

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

LİSE SEVİYESİ FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

ORİGAMİ BİYOSENSÖR TAKIMI

PROJE ADI

BİYOLOJİK KİRLETİCİLERİN KOLORİMETRİK TESPİTİ İÇİN

KAĞIT TABANLI ORİGAMİ BİYOSENSÖR

PLATFORMLARININ GELİŞTİRİLMESİ

BAŞVURU ID

367996

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı) (5 puan).....	2
2. Problem/Sorun (5 puan).....	3
2.1. Biyolojik Kirleticilerin Tespiti	3
3. Çözüm (20 puan)	3
3.1. Çip üstü laboratuvar teknolojileri	3
3.2. Çip üstü laboratuvar teknolojilerinin çevre denetimi ve gıda güvenliği uygulamaları	4
3.3. Kağıt tabanlı mikroakışkan teknolojileri.....	5
3.4. Origami-kağıt tabanlı biyosensör teknolojileri	5
4. Yöntem (20 puan)	6
4.1. Kağıt tabanlı biyosensör üretimi için biyosensör modellerinin çizimi ve üretimi	6
4.2. Kağıt tabanlı sensör modellerinin karakterizasyonu.....	6
4.3. <i>E. Coli</i> bakterisinin kültüre edilmesi	8
4.4. Prototip biyosensör platformunun geliştirilmesi	8
4.5. Farklı biyosensör platformları ile akıllı telefon yardımıyla bakteri tayini.....	9
4.5.1. OrigamiSensör platformunun geliştirilmesi.....	9
4.5.2. Mikroçip biyosensör platformunun geliştirilmesi.....	9
4.6. Sensör Platformları ile çeşitli tüketim maddeleri (süt, meyve suyu, vb.) içinde bakteri tayini	10
4.7. Mikroçip biyosensör platformu ile farklı konsantrasyonlarda bakteri tayini	11
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü (15 puan).....	11
6. Uygulanabilirlik (10 puan).....	11
6.1. Kağıt tabanlı sensör modellerinin karakterizasyonu.....	11
6.2. Prototip biyosensör platformu denemeleri	13
6.3. Farklı biyosensör platformları ile bakteri tayini.....	14
6.4. Sensör Platformları ile çeşitli tüketim maddeleri (süt, meyve suyu, vb.) içinde bakteri tayini	15
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması (5 puan).....	15
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar) (5 puan).....	16
9. Riskler (10 puan)	16
10. Kaynaklar (5 puan)	17

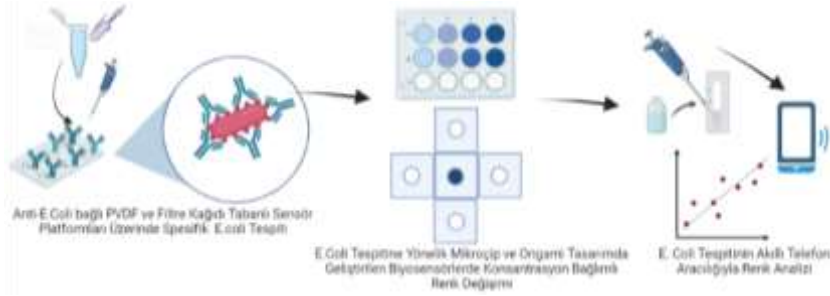
1. Proje Özeti (Proje Tanımı) (5 puan)

Biyolojik kirleticilerden bakterilerin neden olduğu enfeksiyon hastalıkları tanı ve tedavisi açısından büyük bir yük oluşturmaktadır ve dünya çapında milyonlarca insan bakteri kaynaklı enfeksiyonlardan hayatını kaybetmektedir. Bakterilerin tespiti, klinik teşhiste ve kontaminasyonun kontrolünde kritik bir rol oynar ancak yüksek maliyetli, kompleks cihazlar ve eleman gerektirmesi nedeniyle erişilebilir değildir.

Projede, mevcut yöntemlere alternatif, model organizma *E. Coli* bakterisinin, maruz kalınan ortamlar olan içme ve havuz suyu, atık sular, içecek ürünlerinde hızlı, renk değişimine dayanmasıyla gözle görülebilen, düşük maliyetli, kullanımı kolay, akıllı telefonla entegre edilebilen tespiti için kağıt tabanlı biyosensör platformları geliştirilmesi amaçlandı. *E.coli* bakterisinin spesifik tespiti için antikör bağlı PVDF membran ve filtre kağıdı tabanlı immünolojik yöntemeye dayanan mikroçip ve işlem adımlarını en aza indirgeyen, kullanıcı dostu origami tasarımda kolorimetrik tayin yapabilen iki farklı biyosensör geliştirildi. Hedef bakteri *E.coli* varlığında ve yokluğunda, konsantrasyon bağlı olarak, üzerinde belirgin şekilde renk oluşturan kağıt tabanlı platformlar kullanarak elde edilen biyosensörlerin, en düşük tayin limiti origami biyosensör için 0.9×10^3 , mikroçip biyosensör tasarımı için 2.7×10^3 bakteri/ml olup en geniş dinamik lineer çalışma aralığı ise $10^3 - 10^7$ bakteri/ml olarak hesaplandı.

Geliştirdiğimiz biyosensör platformları ile dakikalar içinde hem kalitatif hem de kantitatif, gözle görülür sonuç alınabilmesi ve analizi için sadece bir akıllı telefon kullanılması projemizin özgünlüğünü oluşturmaktadır. Bu umut verici sonuçlar ile geliştirdiğimiz biyosensörler, farklı biyolojik kirleticilerin tespiti için de kullanılabilir, karmaşık cihaz içermez ve büyük ölçeklerde kolaylıkla üretilebilir. Özellikle test laboratuvar altyapısının mevcut olmadığı bölgelerde, biyolojik

kirleticilerin su ve içeceklerde tespiti için geliştirdiğimiz biyosensörlerin, literatüre, halk sağlığına, sağlık ekonomisine ve temiz su ve sanitasyon, sağlık ve kaliteli yaşam, sudaki yaşam gibi sürdürülebilir kalkınma hedeflerine katkı sağlayacağına inanıyoruz.



Şekil 1. E.Coli tespitine yönelik kağıt tabanlı biyosensör sisteminin aşamaları (Çizim Biorender programında yapıldı.)

2. Problem/Sorun (5 puan)

2.1. Biyolojik Kirleticilerin Tespiti

Biyolojik kirleticiler, istenmeyen etkiler üreten, bir ortamı istila eden canlı varlıklar veya bu canlıların türettiği ürünlerdir. Bakteriler, virüsler, arkealar, protistler, mantarlar ve çeşitli böcekler biyolojik kirletici olarak değerlendirilebilir. Bu kirleticiler toprak, su, hava, gıda, gibi ortamlar yoluyla insanlara ulaşarak halk sağlığına ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (McCarthy ve Shugart, 2018). Biyolojik kirleticiler arasında özellikle bakterilerin neden olduğu enfeksiyon hastalıkları gelişmekte olan ülkelerde büyük bir yük oluşturmaktadır ve dünya çapında milyonlarca insan pnömoni, bakteriyemi, gastroenterit, osteomyelit, menenjit, endokardit ve toksik şok sendromu gibi enfeksiyonlardan hayatını kaybetmektedir (Mathur ve ark., 2018). Proje kapsamında model organizma olarak kullanılan Escherichia coli, canlıların bağırsak ortamında da bulunabilen bir bakteridir. Enterohaemorrhagic E. Coli gibi bazı alt tipleri ve bunları oluşturduğu toksinler hayatı tehdit eden hastalıklara neden olmaktadır. Bu türler kolaylıkla bulaşabilir ve salgın oluşturabilir (McCarthy ve Shugart, 2018). Tespit testleri, klinik karar vermede ve kontaminasyon kontrolünde kritik bir rol oynar, ancak maliyetli olma eğilimindedir ve genellikle erişilebilir değildir (Gous ve ark., 2018). Şekil 1’de biyolojik kirleticilerin tespitinde kullanılan mevcut yöntemler verilmiştir.



Şekil 2. Biyolojik kirleticilerin tespitinde kullanılan yöntemler

İdeal olarak, bulaşıcı hastalık tespit platformlarının kullanımı ve yorumlanması basit, çok çeşitli çalışma koşullarında (farklı sıcaklık ve nem gibi) stabil, taşınabilir ve tek kullanımlık olmalıdır. Bu nedenlerden dolayı, birçok girişim, sınırlı kaynaklar için hedeflenen mikroakışkan immünojenik testlerin geliştirilmesine odaklanmıştır (Chen ve ark., 2019). Son zamanlarda geliştirilen analitik platformlar arasında kağıt tabanlı çip üstü laboratuvar teknolojileri, düşük maliyetleri ve biyolojik olarak sürdürülebilir özellikleri nedeniyle artan bir ilgi görmektedir (Quesada-González&Merkoçi, 2018).

3. Çözüm (20 puan)

3.1. Çip üstü laboratuvar teknolojileri

Tıp, biyoteknoloji ve genomik gibi alanlardaki hızlı gelişmelerle birlikte kimyasal/biyokimyasal analizlere olan ihtiyaç artmış ve klasik yöntemler, laboratuvarlar ve karmaşık cihazların kullanımı yerine çip üstü laboratuvar teknolojilerinin pratik uygulamaları

geliştirilmiştir. Çip üstü laboratuvar (LOC), küçük boyuttaki çip üzerinde bir mini laboratuvarı ortaya çıkaran gıda güvenliği, çevre analizi ve tıbbi teşhis gibi alanlarda kullanılabilen yeni bir teknolojidir. Bu teknolojiler, bir veya birkaç analize olanak tanır ve yüksek hassasiyet, kısa teşhis süresi, daha iyi süreç kontrolü, taşınabilirlik ve güvenlik gibi önemli özelliklere sahiptir. Ayrıca mevcut testlerle karşılaştırıldığında, çip üzerinde laboratuvar teknolojileri, küçük hacmi nedeniyle düşük sıvı hacimleri, düşük üretim maliyeti, akıllı telefonlar ile entegre edilebilirlik ve yerinde tespit imkanı gibi birçok avantaja sahiptir (Ghallab ve ark., 2016; Yılmaz ve ark., 2018). Çip üstü laboratuvar teknolojileri (LOC), 10-100 mikrometre uzunluk ölçeğine sahip en az bir boyuta sahip mikrokanallarda küçük hacimli sıvıların (100 nL-10 µL numune) işlenmesine izin veren mikroakışkan sistemlerine dayanır. Bu tanım, bir çip üzerinde karmaşık analizlerin gerçekleştirilmesinin, numune alma, numune ön işleme, kimyasal reaksiyonlar, ürün ayırma ve izolasyon, algılama sistemi ve verileri içeren ve entegre eden küçük ölçekli, otomatik bir platformda eksiksiz bir laboratuvar prosedürünün tüm aşamalarını içerecek şekilde tasarlandığını ortaya koymaktadır (Francesko ve ark., 2019; Park ve ark., 2020).

3.2.Çip üstü laboratuvar teknolojilerinin çevre denetimi ve gıda güvenliği uygulamaları

Çip üstü laboratuvar teknolojilerine dayanan mikroakışkanlar, mühendislik, kimya, fizik, biyokimya, mikroteknoloji, nanoteknoloji ve biyoteknolojiyi birleştiren çok disiplinli bir teknolojidir. Mikroakışkan cihazlar, yerinde test için yararlı olan geniş yüzey-hacim oranları nedeniyle taşınabildir (Luka ve ark., 2015). Son yıllarda, biyosensör teknolojisine çok fazla değer katan mikroakışkan sistemleri kullanan çip üzerinde laboratuvar (LOC) teknolojisi ile biyosensörleri birleştirmeye yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (Mark ve ark., 2010).Biyosensörler ve mikroakışkan sistemler, geleneksel tekrarlayan laboratuvar yöntemlerine entegre ve minyatür bir alternatif sunmak için birlikte çalışarak numune, reaktif, enerji ve atık üretimini önemli ölçüde azaltır (Dhar et al., 2018). Ayrıca, bu mikroakışkan biyosensörler, geleneksel yaklaşımlar ile karşılaştırıldığında analitik performansı, düşük enerji ve reaktif tüketimi, yüksek spesifiklik ve duyarlılık, düşük maliyet, verimi, hızlı reaksiyon oranlarını ve taşınabilirliği, gerçek zamanlı algılamayı geliştirerek algılamanın hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelere fayda sağlayacak şekilde test prosedürlerine dönüştürülmesine olanak tanır (Pol ve ark., 2017). Bu tip sistemler, ilaç geliştirme, tıbbi görüntüleme, hastalıkların teşhisi, çevre denetimi ve gıda güvenliği için yerinde tespit sağlayan (Point of Care, POC) cihazların geliştirilmesinde kullanılmaktadır(Francesko ve ark., 2019).

Çevresel alanların kalitesini garanti altına almak ve insan sağlığını kirletici maruziyetinden korumak için taşınabilir analitik prosedürler geliştirilmelidir. Elbette yaratıcı çözümler, plastik ve solventlerin ortadan kaldırılması, az miktarda numune kullanımı ve uygulama kolaylığı gibi belirtilen sürdürülebilir kalkınma hedefleriyle uyumlu olmalıdır (Cate ve ark.,2015). Bu bağlamda, teşhis araçlarının uzun vadeli gelişimi için spesifik etkileşimlerin kullanılması ve yeni analitik çözümler geliştirmek için kağıt bazlı substratlar üzerinde yapılan araştırmalar, çevresel uygulamalarda umut verici sonuçlar vermektedir (Cioffi ve ark., 2021). Çevresel kirleticilerin mevcut tespit yöntemleri pahalıdır ve zaman alıcıdır, özellikle mikroorganizmaların gelişmiş çevresel izlemesi büyük bir endişe kaynağıdır. Mikroakışkan çip tabanlı teknolojiler ise potansiyel alternatifler sunmaktadır. Çevresel kirleticiler, özellikle bakteriyel, viral ve parazit enfeksiyonları ve bunların toksinleri, ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Çevresel örneklerde ve gıda ürünlerinde, mikrobiyal kalıntıları saptamak, bu organizmaları tanımlamaya ve kişinin sağlığını ve güvenliğini hastalıktan korumaya yönelik ilk adımdır (Dhar et al., 2018).

Kirleticilerin kapsamlı kullanım ve daha sonra çevrede kalıcılığının bir sonucu olarak çevresel etkisi dünya çapında bir endişe kaynağıdır. Bu bağlamda, gerçek zamanlı kirlilik tespiti için yeni yöntemler/teknolojiler yaratma çabaları büyük ilgi görmektedir. Mikroakışkan çip üzerinde

laboratuvar (LOC) cihazları, minyatür, entegre bir şekilde sürekli kirletici takibinde verimli bir yöntemdir (Pol ve ark., 2017).

3.3.Kağıt tabanlı mikroakışkan teknolojileri

Kağıt tabanlı mikroakışkan cihazlar, basitlik, maliyet etkinliği ve laboratuvar altyapısına ve kalifiye çalışanlara ihtiyaç duyulmaması gibi yadsınamaz faydaları nedeniyle çok fazla ilgi görmektedir. Ayrıca, bu cihazlar az miktarda reaktif ve numune kullanır, hızlı sonuçlar verir, taşınabilir ve tek kullanımlıdır (Cinti ve ark., 2019). Çeşitli algılama sistemleri ile entegre edilebilirlikleri, yüksek hassasiyet, seçicilik, enstrümantasyon basitliği, taşınabilirlik ve düşük toplam sistem maliyeti gibi ek avantajlar sağlarlar (Du ve ark., 2012).

3.4.Origami-kağıt tabanlı biyosensör teknolojileri

Origami, üç boyutlu heykeller veya yapılar üretmek için düz kağıt katlama sanatıdır (Kuan ve ark., 2016; Johnson ve ark., 2017). Bu eski sanat formu, son zamanlarda yeni, bilimsel bir amaçla kullanılmaya başlamıştır, çünkü birkaç origamiden etkilenen, kağıt tabanlı analitik cihazlar, tek bir düz kağıdın tek bir desen adımı kullanılarak farklı tasarımlarda katlanmasıyla geliştirilmiştir. Bu yöntem, çift taraflı bant kullanılarak tek tek kağıt katmanlarının karmaşık, sıralı, katman katman istiflenmesi ihtiyacını ortadan kaldırarak çok daha kolay kullanım fırsatı sunmaktadır. Ek olarak, bu mikroakışkan origami kağıt tabanlı sensör sistemleri, kolay test sonucu analizi için her katmanı ortaya çıkarmak üzere açılabilir (Tian ve ark., 2017). Bu çalışmalarda origamiden yararlanmanın ana amacı, kağıt mikroakışkan cihazlar içinde üç boyutlu (3B) mikroakışkan kanalların veya çoklu çalışma bölgelerinin üretimini basitleştirmektir. Bu sistemlerde, kullanıcıların yalnızca numunelerini test bölgesine yüklemeleri ve testi başlatmak için tek, sabit hacimde tampon uygulaması gerekir. Bu tip geliştirilen sistemlerde sonuçlar kolorimetrik okuma yoluyla kolayca elde edilebilir. Ayrıca, kolorimetrik sinyal bir akıllı telefon kullanılarak taranabilir veya fotoğraflanabilir ve sonuçlar çeşitli görüntü işleme uygulamaları ile analiz edilip karşılaştırılabilir. Biyotespitleri gerçekleştirmek için PAD'leri imal etmek için origami kullanma olasılıklarını araştırmak için birkaç çalışma yapılmaya devam etmektedir (Ge ve ark., 2012; Kuo ve ark., 2019; Chen ve ark., 2019). Eski bir sanat formu olan origami tekniğinin, insan sağlığına gerçek faydalar sağlayabilecek teşhisler için kağıt tabanlı sensör sistemlerinin geliştirilmesi için gelecekteki potansiyelinin yüksek olduğu vurgulanmaktadır.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Yamaguchi ve arkadaşlarının geliştirdiği çalışmada, Legionellapneumophila bakterisinin su örneklerinde tespiti için bir mikroakışkan sistemi geliştirdikleri görülmektedir. L. pneumophila saptanması için floresanla işaretlenmiş bir poliklonal antikör kullanılmış, özellikle tatlı sularda bu bakteri kontaminasyonunun yerinde belirlenmesi için hızlı, taşınabilir, yarı otomatik bir tespit sistemi geliştirilmiştir. Yerinde ölçüm için taşınabilir, 1.5 saatlik bir ölçüm zamanına ihtiyaç vardır (Yamaguchi ve ark., 2017). Savaş ve arkadaşlarının geliştirdiği çalışmada, altın nanopartikül etiketli sensör yüksek hassasiyet ve özgüllük ile bakterileri tespit edebilmektedir. Bu çalışma altın nanopartikül kullanımı dolayısıyla daha maliyetli ve tespit için deney sonunda elektrokimyasal bir analiz cihazının kullanımıyla bireysel kullanımı zorlaştırmaktadır (Savaş ve ark.,2018). Pang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise ELISA metodunu kullanılarak E.Coli tespit eden bir kağıt tabanlı sensör geliştirilmiştir (Pang ve ark., 2017). Diğer bir çalışmada, Değirmenci ve arkadaşları önerdikleri yöntemle bakteri tespitinin 8-10 saat aralığında yapılabildiğini göstermişlerdir (Değirmenci ve ark., 2019).

Bu proje kapsamında model organizma olarak kullanılan E. Coli bakterisinin insanların bu bakteriye maruz kaldığı ortamlar olan içme suyu, havuz suyu, atık sular ve çeşitli içecek ürünlerinde hızlı, renk değişimine dayanmasıyla gözle görülebilen, düşük maliyetli ve verimli tespiti için mevcut yöntemlere üstünlük sağlayacak bir alternatif olarak kağıt tabanlı biyosensör platformları geliştirildi. Projede çip üstü laboratuvar teknolojileri kapsamında mikroçip tabanlı ve

sistemin işlem adımlarını ve boyutunu en aza indirmek amacıyla kullanıcı dostu origami biyosensör tekniğiyle geliştirilen iki farklı tasarıma sahip biyosensör sistemlerinin, farklı amaçlarla sıvı ortamlarda bakteri tayini amacıyla kullanımı önerilmektedir.

4. Yöntem (20 puan)

4.1. Kağıt tabanlı biyosensör üretimi için biyosensör modellerinin çizimi ve üretimi

Kağıt tabanlı sensör modellerinin çizimi ve üretimi için CorelDRAW X7 programında farklı tasarımlarda (Y,S,+) çizimler yapıldı. Çizimler 125 mm çapındaki daire içerisine yerleştirildi. Kesim öncesinde 125 mm çapında daire şeklindeki filtre kağıdının ve PVDF membranın arka yüzü alüminyum bant ile dayanıklı hale getirmek amacıyla kaplandı. Çizimler Şekil 3'deki görsellere uygun şekilde CO₂ kullanılarak lazer üretimi yapılan lazer kesim cihazı ile filtre kağıtlarının altına kalınlığı 0.5 mm olan koyu PMMA tabakası konularak kesildi. Çizimler Tablo 2.de verilen 6 farklı güçte %40 hızda tarama yöntemiyle denendi ve optimum lazer kesim gücü belirlendi.



Şekil 3. Kağıt tabanlı sensör modellerinin çizimi ve üretimi

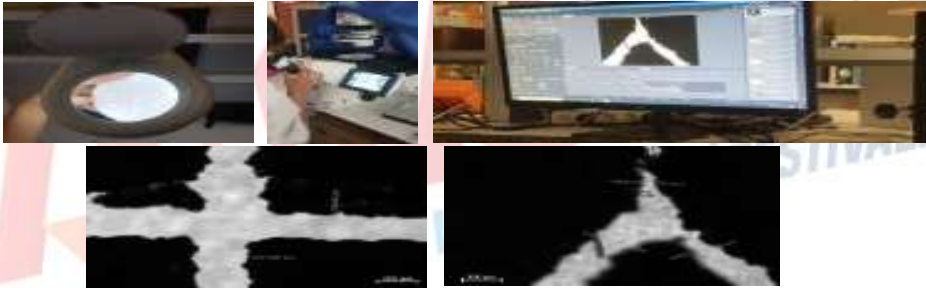
Tablo 2. Lazer kesim güç ve hız oranları

	1	2	3	4	5	6
Güç	%10	%30	%25	%35	%20	%40
Hız	%40	%40	%40	%40	%40	%40

4.2. Kağıt tabanlı sensör modellerinin karakterizasyonu

a. Görsel ve mikroskop analizi

Farklı güçlerde kesilen çizimler ışık altında önce büyüteçle ışık altında sonra daha detaylı ve kesin bir sonuca ulaşmak amacıyla mikroskopla incelendi. Bu incelemede kanal kenarlarının daha düz olması ve ısıdan daha az zarar görüp daha az renk değiştirmesi parametre olarak kabul edildi.



Şekil 4. Kağıt tabanlı sensör modellerinin karakterizasyonu

b. Boya ile akış parametrelerinin optimizasyonu

Hazırlanan 10 mm çapında 15 adet rezervuarın ve 1.25 mm çapında hacim kapasitelerini belirlemek için aşağıdaki tabloda belirlenen oranlarda ve gösterilen sırada, seyreltik mavi gıda boyası eklendi.

Tablo 3. Hacim kapasitelerinin belirlenmesi için denenen miktarlar

1	20 µl	2	16 µl	3	10 µl	4	12 µl	5	7 µl
6	14 µl	7	8 µl	8	9 µl	9	9.5 µl	10	9.6 µl
11	9.43 µl	12	9.45 µl	13	9.48 µl	14	9.55 µl	15	5 µl



Şekil 5. Boya ile akış parametrelerinin optimizasyonu

c. Rezervuarların maksimum sıvı kapasitesinin belirlenmesi

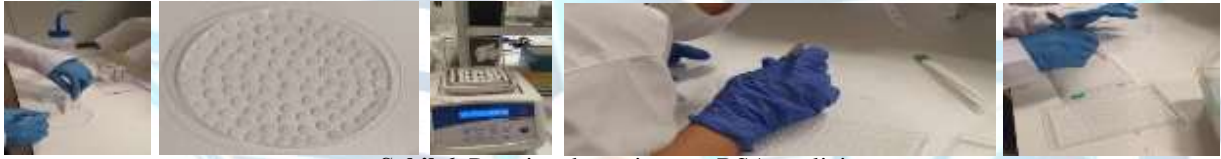
Sensör analiz ortamı olarak kullanılacak rezervuarların maksimum sıvı kapasitelerinin belirlenmesi aşamasında Tablo 4’te verilen hacimler denendi.

Tablo 4. Rezervuarların aldığı maksimum sıvı kapasitesinin belirlenmesi amacıyla denenen miktarlar

10µL	3µL	2µL	2µL	1µL	2.5µL	3µL
2.8µL	2.1µL	2.6µL	1.8µL	1.9µL	2µL	2.2µL
2.3µL	2.2µL	2.1µL	2µL	3µL	2.3µL	2.1µL

d. BCA Yöntemi ile Protein (BSA) Adsorpsiyon Analizi

Protein adsorpsiyonunun belirlenmesi için Bikinkoninik Asit (BCA) yöntemi kullanıldı. 5 mg BSA, 2.5 ml fosfat tamponunda ultrasonik banyo yardımıyla çözüldü. Sonrasında ana stoktan seri dilüsyon ile 0; 7.81; 15.62; 31.25; 62.5; 125; 250; 500; 1000; 2000 µg/mL konsantrasyonda BSA çözeltileri hazırlandı. Seyreltilen 25µl BSA çözeltilerinin üzerine, 8 ml Reaktif 1 ve 0,16 ml Reaktif 2 çözeltileri karıştırılarak hazırlanan karışımdan, 20 µl alınarak eklendi. Her bir konsantrasyondan 3 tekrarlı olarak hazırlanan karışımlar, wellplate içerisine aldı. Farklı konsantrasyonlardaki BSA çözeltilerinin spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak ilk konsantrasyonlar belirlendi. Wellplate içerisine alınan 16 mm'lik çapa sahip Filtre kağıtları ve PVDF membranlar, 20 µl hacminde farklı konsantrasyonlardaki BSA çözeltilerinin içerisine daldırıldı. Hazırlanan wellplate alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra, 37.5°C’de 2 saat boyunca üstü alüminyum folyo kaplanarak ısıtıcılı karıştırıcıda çalkalandı. Süre sonunda, örnekler oda sıcaklığında soğutulularak 25µl örnek alınarak BCA yöntemi uygulanarak spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda, absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil 6. Protein adsorpsiyonu - BSA analizi

e. PVDF Membran Yapılarının Hidrofilikleştirmesi

BSA Analizi ile hidrofobik yapıya sahip olduğu belirlenen PVDF membranların hidrofilik hale getirilmesi için 109 adet PVDF rezervuarı kesildi, falcon tüpüne alınarak, üzerine etanol eklendi. 10 dk 37 °C’de su banyosunda sonike edildi. Süre sonunda saf su ile yıkama yapıldı, petri kabı içerisine yerleştirildi. Termoshaker içinde 74°C’de kurutuldu. Membranlar wellplate içerisine aktarıldı. Üzerine aşağıdaki tabloda verilen şekilde 100 µl farklı çözenler eklendi ve tabloda belirtilen süreler boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Verildiği şekilde protein adsorpsiyon çalışması yapıldı. Ek olarak örneklerin ıslanırılık testleri yapıldı. Bu amaçla örneklerin kuru ağırlıkları ve saf su ile ıslatıldıktan sonraki ağırlıkları ölçülerek karşılaştırıldı.

Tablo 5. PVDF Membranı Hidrofilik Hale Getirmek Amacıyla Kullanılan Çözenler

İnkübasyon	4sa	24 sa
A	Sitrik (Akrilik) Asit 20 µg/100 µL	Polimetilmetakrilat, PMMA (Diklorometan, DCM)
B	NaOH 3µg/100 µL	Asetat Tamponu
C	Potasyum Hidroksit KOH (5µg/100µL)	Etil Alkol, EtOH
D	Dimetilsülfoksit, DMSO (50 µL/50 µL)	Gliserin (%0.1)
E	Dimetilsülfoksit, DMSO (20 µL/80 µL)	Triton – X (5 µL/995 µL),(%0.05)
F	Dimetilsülfoksit, DMSO (5 µL/95 µL)	Tween 20 (5 µL/995 µL),(%0.05)
G	Dimetilsülfoksit, DMSO (1 µL/99 µL)	PBS (24 sa)
H	PBS	



Şekil 7. PVDF Membran Yapılarının Hidrofilikleştirmesi

4.3. E. Coli bakterisinin kültüre edilmesi

E.Coli (BL 21 suşu) bakterisinin kültüre edilmesi için öncelikle biyogüvenlik kabin %70'lik etanol ile ve kullanılacak tüm laboratuvar malzemeleri otoklav ile sterilize edildi. Tüm işlemler yapılırken kontaminasyon riskini azaltmak için malzemeler, bünzen bek alevinden geçirilerek kullanıldı. Stok bakteri kültüründen 100 µl alınarak, 900 µl bakterinin üremesi için gerekli besi yeri içeren LB Broth eppendorf tüpüne alınarak 37°C'de 20 saat 250 rpm hızda çalkalamalı karıştırıcıya bırakıldı. Süre sonunda bakteri kültürü 8 dk + 4°C'de 4000 rpm hızda santrifüjlendi. Santrifüjlenen tüpte alta çöken bakteri kültürü üzerine 1ml fosfat tamponu eklendi. Spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı ve türbidite analizi yapılarak bakteri üremesi miktarının belirlendi.



Şekil 8. E. Coli bakterisinin kültüre edilmesi

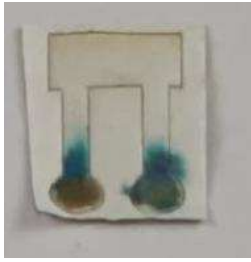
4.4. Prototip biyosensör platformunun geliştirilmesi

CorelDRAW X7 programında biyosensör platformunun tasarımı yapıldı. Çizimler 125mm çapındaki daire içerisine yerleştirildi. Kesim öncesinde 125 mm çapında daire şeklindeki filtre kağıtlarının/PVDF membranların arka yüzü alüminyum bant ile dayanaklı hale getirmek amacıyla kaplandı. Lazer kesim cihazı ile filtre kağıtlarının altına kalınlığı 3 mm olan koyu PMMA tabakası konularak kesildi. Sonrasında platformlar makasla kesilerek birbirinden ayrıldı Daha sonra 500 µl olan E.Coli Antikor Ab13627, her birinde 20 µl olacak şekilde 25 eppendorf tüpüne aktarıldı. 1 µl Antikor Ab13627, 249 µl fosfat tamponu (PBS) ile 250 kat seyreltildi. 4 adet biyosensör platformuna haznelerden birinde 2 µl diğeri boş olmak üzere Antikor Ab13627 eklendi. E.coli bakterisi, LB Broth içerisinde, üstü parafilm ile kapatılarak 37.5 °C'de, 250 rpm hızda termoshaker içerisinde 20 saat boyunca çalkalanarak üretildi. 4000 rpm hızda 8 dk santrifüjlendi. Üstte kalan LB Broth besi yeri çekilerek, E.Coli bakterisi ayrıştırıldı. Bakterilerin üzerine 6 mL PBS eklendi. 10⁸/mL bakteriden 10 µL'lik seri dilüsyon yapılarak 10⁷/mL, 10⁶/mL, 10⁵/mL, 10⁴/mL miktarlarda bakteri eppendorf tüpleri içerisine hazırlandı. Daha sonra spektrofotometrede 600 nm dalga boyundaabsorbans ölçümü yoluyla bakteri miktarı belirlendi. Dört tane 2 rezervuarlı biyosensör sisteminde her birinin 1 rezervuarına 2 µL Primer antikor eklendi. 15 dk beklendikten sonra üzerlerine her bir biyosensör platformunda 2 hazneye de 2'şer µl olacak şekilde, ilk biyosensör platformu için 10⁷, ikinci biyosensör platformu için 10⁶, üçüncü biyosensör platformu için 10⁵, dördüncü biyosensör platformu için 10⁴ oranında bakteri miktarı eklendi. 15 dakika beklendi. 15 dk beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra 1 µl sekonder antikor, 249 µl PBS'le 250 kat seyreltilip platformların haznelerine 2 µl eklendi. 15 dakika beklendi ve sonrasında biyosensör platformları yıkandı. Son aşama olarak 2 µl TMB (Tetra metil benzidin) platformların haznelerine eklendi. 15 dakika beklendi. Sonrasında renk değişimi gözlemlendi. 250 kat seyreltilen 2 µL primer antikor eklendi. Üzeri alüminyum folyo ile kaplandı.15 dk beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Kuruyana kadar beklendi. 2 µL sekonder antikor eklendi. 15 dk beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Kuruyana kadar beklendi. 2 µL TMB eklenerek 15 dk beklendi. Renk değişimi gözlemlendi.



Şekil 9. Prototip biyosensör platformunun geliştirilmesi

2 rezervuarlı biyosensör sisteminde biyosensörün 1 rezervuarına 2 μ L Primer antikor (1 μ L/249 μ L d. Su olarak seyreltilen) eklendi. Kakaolu süt (koyu renk olması nedeniyle seçilen) ile ölçüm yapabilmek için önce 1 mL 10^7 'lik konsantrasyona sahip bakteri ve 5 mL kakaolu süt otomatik pipet yardımı ile karıştırıldı. Primer antikor eklendikten sonra 15 dk beklendi. Sonra PBS ile yıkama yapıldı. Kuruduktan sonra üzerlerine hazırlanmış olan kakaolu süt karışımından her 2 rezervuara da 2 μ L eklendi. 15 dk beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı.



Şekil 10. Prototip biyosensör Platformunda Gerçek Örnek Çalışması

Kuruyana kadar beklendi. 250 kat seyreltilen 2 μ L primer antikor eklendi. 15 dk beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Kuruyana kadar beklendi. 2 μ L sekonder antikor eklendi. 15 dk beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Kuruyana kadar beklendi. 2 μ L TMB eklenerek 15 dk beklendi. Renk değişimi gözlemlendi.

4.5. Farklı biyosensör platformları ile akıllı telefon yardımıyla bakteri tayini

4.5.1. OrigamiSensör platformunun geliştirilmesi

Filtre kağıdı ve PVDF'ten bir kenarı 2 cm 5 kareden oluşan + şeklinde, her karede 2,5 mm çapında bir rezervuar bulunmak şartıyla birer tane origamisensör % 50 hız, %40 güçte lazer kesiciyle kesildi. PVDF biyosensörün altına, filtre kağıdından; filtre kağıdı biyosensörün altına, PVDF'ten 6 mm çapında delgeçle delinen beşer rezervuar yapıştırıldı. Filtre kağıdı biyosensörün ortasına, yapıştırılan PVDF transfer ve yakalama (capturing) tamponu ortamında 1 gece boyunca bekletildikten sonra yerleştirildi. İlk aşamada PVDF ve Filtre kağıdından oluşturulan origamisensörlerin orta haznesine 5 μ L E.Coli eklendi. Sonra rezervuarlardan birine 5 μ L Primer Antikor konuldu. Diğer rezervuara 5 μ L Sekonder Antikor konuldu. Primer Antikor'nin konulduğu kare ortaya katlandıktan sonra Antikor'nin E.Coli'ye nüfuzunu sağlamak için 5 μ L PBS üzerlerinden geçirildi. 3 dakika beklendikten sonra aynı işlem Sekonder Antikor ile yapıldı. Bunun için de 3 dakika beklenerek sistem Washing Buffer ile yıkandı. Kuruması için beklenen origami sensörün orta haznesine 5 μ L TMB eklendi. Renk değişimi gözlemlendi.



Şekil 11. OrigamiSensör Platformunun Geliştirilmesi

4.5.2. Mikroçip biyosensör platformunun geliştirilmesi

2 mm kalınlığında siyah PMMA diskten eni 2.13 cm boyu 5.7 cm olacak şekilde %50 hız ve %60 güçte lazer kesici ile 2 dikdörtgen kesildi. 6.5 mm çapında 4 adet rezervuar %50 hız, %40 güçte lazer kesici ile kenarları taranarak dikdörtgenlerin içlerinden çıkarıldı. 3 mm kalınlığında saydam PMMA den aynı ölçülerde 2 dikdörtgen daha kesildi. Siyah ve saydam dikdörtgenler çift taraflı bant ile yapıştırıldı, mengene ile sıkıştırıldı ve mikroçip biyosensör altyapısı elde edildi. 1 gece transfer ve yakalama (capturing) tamponu ortamında bekletilen 6 mm çapında PVDF membranlar 2 kontrol grubu olmak üzere toplam 8 rezervuara konuldu. Daha sonra daha önce bahsedilen prosedür ile üretimi yapılan E. Coli bakterileri 10 ve 100 kat PBS ile seyreltilerek, 10 kat seyreltilen bir biyosensöre 100 kat seyreltilen diğer biyosensöre eklendi. 3 dk beklendikten sonra her rezervuara 5 μ L Primer Antikor eklendi. 3 dk daha beklendikten sonra her rezervuara 5 μ L Sekonder Antikor eklendi. 3dk beklendi. Toplam 300 μ L Yıkama tamponu ile yıkandı. Kuruduktan sonra her rezervuara 5 μ L TMB eklendi. Renk değişimi gözlemlendi.



Şekil 12. Mikroçip biyosensör platformunun geliştirilmesi

4.6. Sensör Platformları ile çeşitli tüketim maddeleri (süt, meyve suyu, vb.) içinde bakteri tayini

Önceki aşamalarda anlatıldığı gibi hazırlanan PMMA biyosensörlerden biri kontrol grubu biri deney grubu yapıldı. Her grup toplam 4 rezervuara sahipti. Her rezervuara 1 gece boyunca transfer ve yakalama (capturing) tamponu ortamında bekletilen 6 mm çapında PVDF'ler yerleştirildi. 4 vial 5 mL sırasıyla ayran, meyve suyu, musluk suyu ve limonata konuldu. Kontrol gruplarına sırasıyla 5 µL tüketim maddelerinden eklendi. Üretimi yapılan 10 kat seyreltilen E.Coli bakterileri sırasıyla 5 mL'ye 500 µL olmak şartıyla tüketim maddelerine eklenerek spatülle karıştırıldı. Bu karışımlardan 5 µL deney grubuna sırasıyla eklendi. Daha sonra iki gruba da Primer ve Sekonder'den 5 µL eklendi. 50 µL yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 5 µL TMB eklendi. Her aşamada 3 dk beklendi. Renk değişimi gözlemlendi.



Şekil 13. Mikroçip biyosensör Platformu ile çeşitli tüketim maddeleri içinde bakteri tayini

Önceki aşamalarda anlatılan şekilde filtre kağıdından biri deney biri kontrol grubu olacak şekilde 2 tane origami biyosensör hazırlandı. Filtre kağıdı biyosensörün orta haznesine üretildikten sonra 10 kat seyreltilen E.Coli eklendi. Sonra rezervuarlardan birine 5 µL Primer Antikor konuldu. Diğer rezervuara 5 µL Sekonder Antikor konuldu. Primer Antikor'nin konulduğu kare ortaya katlandıktan sonra Antikor'nin E.Coli'ye nüfuzunu sağlamak için 5 µL PBS üzerlerinden geçirildi. 3 dakika beklendikten sonra aynı işlem Sekonder Antikor ile yapıldı. Bunun için de 3 dakika beklenerek sistem Washing Buffer ile yıkandı. Kuruması için beklenen origami biyosensörün orta haznesine 5 µL TMB eklendi. Renk değişimi gözlemlendi.



Şekil 14. OrigamiSensör platformu ile çeşitli tüketim maddeleri içinde bakteri tayini

3 rezervuara sahip çapı 5 mm olan 2 origamisensör önceki aşamalarda anlatılan şekilde hazırlandı. 1 gece bekletilen yakalama (capturing) ve transfer tamponu eklenen PVDF'ler haznelere koyulduktan sonra havuz suyuyla 10 kat seyreltilmiş E.Coli karışımından 5 µL tek rezervuara eklendi. Her iki rezervuara da 5µL Primer Antikor eklenen biyosensör 3 dakika bekletildi. Sonra 50 µL PBS ile yıkandı. Kuruması beklendikten sonra her rezervuara 5 µL SekonderAntikor eklendi. 3 dakika beklendi. Her rezervuar 15 µL yıkama tamponu ile yıkandı. Kuruduktan sonra her rezervuara 10 µL TMB eklendi. Aynı işlem meyve suyu ile de gerçekleştirildi. Renk değişimi gözlemlendi.



Şekil 15. OrigamiSensör Platformu ile havuz suyu ve meyve suyu içerisinde bakteri tayini

4.7. Mikroçip biyosensör platformu ile farklı konsantrasyonlarda bakteri tayini

Önceki aşamalarda anlatıldığı biçimde ikisi 6,5 mm çapında 8 rezervuarlık siyah biri 5 mm çapında PMMA biyosensör platformu hazırlandı. 1 gece boyunca transfer buffer ve yakalama (capturing) tamponunda bekletilen 6 mm çapında PVDF'ler rezervuarlara yerleştirildi. 8 rezervuarlık olan iki biyosensörün ilk rezervuarları kontrol grubu olarak belirlendi. Geriye kalan 7 rezervuara Şekil 13'deki gibi soldan sağa artarak havuz suyu ile seyreltilerek hazırlanan 10^1 - 10^7 E. Coli oranında ekleme yapıldı. Sonra her rezervuara 5 µL Primer Antikor eklendi. 3 dakika sonra 50 µL PBS ile yıkandı. Kuruması beklendikten sonra her rezervuara 5 µL Sekonder Antikor eklendi. 3 dakika beklendi. Her rezervuar 50 µL, 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Kuruduktan sonra her rezervuara 10 µL TMB eklendi. Aynı işlem filtre kağıdı ile oluşturulan rezervuarlar üzerinde de uygulandı. Renk değişimi gözlemlendi. Renk değişimi Matlab programı ile analiz edildi.



Şekil 16. Mikroçip biyosensör Platformu ile farklı konsantrasyonlarda bakteri tayini

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü (15 puan)

Çip üstü laboratuvar teknolojileri, son 20 yılda gelişen teknolojiler olup geleneksel yöntemlere alternatif oluşturmaktadır. Mikro yapıların benzersiz özelliklerinden dolayı bu sistemlerin karmaşık analizlerini geleneksel yöntemlere göre daha düşük maliyet, enerji ve kimyasal tüketimi ile daha verimli bir şekilde gerçekleştirebilmektedir (Francesco ve ark., 2019). Proje kapsamında, E.coli tayini için immünojenik ve kolorimetrik ölçüm yapan kağıt tabanlı biyosensör sistemlerini içeren çip üstü laboratuvar teknoloji önerilmiş ve önerilen yöntemin iki farklı sensör platformu üzerinde uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

6. Uygulanabilirlik (10 puan)

6.1. Kağıt tabanlı sensör modellerinin karakterizasyonu

a. Görsel ve mikroskop analizi

Çalışmanın ilk adımı olarak kullanılacak kağıt membranların hazırlanması için seçilecek lazer kesim gücünün belirlenmesi yapıldı. Yöntem kısmında verilen güç ve hız denemeleri sonrasında yapılan mikroskopik inceleme sonucunda hız değeri %40, güç değeri ise %35 olarak belirlendi. Bu değerler hem kesimin sonucunda oluşturulan örneklerin daha keskin hatlara sahip olmasını hem de daha insicamlı olması sebebi ile seçildi.

b. Boya ile akış parametrelerinin optimizasyonu

Elde edilecek son ürünün lateral akışa sahip olması potansiyeli sebebiyle akış hızı çalışmaları yapıldı. Her ne kadar çalışma sonuçları bu açıdan ürünlerin kullanılabilir olduğunu gösterse de özellikle PVDF membranın hidrofobik olması sebebiyle sıvı taşınmasının mümkün olmadığı görüldü ve lateral akış yerine origami ve mikroçip sensör platformlarının kullanımının daha avantajlı olacağına karar verildi. Filtre membran için akış çalışması sonuçları Tablo 6'da görülebilir.

Tablo 6. Filtre membran için akış çalışması sonuçları

Akış Sonuçları (Zaman)	1.	2.	3.	4.	5.
1.Bölme	06.61	20.85	17.17	18.95	14.81
2.Bölme	13.7	43.52	20.95	33.21	24
3.Bölme	45.53	01.20.02	49.07	01.03.99	45
4. Bölme	01.44.65	01.44.41	01.21.13	01.36.68	01.02.85

c. Rezervuarların maksimum sıvı kapasitesinin belirlenmesi

Sensör analiz ortamı olarak kullanılacak rezervuarların maksimum sıvı kapasitelerinin

belirlenmesi aşamasında Tablo 4’te verilen hacimler denendi. Rezervuarların aldığı maksimum sıvı kapasite miktarı 2 μL olarak belirlendi.

d. BCA Yöntemi ile Protein (BSA) Adsorpsiyon Analizi

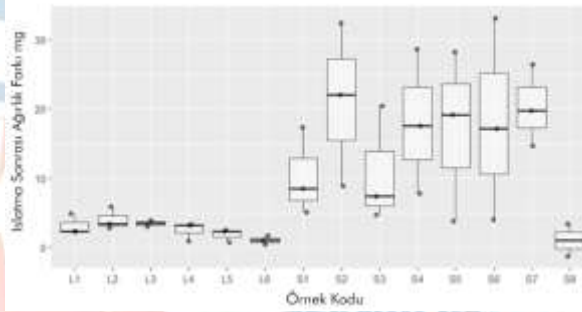
Protein adsorpsiyonunun belirlenmesi için Bikinkoninik Asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Çalışma sonucunda filtre kağıdı için protein adsorpsiyon miktarı BSA proteini için $150.965 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ve PVDF membran için $111.391 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ olarak belirlendi. PVDF membranın protein tutma kapasitesinin ve ıslanabilirliğinin artırılmasının çalışmanın devamında faydalı olacağı ve son ürünün uygulanabilirliğini arttıracığı düşünüldü ve PVDF membranın hidrofilikleştirilmesi üzerine çalışmalara başlandı.

e. PVDF Membran Yapılarının Hidrofilikleştirilmesi

BSA Analizi ile hidrofobik yapısının çalışmanın devamında kullanımı ile ilgili sorun teşkil edeceği PVDF membranların hidrofilik hale getirilmesi için farklı kimyasallar ile şartlandırmaları yapıldı. Ardından ıslanabilirlik ve protein adsorpsiyonu çalışmaları yapıldı. Kullanılan malzemeler tablo 7’de verilmiş olup sonuçlar şekil 17 ve şekil 18’de sırasıyla ıslanabilirlik ve protein adsorpsiyonu sonuçları olacak şekilde verilmiştir.

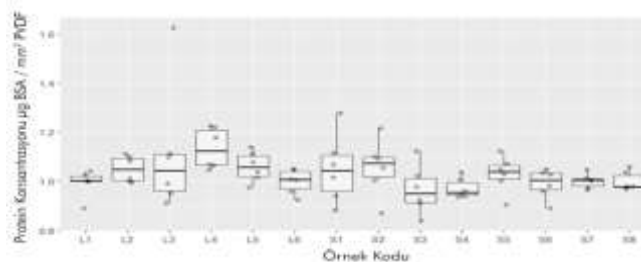
Tablo 7. Şartlandırma için kullanılan kimyasallar

Kod	Şartlandırma için Kullanılan Kimyasal	Kod	Şartlandırma için Kullanılan Kimyasal
S1	Sitrik asit	L1	Asetat tamponu
S2	Sodyum Hidroksit (NaOH)	L2	Etanol
S3	Potasyum Hidroksit (KOH)	L3	Gliserin
S4	Dimetil sülfoksit (DMSO)	L4	Triton X
S5	Dimetil sülfoksit (DMSO)	L5	Tween 20
S6	Dimetil sülfoksit (DMSO)	L6	Fosfat Tamponu (PBS)
S7	Sodyum dodesil sülfat (SDS)		
S8	Fosfat Tamponu (PBS)		



Şekil 17. İslanabilirlik çalışması sonrası örneklerin kuru tartımları ile ağırlık farkları

İslanabilirlik çalışması PVDF membranın hidrofilik hale getirilmesi için kuvvetli indirgeyici ya da yükselgeyici ajanlarının kısa süreli inkübasyonunun kullanımını ve PVDF çözücü olan DMSO’nun kullanımını etkili olduğunu göstermiştir ancak protein adsorpsiyonu çalışması sonuçları efektif adsorpsiyonun yükseltgen/indirgen olmayan ve daha az çözücü özelliğe sahip malzemeler ile uzun süreli muamele sonucunda elde edildiğini göstermiştir.



Şekil 18. Çeşitli kimyasallar ile şartlandırılmış PVDF membran örneklerinin protein adsorpsiyonu çalışmaları

Çalışmanın devamının membranlar üzerine antikor fonksiyonlanması içermesi sebebiyle ıslanabilirliğe kıyasla protein adsorpsiyonu daha önemli bir parametre olarak kabul edilmiştir ve bu doğrultuda kullanılacak olan transfer tampon çözeltisi %0.01 Triton X ve 96mM glisin içeren

sitrat tampon olarak seçilmiştir.

6.2.Prototip biyosensör platformu denemeleri

Prototip öncelikle PBS tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmış bakteri örneklerinin tayini için kullanıldı. Şekil 19 elde edilen sonuçları göstermektedir. Şekilde de görüldüğü üzere hem kontrol grupları ile örnekler arasında hem de farklı konsantrasyona sahip örnekler arasında göze görülebilir bir renk farkı vardır.



Şekil 19. Soldan sağa doğru artan konsantrasyonlarda uygulanan deneme sonuçları. Her platformun solundaki rezervuar örnek, sağındaki ise kontrol olarak kullanıldı.

Gözle görülen farkın kantitatif bir anlamlılığı olabilmesi için elde edilen görsellerin renkleri sayısal veriye dönüştürülmüştür. Bu işlem MATLAB yazılımı kullanılarak söz konusu renkleri sayısal veriye dönüştürecek bir kod yazılmıştır. Kod hem ortalama bir renk farkı, hem görselin en karanlık noktasının ne kadar aydınlık olduğunu hem de ortalama aydınlık değerlerini vermektedir. Şekil 20 ve Şekil 21 MATLAB'ın kullanım için siyah-beyaz'a ve LabColor formatına çevirdiği görselleri göstermektedir.

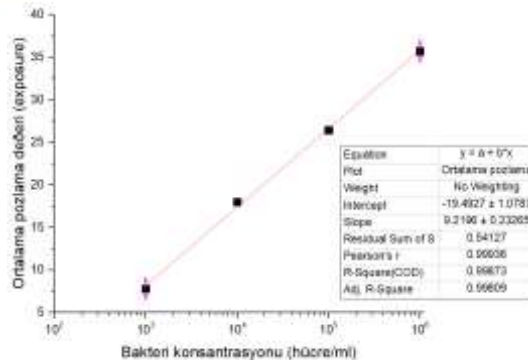


Şekil 20. Matlab programının kullandığı siyah-beyaz görsel **Şekil 21.** Matlab programının kullandığı görseller
Bahsedilen işlem tüm örneklere uygulandıktan sonra elde edilen sayısal veriler tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8. Farklı bakteri konsantrasyonuna sahip örneklerden elde edilen sonuçların renk değerleri.

Konsantrasyon	10^7 hücre / ml	10^6 hücre / ml	10^5 hücre / ml	10^4 hücre / ml	10^7 hücre / ml - kontrol
Ortalama renk fark	18.403	15.860	15.663	15.043	18.450
En karanlık nokta pozlaması (siyah-beyaz)	46.000	60.000	77.000	83.000	98.000
Ortalama (siyah-beyaz) pozlama	88.121	97.401	105.846	116.038	123.847

Tablo 8'de de görüldüğü gibi ortalama renk farkında dramatik bir değişim gözlenmemekte fakat hem en karanlık nokta hemde ortalama pozlama değerlerinin artan konsantrasyonla azaldığı dolayısıyla oluşan rengin gitgide koyulaştığı gözlenmiştir. Elde edilen veri ile çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 22'de görülebilir.



Şekil 22. Mevcut sensör sistemi için hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanan tespit sınırı origami biyosensör için 0.9×10^3 , mikroçip biyosensör tasarımı için 2.7×10^3 bakteri/ml olarak belirlenmiştir.

6.3.Farklı biyosensör platformları ile bakteri tayini

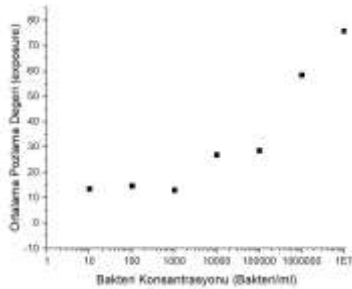
Daha önce bahsedildiği gibi iki farklı platform aynı yöntemin uygulanması için kullanılmıştır. Bunlar origami ve mikroçip tabanlı sensör platformlarıdır. Yöntem kısmında anlatıldığı gibi platformlar antikor taşıyıcı olarak filtre kağıdı ve PVDF membran barındırmaktadır. İki malzeme arasındaki doğal renk farkından kaynaklı sorunlar ile karşılaşılması adına aynı platform üzerinde iki malzeme de denenmiş ve farklı konsantrasyondaki örnekler kullanılarak renk değişimi değerleri bir önceki adımda açıklandığı şekilde hesaplanmıştır.

a. PVDF membran tabanlı sensör sistemi



Şekil 23. PVDF membran kullanılarak yapılan renk ölçümü sonuçları

Şekil 23’de görüldüğü gibi çalışmada üretilen antikor fonksiyonlu PVDF membranlar kullanılarak 10^3 bakteri/ml konsantrasyonuna kadar tayin yapılabilmektedir. Şekil 24’te ilgili kalibrasyon eğrisini göstermektedir.



Şekil 24. PVDF membran kullanılarak yapılan renk ölçümü ile çizilen kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrinin de gösterdiği gibi oldukça geniş (10^3 - 10^7 bakteri/ml) bir aralıkta ölçüm yapma şansı sağlayan bir sensör platformu geliştirilmiştir.

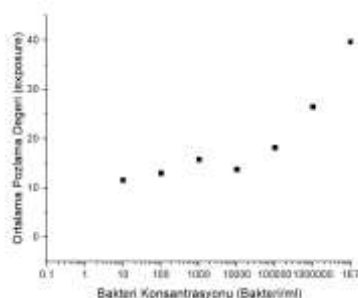
b. Filtre kağıdı tabanlı sensör sistemi

Aynı işlem PVDF membran sonrasında filtre kağıdı için de yapılmıştır. Sonuçlar ve kalibrasyon eğrisi Şekil 25 ve Şekil 26’de görülebilir.



Şekil 25. Filtre kağıdı kullanılarak yapılan renk ölçümü sonuçları

Her ne kadar beklenen renk oluşumu mavi olsa da Şekil 23’de sarı-yeşil renk oluşumu gözlemlenmektedir. Bunun sebebi ise şöyledir: TMB renksiz ve indirgenmiş formunda saklanmaktadır. Ortamda HRP (horseradish peroxidase) enzimi ve H_2O_2 bulunduğunda ise oksidize olup mavi renk vermektedir. Bu mekanizma HRP enziminin H_2O_2 ’i indirgemesi ve suya dönüştürmesi için gerekli olan iki hidrojen atomunu TMB (TMB^{1+}) oksidasyonu ile elde etmesi temeline dayanır. Reaksiyon sürdükçe oksidize TMB miktarı artar ve çökmeye sebep olur. Reaksiyonun durdurulmaması ve TMB’nin aşırı oksitlenmesi (TMB^{2+}) ise sarı-turuncu bir renk açığa çıkarmaktadır. Normal şartlarda bu rengin oluşumunun önüne geçmek için “stop-solution” kullanılmaktadır. Ek olarak oksidasyon öncesi anyonik yüzey aktif madde eklenmesi ve ya seyreltik TMB kullanımı sarı renk oluşumunun önüne geçebilmektedir. Mavi rengin hızla kaybolması ya da uzun süre saklanma ihtiyacı gibi bir sorun söz konusu olmadığı noktada bu müdahalelere ya da ”stop-solution” kullanımına gerek olmamaktadır.



Şekil 26. Filtre kağıdı kullanılarak yapılan renk ölçümü ile çizilen kalibrasyon eğrisi

Şekil 26’da görülmektedir ki ölçüm filtre kağıdı ile de benzer şekilde (PVDF membran sonuçlarına) sağlanabilmektedir ancak ölçüm alt limiti kıyasla daha yüksektir.

6.4.Sensör Platformları ile çeşitli tüketim maddeleri (süt, meyve suyu, vb.) içinde bakteri tayini

Önceki aşamalarda anlatıldığı gibi hazırlanan origami ve mikroçip sensör platformları farklı tüketim maddelerinin ve örneklerin analizinde kullanılmıştır. Bu amaçla süt, meyve suyu, limonata ve havuz suyu örnek olarak kullanılmıştır. Şekil 27 origami tabanlı sensör platformunun sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 27. Havuz suyu ve meyve suyu örneklerinin origami sensör platformu ile elde edilen sonuçları

Şekil 27’de de görüldüğü gibi her iki örnekte de renk değişimi gözlemlenmiştir. Benzer şekilde

hazırlanan örnekler sonrasında mikroçip sensör platformu üzerinde denenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 28’da görülebilir.



Şekil 28. Sırasıyla Ayran, meyve suyu, havuz suyu ve limonata örneklerinden elde edilen sonuçlar. İlk sıra örnekler, ikinci sıra ise bakteri eklenmemiş kontrol gruplarını içermektedir.

Şekil 28’de görüldüğü gibi farklı örneklerden olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bahsedilen renk sararması ile burada da karşılaşılmış ve tayin için yeterli olduğu belirlenmiştir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması (5 puan)

Proje İş-Zaman Çizelgesi

Tablo 1. Proje İş-Zaman Çizelgesi

İşin Tanımı	AYLAR									
	1.ay	2.ay	3.ay	4.ay	5.ay	6.ay	7.ay	8.ay	9.ay	10.ay
Literatür Taraması	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Laboratuvar tanıtımı ve sağlık ve güvenlik kurallarının öğrenilmesi				x	x					
Kâğıt tabanlı biyosensör modellerinin çizimi ve üretimi		x	x	x	x	x	x			
Kâğıt tabanlı biyosensör modellerinin karakterizasyonu					x	x	x	x		
Bakteri kültürü ile ilgili güvenlik protokolünün öğrenilmesi ve <i>E. Coli</i> bakterisinin kültüre edilmesi						x	x	x	x	x
Kâğıt tabanlı Biyosensör platformunun mikroçip ve origami tasarımlarda hazırlanması							x	x	x	x
Platform ile tampon (PBS) çözelti içinde bakteri tayini								x	x	
Platform ile su ve çeşitli tüketim maddeleri içinde bakteri tayini								x	x	x
Verilerin Toplanması, Yorumlanması ve Analizi							x	x	x	x
Proje Raporu Yazımı								x	x	x

Projede Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar

Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Proje kapsamında kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler, Etil alkol (Etanol, EtOH) (70 mL 30mL) (%100), LuriaBertaniBroth, EscherichiaColi Bakterisi BL 21 Suşu, Mavi Gıda Boyası, Ultra Distile Su, PBS (Phosphate Buffered Saline), BSA (Bovin Serum Albümin), BlockingReagent (1.5g / 50 mL), ELİSA Kiti Reagent 1, ELİSA Kiti Reagent 2, Tris - HCl Tamponu, Asetat Tamponu, Sitrat Tamponu, Hidrojen Peroksit (H₂O₂), PLL (Polilizin), GNP (Gold Nanoparticles),

Triton – X (%0.05, % 0.01), Tween 20 (%0.05, % 0.01), PVA (PoliVinil Alkol), Gliserin (%0.1), Paraform Aldehit, DCM (Diklorometan (CH_2Cl_2)), TMB (Tetrametilbenzidin), Sitrik Asit (20 $\mu g/100\mu L$), Sodyum Hidroksit, NaOH (%3), Potasyum Hidroksit KOH (%5) Dimetilsülfoksit, DMSO (%50), (%2), (%5), (%1), Polimetilmetakrilat, PMMA (%10 Diklorometan), Primer Antikor (Anti-E.Coli antikor /GoatPolyclonal) (Ab13627) (%4), Sekonder Antikor (Horseradish proksidaz konjuge anti-goat), PVDF (PolivinilidinFlorür), 96/Wellplate, Mikropipet, Pipet Ucu, Otoklav Bandı, Parafilm, Filtre Kağıdı, Lam/Lamel, Petri Kapları, Piset, Spatül, Falcon Tüpü, Santrifüj Tüpü, Mezür, Delgeç, Beher, Flask tüpler.

Cihazlar

Proje kapsamında kullanılan cihazlar: Santrifüj (Nuve NF 400R), Spektrofotometre (MultiscanGO Thermo Scientific), Ultrasonik Su Banyosu (İSOLAB Laborgerate GMBH), Lazer Kesim Cihazı (Paragon Tempero Glass AS2 MS 1/8C DOT 243), Hassas Tartı (RADWAG AS 220/C/2) , Mengene (AYTUT), Biyogüvenlik Kabini, Vortex (Dragon Lab MX-F), Floresan Özellikli Mikroskop (ZEISS), Isıtıcı Karıştırıcı, Otoklav, Büyüteç

Programlar

Proje kapsamında kullanılan kağıt tabanlı biyosensör tasarımlarının grafiksel çiziminde CorelDRAW X6, biyosensör sisteme ait görsel çizimler için Biorender ve analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde MathWorks MATLAB R2018b programları kullanıldı.

Geliştirilen sensör platformlarının analiz maliyetleri incelendiğinde, PVDF membran kullanılarak hazırlanan **mikroçip tasarımı** ile gerçekleştirilecek E.coli bakteri analizinin yalnızca **1.48 TL**; PVDF membran kullanılarak hazırlanan **origami tasarımı** ile gerçekleştirilecek E.coli bakteri analizinin yalnızca **2.21 TL** olduğu hesaplandı.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar) (5 puan)

Mevcut platformlar ve yöntem kullanılarak elde edilen en düşük tayin limiti origami biyosensör için 0.9×10^3 , mikroçip biyosensör tasarımı için 2.7×10^3 bakteri/ml olup en geniş dinamik lineer çalışma aralığı ise yaklaşık $10^3 - 10^7$ bakteri/ml olarak hesaplandı. Üretilen sensör platformları ile dakikalar içinde sonuç alınabilmekte ve alınan sonucun ölçümü için sadece bir akıllı telefon kullanılmaktadır. Biyosensör sistemlerimiz, mevcut yöntemlere kıyasla ekonomik avantaja sahip, kısa sürede sonuç sağlayan ve kullanımı uzmanlık gerektirmeyen bir tespit seçeneği sunmaktadır. Özellikle test laboratuvar altyapısının mevcut olmadığı bölgelerde, biyolojik kirleticilerin su ve içeceklerde tespiti için geliştirdiğimiz biyosensörlerin kapsamında halk sağlığına, temiz su ve sanitasyon, sağlık ve kaliteli yaşam, sudaki yaşam gibi sürdürülebilir kalkınma hedeflerine ve literatüre katkı sağlayacağına inanıyoruz.

9. Riskler (10 puan)

Projemiz kapsamında, E.coli bakterisinin suda ve çeşitli tüketim maddelerinde varlığı, yokluğunun konsantrasyon bağımlı olarak gözle görülebilir belirlenebilmesi temeline dayalı tespit sistemi geliştirdik. Bu sistem, günümüzde E.coli bakterisinin tespitinde kullanılan mevcut sistemlere alternatif, düşük maliyetli ve kullanımı kolay bir tespit kitidir.

- Geliştirdiğimiz biyosensör sistemi, kompleks cihazlar içermediği için büyük ölçeklerde kolaylıkla üretilebilir. Bu sayede, gelişmiş laboratuvar altyapısının mevcut olmadığı bölgelerde rutin bakteri tespiti sağlayarak, kontaminasyon taraması için toplum sağlığına ve ülke ekonomisine ciddi yarar sağlayacaktır.
- Geliştirdiğimiz sistem su ve içecek maddelerinin yanı sıra kan, idrar ve tükürük gibi biyolojik sıvılara kadar değişen farklı ortamlarda bakteri tayinin yapılmasının da önünü açabilecektir.
- Sahada kullanılabilme özelliği olan mikroçip ve origami tasarımında geliştirdiğimiz biyosensörler, daha ileri teknolojiler ile üretilmesi ve ticari bir ürün haline getirilmesi projenin devamında uygulanabilecek önerilerden olabilir.
- Platformun ürettiği rengin kalıcı olması adına ve kullanılan MATLAB kodunun görsel eldesi ile

entegre tek bir akıllı telefon uygulamasına dönüştürülmesi gibi geleceğe yönelik en önemli önerimiz olabilir. Bu umut verici sonuçlar ile geliştirdiğimiz biyosensör sisteminin modifiye edilerek farklı biyolojik kirleticilerin tespitinde ve enfeksiyon belirteci olarak kullanılabilmesi açısından projemizin literatüre ve yeni tespit sistemlerinin geliştirilmesi ile ilgili gelecek çalışmalara katkıda bulunacağına inanıyoruz.

10. Kaynaklar (5 puan)

1. B. Yılmaz, F. Yılmaz, Elsevier, 2018: pp. 145–153.
2. Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J., & Henry, C. S. (2015). *Analytical chemistry*, 87(1), 19-41.
3. Chen, C. A., Yeh, W. S., Tsai, T. T., & Chen, C. F. (2019). *Lab on a Chip*, 19(4), 598-607.
4. Cinti, S., Moscone, D., & Arduini, F. (2019). *Nature protocols*, 14(8), 2437-2451.
5. Cioffi, A., Mancini, M., Gioia, V., & Cinti, S. (2021). *Environmental Science & Technology*, 55(13), 8859-8865.
6. Değirmenci, E., Kaloğlu, A. H., Güven, E., Durak, S., & Orbuk, H. (2019). *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 34(3), 235-246.
7. Dhar, B. C., & Lee, N. Y. (2018). *BioChip Journal*, 12(3), 173-183.
8. Du, D., Wang, J., Wang, L., Lu, D., & Lin, Y. (2012). *Analytical chemistry*, 84(3), 1380-1385.
9. Francesko, A., Cardoso, V. F., & Lanceros-Méndez, S. (2019). In *Microfluidics for Pharmaceutical Applications* (pp. 3-36). William Andrew Publishing.
10. Ge, L., Wang, S., Song, X., Ge, S., & Yu, J. (2012). *Lab on a Chip*, 12(17), 3150-3158.
11. Ghallab, Y. H., & Yehea, I. (2016). *Intech Open*, 17.
12. Gous, N., Boeras, D. I., Cheng, B., Takle, J., Cunningham, B., & Peeling, R. W. (2018). *Expert review of molecular diagnostics*, 18(4), 385-397.
13. Johnson, M., Chen, Y., Hovet, S., Xu, S., Wood, B., Ren, H., ... & Tse, Z. T. H. (2017). *International journal of computer assisted radiology and surgery*, 12(11), 2023-2032.
14. Kuan, C. M., Lin, S. T., Yen, T. H., Wang, Y. L., & Cheng, C. M. (2016). *Biomicrofluidics*, 10(3), 034118.
15. Kuo, Z. K., Chang, T. H., Chen, Y. S., Cheng, C. M., & Tsai, C. Y. (2019). *Diagnostics*, 9(4), 203.
16. Luka, G., Ahmadi, A., Najjaran, H., Alocilja, E., DeRosa, M., Wolthers, K., ... & Hoorfar, M. (2015). *Sensors*, 15(12), 30011-30031.
17. Ma, L., Petersen, M., & Lu, X. (2020). *Applied and environmental microbiology*, 86(9), e00096-20.
18. Mark, D., Haeblerle, S., Roth, G., Von Stetten, F., & Zengerle, R. (2010). *Microfluidics based microsystems*, 305-376
19. Mathur, A., Gupta, R., Kondal, S., Wadhwa, S., Pudake, R. N., Kansal, R., ... & Narang, J. (2018). *International journal of biological macromolecules*, 112, 364-370.
20. McCarthy, J. F., & Shugart, L. R. (2018). (pp. 3-14). CRC Press.
21. Pang, B., Zhao, C., Li, L., Song, X., Xu, K., Wang, J., ... & Li, J. (2018). *Analytical biochemistry*, 542, 58-62.
22. Park, J., Han, D. H., & Park, J. K. (2020). *Lab on a Chip*, 20(7), 1191-1203.
23. Pol, R., Céspedes, F., Gabriel, D., & Baeza, M. (2017). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 95, 62-68.
24. Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2018). *Chemical Society Reviews*, 47(13), 4697-4709.
25. SAVAŞ, S. (2018). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 2(2), 101-107.
26. Tang, R., Yang, H., Gong, Y., You, M., Liu, Z., Choi, J. R., ... & Xu, F. (2017). *Lab on a Chip*, 17(7), 1270-1279.
27. Tian, T., An, Y., Wu, Y., Song, Y., Zhu, Z., & Yang, C. (2017). *ACS applied materials & interfaces*, 9(36), 30480-30487.
28. Yamaguchi, N., Tokunaga, Y., Goto, S., Fujii, Y., Banno, F., & Edagawa, A. (2017). *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
29. Zhao, B., Moore, J. S., & Beebe, D. J. (2001). *Science*, 291(5506), 1023-1026.