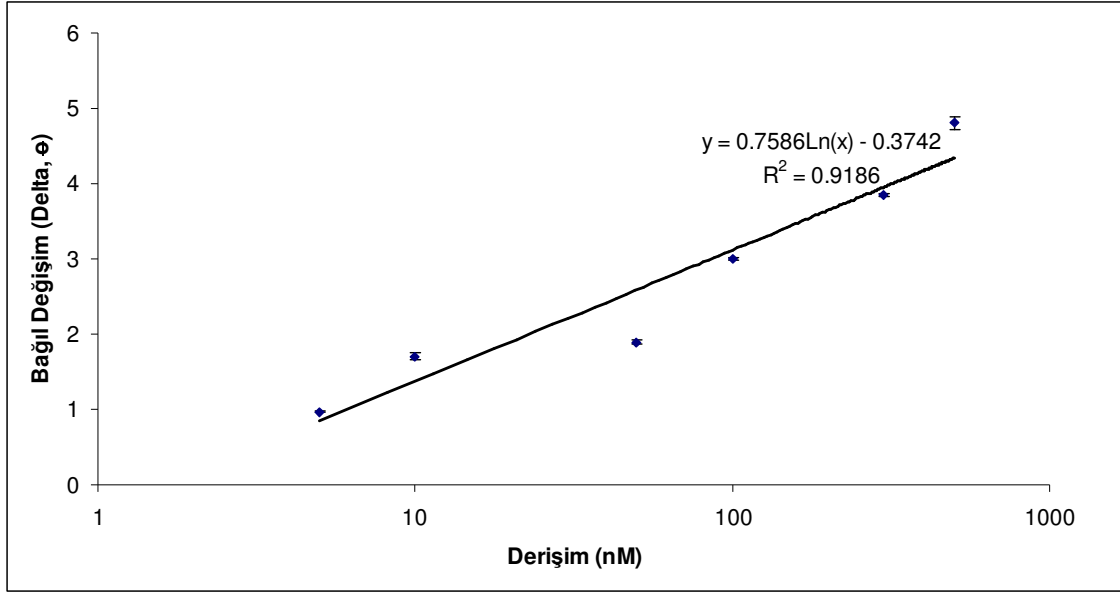
4.3.1. Mikroakışkan Kanallı Albumin Sensörünün Performansının Belirlenmesi

5 nM'lık optimum derişimde Albumin çözeltilisi ile hazırlanan mikroakışkan kanallı platform üzerinde hedef molekül olan anti – Albumin (aHSA) antikoruna ile performans belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan, Albumin immobilize edilmiş kanallar içerisine farklı konsantrasyonlarda (5 nM – 500 nM) anti – Albumin çözeltileri gönderilerek protein - protein (antijen – antikor) etkileşimi iki saat süresince gözlemlenmiştir. Kinetik bağlanma eğrileri Şekil 4.31.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Albumin – anti-Albumin ve Albumin – BSA etkileşimlerinin kinetik eğrileri

Şekil 4.31.'de görüldüğü üzere anti – Albumin (aHSA) antikoru, hazırlanan sensör kanalının spesifik yüzeyine bağlanmış, çeşitli derişimlerde delta değerindeki değişim verilmiştir. Sensör kanalına spesifik olmayan Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin, BSA) molekülü 400 nM gibi görece yüksek bir derişimde gönderilmesine rağmen herhangi bir delta değişimi gözlenmemiştir. Böylelikle sensörün yalnızca anti – Albumin (aHSA) antikoruyla spesifik olduğu gösterilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere aHSA derişimi arttıkça gözlenen delta değişimi artmıştır. 500 nM derişimde aHSA etkileşiminde delta değişimi yaklaşık 5°'dir. Derişim 300 nM'a düşürüldüğünde delta değişimi yaklaşık 3.8°'ye, 100 nM'a düşürüldüğünde ise yaklaşık 1.8°'ye inmiştir. 50 nM'lık derişimde 1.72°'lik bir delta değişimi gözlenirken 10 nM'lık derişime inildiğinde yaklaşık olarak 1°'lik delta değişimi gözlemlenmiştir. Bu verilere bakıldığında delta değişimi, HSA – aHSA etkileşimi süresince HSA – epoksi etkileşiminden farklı bir şekilde seyretmektedir. Optimize edilen HSA immobilizasyon konsantrasyonu 5 nM iken, çok farklı derişimlerde aHSA tanısının yapılabilmesi mümkündür. HSA sensörünün performans analizinin yapılması amacı ile farklı konsantrasyonlarda delta değişimleri incelenmiştir, bu değişimler Şekil 4.32.'de grafiksel olarak yorumlanmıştır.

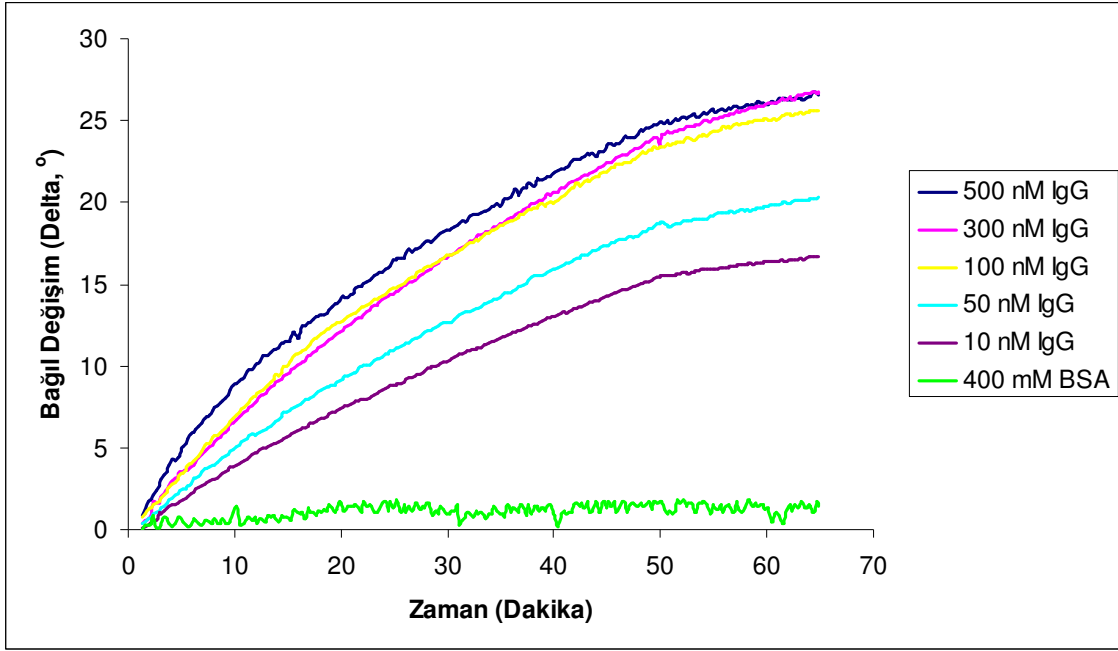


Şekil 4.32. anti – Albumin sensörü için derişim değerlerine karşılık Delta değişimleri

Şekil 4.32.'de görüldüğü üzere, hazırlanan array platformu için regresyon katsayısı 0.9186'dır. Bu değer optimum değer olan 1'e oldukça yakındır. Bu verilere bakıldığında hazırlanan sensör platformunun yarı-logaritmik bir doğru şekilde cevap verdiği görülmüştür. Sensör, belirtilen aralıklarda yüzeye bağlanan molekül miktarı ile doğru orantılı bir cevap üretmektedir.

4.3.2. Mikroakış Kanallı Protein A Sensörünün Performansının Belirlenmesi

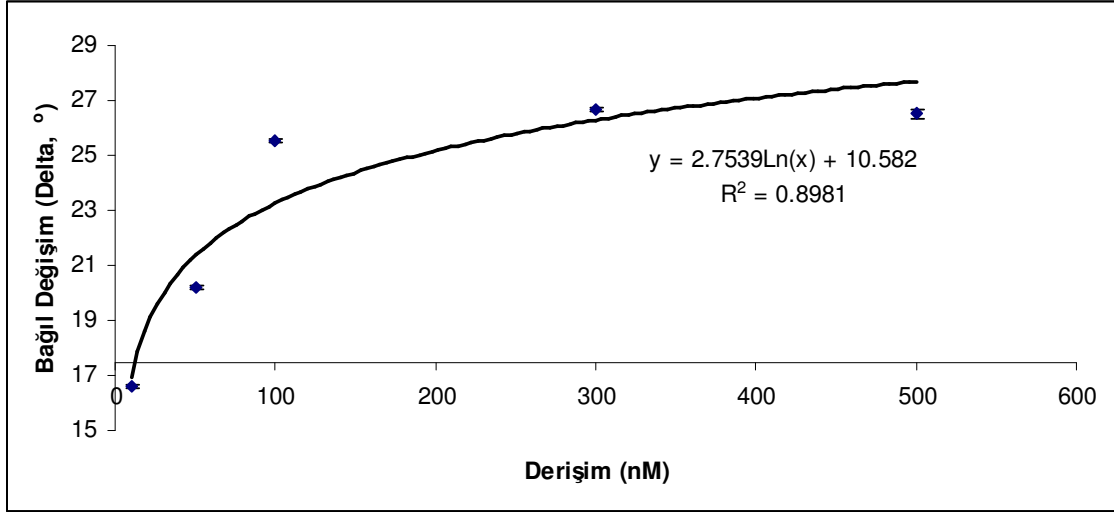
500 nM'lık optimum derişimde Protein A çözeltisi ile hazırlanan mikroakışkan kanallı platform üzerinde hedef molekül olan IgG antikorunu ile performans belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Protein A immobilize edilmiş kanallar içerisinde farklı konsantrasyonlarda (10 – 500 nM) IgG çözeltileri gönderilerek protein - protein (antiijen – antikor) etkileşimi yaklaşık bir saat süresince gözlemlenmiştir. Kinetik bağlanma eğrileri Şekil 4.33.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Protein A - IgG ve Protein A – BSA etkileşimlerinin kinetik eğrileri

Şekil 4.33.'de görüldüğü üzere IgG konsantrasyonunun artması ile delta değişimi artmıştır. 10 nM derişimde IgG gönderildiğinde, etkileşim sonucu alınan delta değişimi değeri yaklaşık 17° civarındadır. 50 nM derişiminde için bu değer hızla 28.3° ye artmıştır. 100 nM derişimde delta değişimi hızla artmaya devam etmiş 25.6° ye yükselmiş, 200 nM derişimde yaklaşık 27° ye ulaşmıştır. En yüksek derişim olan 500 nM'da ise delta değişim değeri yine yaklaşık 27° dir. Hazırlanan platforma 400 nM derişim değerinde BSA çözeltisi gönderilmiş ancak herhangi bir etkileşim (delta değerinde bir değişim) gözlenmemiştir. Bu sayede sensörün IgG antikoruna spesifik tasarlandığı ispatlanmıştır. Düşük konsantrasyonlardan yüksek konsantrasyonlara çıkılırken delta değişim değeri hızla artmıştır. Bu hızlı artış IgG molekülünün büyüklüğüne bağlanabilir. Burada delta değişiminin aHSA bağlanmasındaki delta değişimi değerlerinden oldukça yüksek olmasının nedeni de IgG molekülünün oldukça büyük bir moleküler yapıya sahip olması ile açıklanabilir. Ancak 100 nM, 300 nM ve 500 nM gibi yüksek derişim değerlerinde delta değişimi yaklaşık olarak aynı kalmış ya da birbirlerine çok yakın seyretmişlerdir. Buradaki neden ise bu yüksek konsantrasyonların hazırlanan sensörün üst tayin sınırına yakın olmaları olarak gösterilebilir.

Sensörün performans analizi farklı konsantrasyonlarda delta değişimlerinin grafiksel yorumu ile yapılmıştır. Bu grafik Şekil 4.34.'de görülmektedir.

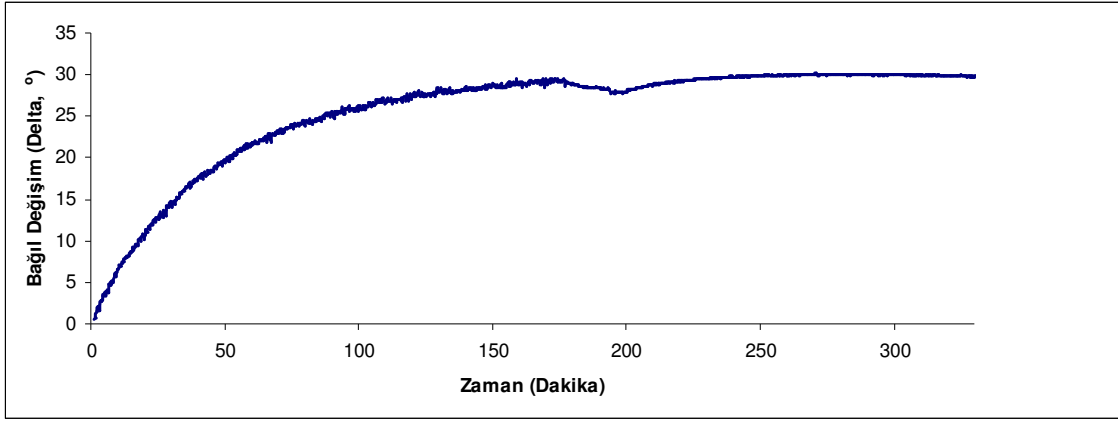


Şekil 4.34. IgG sensörü için derişim değerlerine karşılık Delta değişimleri

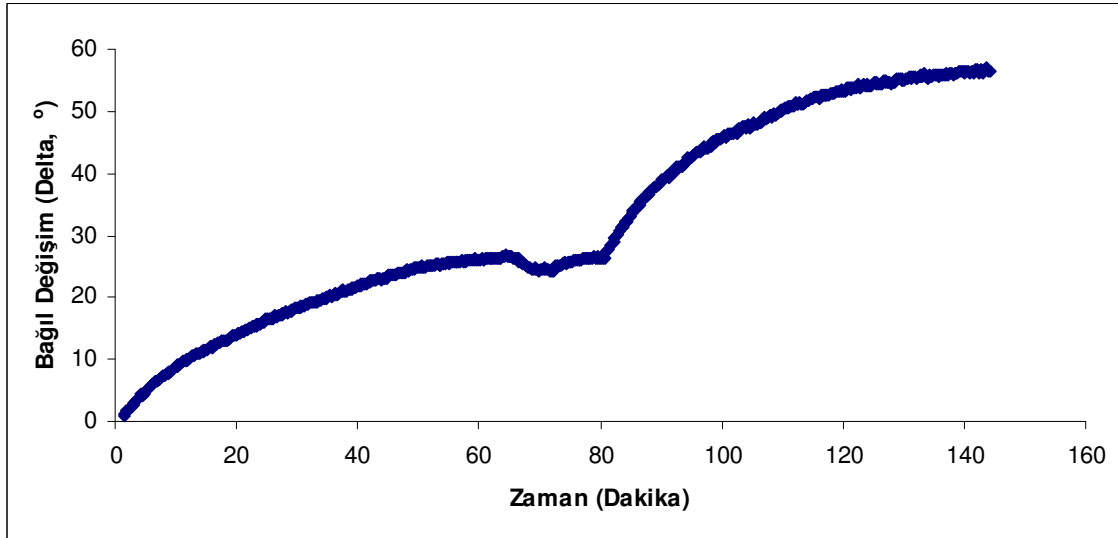
Şekil 4.34.'a göre sensör R^2 değeri 0.8981 olan bir logaritmik cevap vermiştir. Yüksek derişimlerde sensör cevabının doğrusallığı azalmakta ancak düşük derişimlerde doğrusal cevap vermektedir. Bu sensör çipinin 100 nM altında doğrusal cevap verdiği Şekil 4.34.'de görülmektedir. Benzer şekilde, Protein A sensör çipi Albümin sensör çipi gibi logaritmik bir cevap eğrisi oluşturmuştur.

4.3.3. Mikroakış Kanallı Albumin ve Protein A Array Platformlarının Performansının Belirlenmesi

Belirlenen optimum konsantrasyonlarda protein çözeltileri ile elipsometrik sensör cevapları incelenmiştir. Şekil 4.35.'de Albumin – anti-Albumin, Şekil 4.36.'da ise Protein A – IgG etkileşimlerinin kinetik eğrileri verilmiştir.



Şekil 4.35. Albumin – anti-Albumin etkileşiminin kinetik eğrisi



Şekil 4.36. Protein A – IgG etkileşiminin kinetik eğrisi

Şekil 4.35. ve Şekil 4.36.'daki grafiklerden anlaşılacağı üzere, mikrokanallların GMA yüzeylerine Albumin ve Protein A immobilizasyonları oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bu platform üzerine spesifik olmayan bağlanmalardan kurtulmak adına pH 7.4'de PBS tampon çözeltisi gönderilmiştir. Spesifik bağlı olmayan bileşenlerin sökülmesinin ardından anti – Albumin ve IgG çözeltileri kanallardan akıtılmış ve bu antikorların immobilizasyonlarında delta değişimi yani etkileşim gözlemlenmiştir. Albumin – anti-Albumin etkileşimi esnasındaki delta değişimi Protein A – IgG etkileşimi esnasındaki delta değişiminden daha azdır. Bunun nedeni, anti – Albumin antikorunun moleküler boyutunun (yaklaşık 40 – 60 kDa) IgG antikorundan (yaklaşık 150 kDa) daha küçük olmasına bağlanabilir.

Ayrıca moleküler düzenlenmelerden ötürü anti – Albumin antikoru aktif Albumin bölgelerini kapatmış olabilir, bu da delta değişim miktarının az olmasına sebebiyet vermiş olabilir. IgG molekülü Y şeklinde bir antikordur. Protein A ile IgG etkileşimi, IgG molekülünün spesifik bir bölgesinden gerçekleşir, Protein A molekülüne bağlanan IgG dik bir Y harfi şeklinde durur. Bu durumda molekülün aktif Protein A bölgelerini kapatma durumu çok da olası olmamaktadır. Sonuç olarak Protein A – IgG moleküllerinin etkileşimi daha yüksek bir delta değişimi ile sonuçlanmıştır.

5. SONUÇLAR

- Cam mikroskop slaytları için en uygun temizleme yöntemi seçilmiştir. Yöntem slaytların birkaç kez etanol ve su ile yıkanması, ardından hacmen 1:3 oranında H_2O_2 (% 30 v/v) ve H_2SO_4 (%70) içeren çözeltiye 1 dakika boyunca daldırılması, takiben tekrar etil alkol ile durulanıp inert bir gaz olan azot ile kurutulması, sonrasında 1:3 oranında derişik HNO_3 ve H_2O içeren asidik çözeltide 30 dakika boyunca 80 °C'de bekletilmesi, tekrar etanol ile yıkanıp kurutulduktan sonra son olarak 30 dakika süre ile 100 W'lık oksijen plazmaya maruz bırakılması adımlarından oluşacak şekilde belirlenmiştir.
- Temizlenen cam slaytlar literatür ve önceki çalışmaların sonuçlarına dayanarak APTS molekülü ile modifiye edilmiştir. Hacmen %3'lük APTS çözeltisine 2 saat süre ile daldırılan cam slaytların yüzeylerinde APTS mono tabakalarının oluşması sağlanmıştır (Caglayan ve Otman, 2009; Garipcan, 2008).
- APTS ile modifiye edilmiş slaytların üzerinde hacmen yalnızca HEMA, %50 oranında HEMA ve GMA, %75 oranında GMA ve %25 oranında HEMA, sadece GMA içeren polimer filmler, hacmen 1:0,5; 1:1,0; 1:1,5 ve 1:2,0 olmak üzere dört farklı EGDMA oranı kullanılarak çapraz bağlı olarak, fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Her bir sentezde fotobaşlatıcı olarak DMPAP kullanılmıştır. Her bir sentez 200 µL monomer karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir sentezin süresi 120 saniye olarak optimize edilmiştir (Çizelge 4.1.).
- Sentezlenen her bir polimer filmin kuru ve zamana karşı ıslak ağırlıkları ölçülerek zamana karşı şişme dereceleri belirlenmiştir. Şişme deneylerinin sonucunda en çok şişen polimer filmlerin HEMA içeren gruplar olduğu görülmüştür. En fazla şişen filmin en az oranda çapraz bağlayıcı içeren saf HEMA film (yaklaşık %30'luk bir şişme görülmüştür), en az şişen filmin ise en yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren saf GMA film (yaklaşık %5'lik bir şişme gözlemlenmiştir) olduğu belirlenmiştir. Yapıda HEMA bulunmasının şişmeyi oldukça artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2., EK.1., EK 2.).

- Sentezlenen her bir polimer filmin temas açısı değerleri ölçülmüştür. Temas açısı değerleri HEMA içeren polimer filmlerde daha düşük iken, GMA yapısında daha yüksek değerlerdedir. HEMA içeren filmler daha hidrofilitirler. Temas açısı en düşük olan polimer film en az oranda çapraz bağlayıcı içeren saf HEMA film (temas açısı ortalama $51,79^\circ$ olarak belirlenmiştir), temas açısı en yüksek olan filmin ise en yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren GMA film (temas açısı yaklaşık $68,38^\circ$ olarak ölçülmüştür) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.3., Çizelge 4.4., Çizelge 4.6.)
- Şişme deneyleri ve temas açısı ölçümleri sonucunda istenilen özelliklerin yalnızca GMA içeren filmlerde olduğu belirlenmiştir.
- PDMS polimeri kullanım klavuzu doğrultusunda ve Sylgard 184 Silikon Elastomer Kiti içindeki ekipmanlar yardımı ile monomer ve çapraz bağlama ajanı 1:10 oranında karıştırılarak, 100°C 'de 1 saat süre ile pişirilerek çapraz bağlanma sağlanmıştır.
- PDMS polimerinin statik temas açısı $115,73^\circ$ olarak ölçülmüş, bu değer literatür değeri olan $116,6^\circ$ ile karşılaştırıldığında oldukça yakın olduğu görülmüştür.
- Seçilen GMA polimer filmlerinin üç farklı çapraz bağlayıcı oranı için FT-IR-ATR sistemi ile yüzey analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlarda 1700 cm^{-1} civarında ester bandı yaklaşık 847 cm^{-1} ve 904 cm^{-1} de epoksi bandı gözlemlenmiştir. Analiz sonuçları bağlı olarak karşılaştırıldığında GMA oranının artması ile epoksi miktarının da arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17., Şekil 4.18.).
- Çapraz bağlayıcı oranının şişme açısından yüksek olması istenmektedir ancak 1:2,0 oranında çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlenen filmlerin yüzeylerinde bozulmalar meydana geldiğinden 1:1,5 oranında EGMDA içeren GMA filmi optimum malzeme olarak seçilmiştir.
- Literatürde açıkça tanımlanan geleneksel ışığa duyarlı malzeme kullanımı ile PDMS mikrofabrikasyonu için kalıp hazırlama yöntemi uygulanarak 400, 200 ve $100\ \mu\text{m}$ kalınlığa sahip kanal tasarımlarına ait kalıplar oluşturulmuştur (Şekil

4.20.). Bunun için ışığa duyarlı malzeme, temizlenen silikon plaka üzerine döndürmeli kaplama yöntemi ile kaplanmış, istenen tasarımdaki maskeler kullanılarak malzeme UV ışık radyasyonuna 1 dakika boyunca maruz bırakılmış, develop edici çözelti ile yıkanarak istenen kalıp tasarımı elde edilmiştir.

- Hazırlanan kalıplar üzerine Sylgard 184 kiti kullanılarak PDMS monomer ve çapraz bağlama ajanı karışımı (hacmen 10:1 oranında) dökülmüş, hava kabarcıkları vakum uygulanarak uzaklaştırıldıktan sonra tanımlanan yöntem ile (100 °C sıcaklıkta 1 saat) polimer çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlanmadan sonra PDMS kalıptan ayrılarak 400, 200 ve 100 µm'lik mikrokanallar elde edilmiştir (Şekil 4.21., Şekil 4.22., Şekil 4.23.).
- Elde edilen PDMS mikrokanallar elipsometre ile görüntülenerek optimum kanal boyutu 200 µm olarak belirlenmiştir.
- PDMS kanalların üstleri kapatılmak üzere optimum malzeme olarak belirlenen 1:1,5 oranında EGMDA içeren çapraz bağlı GMA filmi kullanılmıştır. PDMS polimeri 1 dakika boyunca oksijen plazmaya tabi tutulduktan sonra literatür bilgisi doğrultusunda %1 lik APTS çözeltisine daldırılmış, 1 saat sonunda APTS monotabaka oluşumu gözlemlenmiştir. APTS ile modifiye edilen PDMS' in temas açısı 68,34° olarak ölçülmüştür. Amin – epoksi etkileşiminden yararlanılarak, APTS ile modifiye edilmiş, mikrokanallar içeren PDMS polimerinin üzeri GMA filmi ile kapatılmış, 1 saat sonunda kovalent bağlanma gerçekleşerek mikrokanallar elde edilmiştir. Bu kanalların içerisinde kapiler etki ile akış gözlemlenmiştir.
- CLiPP metodu uygulanarak belirlenen optimum çapraz bağlayıcı / GMA monomeri oranında sıvı monomer karışımı ile 400, 200 ve 100 µm' lik polimerik mikrokanallar elde edilmiştir (Şekil 4.25., Şekil 4.26., Şekil 4.27., Şekil 4.28.). Bu kanalların elipsometrik görüntüleri yorumlandığında ve PDMS kanallar ile karşılaştırıldıklarında kullanışlı olmadıklarına karar verilmiş, optimum kanal oluşturma yönteminin silikon elastomer ile fotolitografik yöntemleri kullanarak mikrofabrikasyon olduğu belirlenmiştir.

- PDMS ve GMA çapraz bağlı polimerleri ile elde edilen mikrokanallara pH 7.4'lük PBS tamponu ile 5-500 nM aralığında farklı derişimlerde hazırlanan Albumin (İnsan Serum Albumini) çözeltileri gönderilerek, epoksi – protein etkileşimi ile proteinlerin spesifik olarak belirlenmiş bir kanal yüzeyine (GMA polimerinden oluşan kanal yüzeyi) epoksi – amin etkileşimleri doğrultusuna bağlanması sağlanmıştır. Bu etkileşimler elipsometre ile 180 dakika boyunca gözlemlenmiştir (Şekil 4.29.). Delta değışimleri göz önüne alındığında en yüksek delta değışimi 5 nM'lık çözelti ile gözlemlenmiş, bu derişim optimum olarak belirlenmiştir.
- PDMS ve GMA çapraz bağlı polimerleri ile elde edilen mikrokanallara pH 7.4'lük PBS tamponu ile 5-500 nM aralığında farklı derişimlerde hazırlanan Protein A çözeltileri gönderilerek, epoksi – protein etkileşimi ile proteinlerin spesifik olarak belirlenmiş bir kanal yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Bu bağlanma elipsometre ile 60 dakika boyunca gözlemlenmiştir (Şekil 4.30.). Delta değışimleri göz önüne alındığında en yüksek delta değışimi 500 nM'lık çözelti ile gözlemlenmiş, bu derişim optimum olarak belirlenmiştir.
- 5 nM'lık İnsan Serum Albumini (HSA) çözeltisi kullanılarak ile hazırlanan sensör kanallarına 5 – 500 nM aralığında anti-HSA ve 400 nM BSA çözeltileri gönderilmiştir. Etkileşim TIRE yöntemi ile gözlemlenmiştir. BSA çözeltisi gönderildiğinde herhangi bir etkileşim gözlemlenmemiştir, yani delta değışimi yoktur. Böylelikle sensörün seçiciliği tanımlanmıştır. HSA – aHSA etkileşimleri sonucu gözlenen delta değışimleri ile sensörün doğrusal olarak çalıştığı gözlemlenmiştir, yani aHSA derişimi arttıkça delta değışimi artmaktadır. Delta değerindeki en büyük değışim 500 nM aHSA çözeltisi kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.31.). Hazırlanan HSA sensörünün cevabı yarı logaritmiktir (Şekil 4.32.). Sensörün yalnızca a-HSA molekülüne spesifik olduğu gösterilmiştir.
- 500 nM'lık Protein A çözeltisi kullanılarak ile hazırlanan sensör kanallarına 5 – 500 nM aralığında IgG ve 400 nM BSA çözeltileri gönderilmiştir. Etkileşim TIRE yöntemi ile gözlemlenmiştir. BSA çözeltisi gönderildiğinde herhangi bir etkileşim gözlemlenmemiştir, yani delta değışimi yoktur. Böylelikle sensörün seçiciliği tanımlanmıştır. Protein A – IgG etkileşimleri sonucu gözlenen delta değışimleri ile sensörün tayin aralığı gözlemlenmiştir. Delta değışimi IgG derişimi arttıkça

artmıştır ancak yüksek derişimlerde delta değişimi birbirine oldukça yakındır. 300 nM ve 500 nM derişimlerde, delta değişimi hemen hemen aynıdır. Bu veriler doğrultusunda sensörün üst tayin limiti 500 nM olarak belirlenmiştir. Alt limit ise 10 nM IgG'dir. En yüksek delta değişimi 500 nM'lık IgG gönderildiğinde elde edilmiştir ve Protein A – IgG etkileşiminde delta değişimi, HSA – aHSA etkileşiminde gözlenen delta değerinden yüksektir (Şekil 4.33). Alınan sensör cevabı logaritmiktir (Şekil 4.34.). Sensörün yalnızca IgG molekülüne spesifik olduğu gösterilmiştir.

- Son olarak array platformları oluşturulmuş ve belirlenen tayin sınırları içerisinde optimum değerlerde antijen – antikor etkileşimleri TIRE yöntemi ile gözlemlenmiştir (Şekil 4.35 ve Şekil 4.36.).

KAYNAKLAR

- Agarwal, G., Naik, R.R., Stone, M.O. J. Am. Chem. Soc., 125: 7408, 2003.
- Alcala, P., Ferrer-Miralles, N., Feliu, J.X., Villaverde, A., Biotechnology Letters, 24(19):1543-1551, 2002.
- Al-Khaldi, S.F., Mossoba, M.M., Ismail, A.A. and Fry, F.S., Foodborne Path. Dis., 1: 172, 2004.
- Allain, L.R., Stratis-Cullum, D.N. and Vo-Dinh, T. Anal Chim. Acta., 518: 77, 2004.
- Andersson, H.; van den Berg, A.; Microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities, Lab on a chip, 4 (2), p.98-103, 2004.
- Azzam R.M.A., Bashara, N.M., Ellipsometry and Polarized Light, North-Holland, Amsterdam, 1977.
- Balazs, I., Beekman, J., Neuweiler, J., Liu, H., Watson, E. and Ray B., Human Immun., 62: 850, 2001.
- Barron, J.A., Young, H.D., Dlott, D.D., Darfler, M.M., Krizman, D.B. and Ringeisen B.R. Proteomics, 5: 4138, 2005.
- Becker, H.; Gärtner, C.; Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications, Electrophoresis, 21 (1), p.12-26, 2000.
- Bertsch, A., Heimgartner, S., Cousseau, P., Renaud, P., Proc. MEMS 2001, Interlaken, 507, 2001.
- Bohm, S., Greiner, K., Schlautmann, S., de Vries, S., Van der Berg, A., Proc. μ TAS, 25, 2001.

Boozer, C; Kim, G.; Cong, S.; Guan, H.; Londergan, T.; Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies, *Current opinion in biotechnology*, 17 (4), p.400-405, 2006.

Caglayan, M.O.; Sayar, F.; Demirel, G.; Garipcan, B.; Otman, B.; Celen, B.; Piskin, E., Stepwise formation approach to improve ellipsometric biosensor response, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5 (2), p.152-161, 2009.

Cahn, T.M., *Biosensors*, Chapman and Hall, New York. Caldwell, NJ, 458 pp., 1993.

Chaudhari, A., Wounderberg, T., Ablin, M., Goodson, K., *Micro Electro Mechanical Systems*, 7, 918, 1998.

Cheng, Ji-Yen; Chen, Huai-Yi; Microfluidic Array Synthesizer (MArS) for rapid preparation and hybridization of custom DNA microarray, *Biotechnology and Bioengineering*, 104 (2), p.400-407, 2009.

Chuang, H.S.; Wereley, S.; Design, fabrication and characterization of a conducting PDMS for microheaters and temperature sensors, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19 (4), p.045010, 2009.

Daniel, J., Millington, S., Moore, D., Lowe, C., Leslie, D., Lee, M., Pearce, M., *Sens. Actuators, A* 81, 1998.

De Bruijn, H.E., Kooyman, R.P.H., Greve, J., *Appl. Op.*, 31 440-442., 1992.

Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., *Curr. Microbiol*, 45:250-254, 2002.

Demers, L.M., Ginger, D.S., Park, S.J., Li, Z., Chung, S.W., Mirkin, C.A. *Science*, 296: 1836, 2002.

- Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M. and Hohesiel, J.D., *Nucleic Acid Res.*, 29: e38, 2001.
- Ding, L., Li, Y., Chu, H.B., Li, X.M., Liu, J., Creation of cadmium sulfide nanostructures using AFM dip-pen nanolithography, *J Phys Chem B*;109:22337 – 22340, 2005.
- Dodge, A.; Brunet, E.; Chen, S.; Goulpeau, J.; Labas, V.; Vinh, J.; Tabeling, P.; PDMS-based microfluidics for proteomic analysis, *The Analyst*, 131 (10), p.1122 1128, 2006.
- Espina, V.; Woodhouse, E.C.; Wulffkuhle, J.; Asmussen, H.D.; Petricoin, E.F.; Liotta, L.A.; Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies, *Journal of Immunological Methods*, Volume 290, Issues 1-2, Pages 121-133, 2004.
- Estrela, P.; Paul, D.; Li, P.; Keighley, S.D.; Migliorato, P.; Laurenson, S.; Ferrigno, Evans, D., Liepmann, D., Pisano, A.P., *Proceedings of MEMS*, Nagoya, Japan, 1997.
- Evtushenko, Y. M.; Ivanov V. M. ; Zaitsev B. E.; Determination of Epoxide and Hydroxyl Groups in Epoxide Resins by IR Spectrometry, *Journal of Analytical Chemistry*, Volume 58, Number 4, 347-350, 2003.
- Fedoseev, M.; Gurina M.; Sdobnov, V.; Kondyurin, A.; Study of the Reaction of Epoxides with Carboxylic Acids by IR and Raman Spectrometry, *Journal of Raman Spectroscopy*, Vol. 27, 413 – 418, 1996.
- Fu, A.Y., Spence, C., Arnold, G.H., Quake, S.R., *Nature Biotechnol.*, 17, 1109, 1999.
- Garipcan, B., Preparation and Use of Single And Multichannel Ellipsometry Based Sensor Surfaces Carrying Oligonucleotide and Oligopeptide Probes, *Doctoral Thesis*, 2008.

- Gervais, L., Delamarche, E. Toward one-step point-of-care immunodiagnostics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates. *Lab Chip*. 7;9(23) : 3330-7, 2009.
- Gizeli, E. and Lowe, C.R., *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 66–71, 1996.
- Gonsalves, K.E.; Halberstadt, C.R., Laurencin, C.T., Nair, L.S. editors. *Biomedical Nanostructures*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.
- Gropler, R.J. ,Molecular imaging will replace myocardial perfusion imaging, *Journal of Nuclear Cardiology*, 15 (3), p.429-434, 2008.
- Gu, J., Yam, C.M., Li, S. and Cai, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 8098, 2004.
- Hampton, J.R., Dameron, A.A., Weiss, P.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 1648, 2006.
- Haraldsson K.T., *Fabrication of Polymeric Microfluidic Devices via Photocurable Liquid Monomers*, KTH- Royal Institute of Technology Department of Chemical Engineering and Technology Fibre and Polymer Technology, Doctoral Thesis, 2005.
- Haraldsson, K.T., Hutchison, J.B., Sebra, R.P., Good, B.T., Anseth K.S., Bowmana, C.N., 3D polymeric microfluidic device fabrication via contact liquid photolithographic polymerization (CLiPP), *Sensors and Actuators B* 113 454–460, 2006.
- Harrison, D., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z., Effenhauser, C., Manz, A., *Science*, 261, 895, 1993.
- Harrison, D., Manz, A., Glavina, P., *Transducers*, 917, 92, 1991.
- Henshaw M. *First impressions: the early history of lithography:a comparative survey*, *Artonview*, (33):33-38, 2003.

- Hoh, J.H., Hansma, P.K. Trends Cell Bio., 2: 208, 1992.
- Horbett, T.A., Brash, J.L., Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications, American Chemical Society, Washington DC, 112–128, 1995.
- Hou, S., Li, Z., Li, Q., Liu, Z.F. Applied Surface Science, 222: 338, 2004.
- Hutchison, J.B.; Haraldsson, K.T.; Good, B.T.; Sebra, R.P.; Luo, N.; Anseth, K.S.; Bowman, C.N.; Robust polymer microfluidic device fabrication via contact liquid photolithographic polymerization (CLiPP); Lab on a chip, 4 (6), p.658-662, 2004.
- Iqbal, S.S.; Mayo, M. W.; Bruno, J. G.; Bronk, B. V.; Batt, C.A. and Chambers, J.P.; A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, Biosensors and Bioelectronics, 15:549-578, 2000.
- Jacobson, S., Hergenroder, R., Koutny, L., Warmack, R., Ramsey, J., Anal. Chem, 66, 1107, 1994.
- Jordan, C.E., Frey, B.L., Kornguth, S., Corn, R.M., Langmuir, 10(10):3642-3648, 1994.
- Juncker, D., Schmid, J., Drechsler, U., Wolf, H., Wolf, M., Michel, B., de Rooij, N. and Delamarche, E., Autonomous microfluidic capillary system., Anal. Chem., 74, 6139-6144, 2002.
- Kang, L.; Chung, B.G.; Langer, R.; Khademhosseini, A.; Microfluidics for drug discovery and development: From target selection to product lifecycle management, Drug Discovery Today, 13 (1), p.1-13, 2008.
- Kim, J.M., Ohtani, T., Sugiyama, S., Hirose, T., Muramatsu, H. Anal. Chem., 73: (24), 5984, 2001.
- Kitova, A.E., Kuvichkina, T.N., Il'yasov, P.V., Arinbasarova, A.Y., Appl. Biochem. Microbiol., 38:500-505, 2002.

- Klaus, J. W., Sneh, O., George, S. M. *Science*, 278: 1934-1936, 1997.
- Knight, J., Vishwanath, A., Brody, J., Austin, R., *Phys. Rev. Lett.*, 80, 3866, 1998.
- Köhler, J.M., Csáki, A., Reichert, J., Möller, R., et al., *Sens. Actuators, B*, 76 (13):166-172, 2001.
- Köhler, S., Belkin, S., Schmid, R.D., *Anal. Bioanal. Chem.*, 366(6-7):769-779, 2000.
- Kopp, M., De Mello, A., Manz, A., *Science*, 280, 1046, 1998.
- Kramer, S., Fuierer, R. R. and Gorman, C. B., *Chem. Rev.* 103: 4367, 2003.
- Kunita, M.H.; Rinaldi, A.W.; Giroto, E.M.; Radovanovic, E.; Muniz, E.C.; Rubira, A.F.;
Grafting of Glycidyl Methacrylate Onto Polypropylene Using Supercritical
Carbon Dioxide, *European Polymer Journal*, Volume 41, Issue 9, Pages 2176
– 2182, 2005.
- Kwakye, S. and Baeumner, A., *Anal. Bioanal. Chem.*, 376:1062-1068, 2003.
- Lai, S., *Design and Fabrication of Polymer Based Microfluidic Platforms for Biomems
Applications*, The Ohio State University, 2003.
- Lee, N.Y.; Chung, B.H.; Novel Poly(dimethylsiloxane) Bonding Strategy via Room
Temperature “Chemical Gluing”, *Langmuir* 25, 3861-3866, 2009.
- Li, P.C.H., *Microfluidic Lab-on-a-Chip for Chemical and Biological Analysis and
Discovery*, CRC Taylor & Francis, *Chromatographic Science Series*, Volume
94, 2005.
- Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I., *Sensors and Actuators*, 4:299-304, 1983.
- Liedberg, B., *Sensors and Actuators, B*, 11:63-72., 1993.

- Liu, M., Liu, G., H. Langmuir, 21: 1972, 2005.
- Lyuksyutov, S. F., Paramanov, P.B., Dolog, I., Ralich, R.M. Nanotech. 14, 2003.
- Madou M., Fundamentals of Microfabrication, CRC Pres, 2000.
- Major, R. C., Zhu, X. Y. Langmuir, 17: 5576-80, 2001.
- Mallik, R., Jiang T., and Hage D.S., High-Performance Affinity Monolith Chromatography: Development and Evaluation of Human Serum Albumin Columns, Anal. Chem. 76, 7013-7022, 2004.
- Manz, A., Harrison D., Verpoorte E., Fettinger J., Pausus A., Ludi H., Widmer H., J. Chromat., 593, 253, 1992.
- Marsh, R.J., Jones, R.A.L., Sferrazza, M., Colloid Surf. B 23 31–42., 2002.
- Matsubara, K., Kawata, S., Minami, S., Appl Spectrosc, 42:1375-1379. , 1988.
- McKendry, R., Huck, W.T.S., Weeks, B., Fiorini, M., Abell, C., Rayment, T. Nano Lett., 2: 7, 713, 2002.
- Melendez, J., Carr, R., Bartholomew, D., Taneja, H., Yee, S.S., Jung, C., Furlong, C., Sensors and Actuator,s B, 38-39:375-379, 1997.
- Menz W, Mohr J, Paul O. The LIGA process, Microsystem Technology, Wiley - VCH; p 285-350, 2001.
- Minteer, S.D., Microfluidic Techniques, Reviews and Protocols, Humana Press Inc, 2006.
- Mitchell, R.J. and Gu, M.B., Appl. Microbiol. Biotechnol.,Online First, 2003.
- Morhard, F., Pipper, J., Dahint R., and Grunze, M. Sens. Act. B , 70: 232, 2000.

- Nallani, A.K., Chen, T., Hayes, D.J., Che, W.S. and Lee J.B. *J. Lightwave Tech.*, 24: 1504, 2006.
- Namira, E., Hayashida, T., Arakawa, T., *Sensors and Actuators B*, 24-25:142-144, 1995.
- Northrup, M., Benett, B., Hadley, D., Lander, P., Lehew, S., Richards, J., Stratton, P., *Anal. Chem*, 70, 918, 1998.
- Noy, A., Miller, A.E., Klare, J.E., Weeks, B.L., Woods, B.W., DeYoreo, J.J. *Nano Lett.*, 2: 2, 109, 2002.
- P.K.; Label-Free Detection of Protein interactions with peptide aptamers by open circuit potential measurement, *Electrochimica Acta*, 53 (22), p.6489-6496, 2008.
- Park, J., Lee, H. *Materials Science and Engineering C*, 24: 311, 2004.
- Patrick Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford University Press, 2005.
- Poksinski, M., Dzuho, H., Järrhed, J.O., Arwin, H., *Proceedings of the XIV Eurosensors on Total Internal Reflection Ellipsometry*, Copenhagen, Denmark, 2000.
- Quist, A.P.; Pavlovic, E.; Oscarsson, S., Recent advances in microcontact printing, *Anal Bioanal Chem*, 381: 591–600, 2005.
- Raab, A., Han, W., Badt, D., Smith-Gill, S.J., Lindsay, S.M., Schindler, H., Hinterdorfer, P. *Nature Biotechnology*, 17: 901, 1999.
- Renaud, P., Seger, U., Gawad, S., *Proc. Nanotech*, Montreux, 2002.
- Reyes, D., Iossifidis, D., Auroux, P.A., Manz, A., *Anal. Chem.*, 74, 2623, 2002.

- Robinson, G.A., *Biosens. Bioelectron.*, 6:183–191, 1991.
- Rodriguez, I., Spicar-Mihalic, P., Kuyper, C.L., Fiorini, G.S., Chiu, D.T., Rapid prototyping of glass microchannels, *Anal. Chim. Acta*, 496, 205–215, 2003.
- Rowan, B., Wheeler, M.A. and Crooks, R.M. *Langmuir*, 18: 9914, 2002.
- Rozhok, S., Shen, C.K.F., Littler, P.L.H., Fan, Z.F, Liu, C., Mirkin, C.A. and Holz, R.C. *Small*, 4: 445, 2005.
- Samel, B., *Novel Microfluidic Devices Based on a Thermally Responsive PDMS composite*, KTH, Sweden, 2007.
- Sheehan, P.E., Edelstein, R.L., Tamanaha, C.R. and Whitman L.J., A simple pen spotting method for arraying biomolecules on solid substrates *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 18, Issue 12, 15, Pages 1455-1459, 2003.
- Smith, K. R., Lewis, A. P., Weiss, S. P. *Progress in Surface Science*, 75: 1-68, 2004.
- Sun, Y. S.; Landry, J. P.; Fei, Y.Y.; Zhu, X.D.; *Macromolecular Scaffolds for Immobilizing Small Molecule Microarrays in Label-Free Detection of Protein – Ligand Interactions on Solid Support*, *Anal. Chem*, 81, 5373 – 5380, 2009
- Togo, M. ; Takamura, A. ; Asai, T. ; Kaji, H.; Nishizawa, M.; *An enzyme-based microfluidic biofuel cell using vitamin K3-mediated glucose oxidation*, *Electrochimica Acta*, 52 (14), p.4669-4674, 2007.
- van der Heijden, T., Moreno-Herrero, F., Kanaar, R., Wyman, C., Dekker, C. *Nano Lett.*, 6: (12), 3000, 2006.
- Vo-Dinh, T. and Cullum, B., *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(67):0540-0551, 2000.
- Vo-Dinh, T., Cullum, B.M., Stokes, D.L., *Sens. Actuators, B*, 74 (1-3):2-11, 2001.

- Wang, B., Chen, L., Abdulali-Kanji, Z., Horton, J.H., Oleschuk, R.D., Aging effects on oxidized and amine-modified poly(dimethylsiloxane) surfaces studied with chemical force titrations: Effects on electroosmotic flow rate in microfluidic channels, *Langmuir*, 19, 9792–9798, 2003.
- Wang, J.; Ren, L.; Li, L.; Liu, W.; Zhou, J.; Yu, W.; Tong, D.; Chen, S.; Microfluidics: a new cosset for neurobiology, *Lab on a chip*, 9 (5), p.644-652, 2009.
- Wang, J.; Wu, W.; Swelling behaviors, tensile properties and thermodynamic studies of water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/epoxy methacrylate copolymeric hydrogels, *European Polymer Journal*, 41, 1143–1151, 2005.
- Wang, P.-C.; Gao, J.; Lee, C.S., High-resolution chiral separation using microfluidics based membrane chromatography, *Journal of Chromatography A*, 942 (1), p.115-122, 2002.
- Weigl, B., Yager, P., *Science*, 283, 346, 1998.
- Weigl, B.; Domingo, G.; Labarre, P.; Gerlach, J.; Towards non- and minimally instrumented, microfluidics-based diagnostic devices, *Lab on a chip*, 8 (12), p.1999-2014, 2008.
- Westphal, P., Bornmann, A., *Sens. Actuators B* 84, 278–282., 2002.
- Whitesides, G.M., *Self-Assembly at All Scales*, et al. *Science* 295, 2418, 2002.
- Wilber, J. L., Whitesides, G. M., “Nanotechnology”, G. Timp, ed., Springer-Verlag, Germany, 1999.
- Xiang, Q., Hu, G., Gao, Y., Li, D., Miniaturized immunoassay microfluidic system with electrokinetic control, *Biosens Bioelectron.* 15;21(10):2006-9, 2006.

- Yung, T.K.F.; Chan, K.C.A.; Mok, T.S.K.; Tong, J.; To, Ka-Fai; Lo, Y.M.D., Single molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15 (6), p.2076-2084, 2009.
- Zasadzinski, J.A.; Viswanathan, R.; Madsen, L.; Garnaes, J.; Schwartz, D.K. *Langmuir - Blodgett Films, Science Reprint Series*, 263, pp. 1726-1733, 1994.
- Zhang, C. ; Chia, S.M. ; Ong, S.M. ; Zhang, S. ; Toh, Y.C. ; van Noort, D. ; Yu, H. ; The controlled presentation of TGF- β 1 to hepatocytes in a 3D-microfluidic cell culture system, *Biomaterials*, 30 (23), p.3847-3853, 2009.
- Zhang, W., Lin, S., Wang, C., Hu, J., Li, C., Zhuang, Z., Zhou, Y., Mathies, R.A., Yang, C.J., PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics, *Lab on a chip*, 9 (21), p.3088-3094, 2009.
- Zhang, Y.; Ozdemir, P. Microfluidic DNA amplification-A review, *Analytica Chimica Acta*, 638 (2), p.115-125, 2009.
- Zhu, X. Y., Mulder, J. A., Bergerson, W. F. *Langmuir*, 15: 8147-8154, 1999.

EKLER**EK 1. Ölçülen ıslak ağırlık değerleri**

Polimer	Ağırlık (g) 10.dakika	Ağırlık (g) 20.dakika	Ağırlık (g) 30.dakika	Ağırlık (g) 60.dakika	Ağırlık (g) 120.dakika	Ağırlık (g) 240.dakika)	Ağırlık (g) 360.dakika	Ağırlık (g) 1440.dakika	Ağırlık (g) Islak
A	1,3767	1,4489	1,5269	1,5791	1,6272	1,6678	1,6969	1,7115	1,7147
B	2,0595	2,0822	2,1756	2,2391	2,2705	2,3056	2,3260	2,3385	2,3416
C	1,2742	1,3055	1,3447	1,3833	1,4115	1,4315	1,4424	1,4443	1,4448
D	1,4445	1,4715	1,5080	1,5352	1,5573	1,5763	1,5888	1,5968	1,5965
E	1,7620	1,7805	1,7972	1,8109	1,8359	1,8692	1,8898	1,9040	1,9042
F	1,7538	1,7667	1,7747	1,7983	1,8122	1,8219	1,8479	1,8699	1,8708
G	1,7731	1,7852	1,8011	1,8111	1,8187	1,8275	1,8429	1,8645	1,8646
H	1,7620	1,7727	1,7823	1,7939	1,8037	1,8100	1,8159	1,8317	1,8313
I	1,2328	1,2734	1,2947	1,3287	1,3641	1,3851	1,3999	1,4145	1,4175
J	1,0926	1,1295	1,1437	1,1604	1,1832	1,2173	1,2344	1,2467	1,2493
K	2,2838	2,3127	2,3619	2,3964	2,4707	2,5325	2,5724	2,5783	2,5811
L	0,8713	0,8818	0,8907	0,9040	0,9135	0,9264	0,9515	0,9604	0,9606
M	1,2906	1,3388	1,3802	1,4522	1,4929	1,5055	1,5220	1,5268	1,5272
N	1,3755	1,4143	1,4574	1,4883	1,5111	1,5265	1,5433	1,5492	1,5499
O	1,2193	1,2426	1,2672	1,2970	1,3170	1,3310	1,3458	1,3516	1,3523
P	1,3045	1,3362	1,3499	1,3763	1,4000	1,4258	1,4422	1,4459	1,4484

EK 2. Polimer filmlerin hesaplanan gravimetrik şişme dereceleri

Polimer	10. dakikada şişme derecesi	20. dakikada şişme derecesi	30. dakikada şişme derecesi	60. dakikada şişme derecesi	120. dakikada şişme derecesi	240. dakikada şişme derecesi	360. dakikada şişme derecesi	24. saatte şişme derecesi	1. haftada şişme derecesi
A	0,0477	0,1026	0,1620	0,2018	0,2384	0,2692	0,2914	0,3025	0,3049
B	0,0323	0,0436	0,0904	0,1223	0,1380	0,1556	0,1658	0,1721	0,1736
C	0,0100	0,0348	0,0658	0,0964	0,1188	0,1346	0,1432	0,1448	0,1451
D	0,0190	0,0381	0,0639	0,0831	0,0986	0,1120	0,1208	0,1265	0,1263
E	0,0088	0,0194	0,0289	0,0368	0,0511	0,0702	0,0820	0,0901	0,0902
F	0,0073	0,0147	0,0193	0,0329	0,0409	0,0464	0,0614	0,0740	0,0745
G	0,0151	0,0220	0,0312	0,0369	0,0412	0,0463	0,0551	0,0675	0,0675
H	0,0131	0,0193	0,0248	0,0314	0,0371	0,0407	0,0441	0,0532	0,0529
I	0,0557	0,0905	0,1087	0,1379	0,1681	0,1861	0,1988	0,2113	0,2139
J	0,0164	0,0507	0,0639	0,0794	0,1006	0,1323	0,1483	0,1597	0,1621
K	0,0123	0,0251	0,0470	0,0623	0,0952	0,1226	0,1403	0,1429	0,1441
L	0,0239	0,0362	0,0466	0,0623	0,0734	0,0886	0,1181	0,1286	0,1288
M	0,0213	0,0595	0,0922	0,1492	0,1815	0,1914	0,2045	0,2083	0,2086
N	0,0251	0,0540	0,0861	0,1091	0,1261	0,1376	0,1501	0,1545	0,1550
O	0,0296	0,0493	0,0701	0,0952	0,1121	0,1240	0,1365	0,1414	0,1420
P	0,0134	0,0380	0,0487	0,0691	0,0876	0,1076	0,1204	0,1232	0,1252

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu OTMAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1986

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

2007- 2010 Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans
2003-2007 Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Lisans
2000-2003 Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi (Ankara)
1992-2000 Büyük Kolej (Ankara)

Yabancı Dil:

İngilizce
Almanca

İş Tecrübesi:

2009 Satış Mühendisi (Terralab A.Ş.)
2009 AR-GE Personeli (Terralab A.Ş.)

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayımlanmış Makaleler:

Caglayan MO., Sayar F, Demirel G, Garipcan B, Otman B, Çelen B, Pişkin E, Stepwise formation approach to improve ellipsometric biosensor response, Nanomedicine, 5: (2009) 152–161

Katılan Kongreler ve Yapılan Sunumlar

5th Marie Curie Cutting Edge Conference - Synthesis and applications of self-assembling materials at nano-scale, 2008, Madeira, Portugal

3rd Symposium on Surface Science, 2007, Ankara, Türkiye

14th International Biomedical Science and Technology Symposium, BIOMED2008, 2008, Mugla, Türkiye

Nano TR IV, Stepwise formation approach to improve ellipsometric biosensor response, Oral Presentation, 2008, Istanbul, Türkiye,

15th International Biomedical Science and Technology Symposium, BIOMED2009 2009, Güzelyurt, KKTC

23rd Conference of European Colloid and Interface Society, 2009, Antalya, Türkiye