

# TEKNOFEST

## HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

### BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

#### PROJE DETAY RAPORU

**PROJE KATEGORİSİ:** Fikir Kategorisi

**PROJE ADI:** Yonga Üstü Laboratuvar Platform ile Kandan Protein Analizi

**TAKIM ADI:** LBMS

**TAKIM ID:** T3-21447-156

**TAKIM ÜYELERİ:** Betül Karakuzu, Ergün Alperay Tarım, Cemre Öksüz

**DANIŞMAN ADI:** Hüseyin Cumhuri Tekin

## LBMS Takımı

Takım üyeleri, Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin Cumhur Tekin tarafından İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik Bölümünde kurulan “Biyomedikal Mikro ve Nanosistemler Laboratuvarı (LBMS)’nda araştırmacı olarak çalışmaktadırlar. İlgi alanları, biyomedikal uygulamalar için mikro/nanoteknolojiler, hasta başı aletleri ve teletıp sistemleridir. LBMS takımı, yaptıkları araştırmalar ile sağlık sektöründe uygun maliyetli, hızlı ve kullanımı kolay sistemler ve mobil uygulamalar geliştirmeyi hedeflemektedir.

## Giriş

Kronik hastalıklar kişinin yaşam kalitesini düşüren ve dünya genelinde pek çok ölüme yol açan hastalıklardır. Dünya Sağlık Örgütü’nün 2002 yılındaki raporuna göre, küresel hastalıkların %43’ü ve tüm ölümlerin %60’ı kronik hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Kronik hastalıkların başında kardiyovasküler hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları ve diyabet gelmektedir [1]. Yavaş gelişim gösteren kronik hastalıkların erken teşhisi, tedavileri için büyük önem taşımaktadır. Örneğin, kronik böbrek hastalığı (KBH), hızlı ilerleyen ve böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilen bir hastalıktır [2]. Siroz, sağlıklı karaciğer hücrelerinin zarar görmesine bağlı olarak karaciğer yapı ve fonksiyonunu etkileyen kronik bir karaciğer rahatsızlığıdır. Pankreatit, pankreasta skar doku oluşumunu tetikleyerek pankreasın düzgün çalışmamasına yol açan ve uzun süren kronik inflamasyondur [3]. Diyabet, pankreasın yeterince insülin üretememesi sonucunda kan şekerinin düzenlenememesine yol açan kronik bir hastalıktır. 2016 yılında, yaklaşık 1.6 milyon insanın diyabetten öldüğü tahmin edilmektedir [4]. Bu tür kronik hastalıklar başka hastalıkları da tetikleyerek kişinin yaşam kalitesini düşürür ve tedavi sürecini zorlaştırır. Kronik hastalıkların ilerlemesini önlemek ve doğru tedaviyi belirlemek için erken teşhis önem taşımaktadır.

Kronik hastalıkların teşhisi için ELISA, kütle spektrometresi, kromatografi, jel elektroforezi gibi yöntemler kullanılmaktadır fakat klinik ortamda gerçekleştirilen bu testler, uzun süre gerektirmesinin yanı sıra hastaların hastaneye gelmesini, karmaşık test prosedürleri ve testler için eğitilmiş personel gerektirmektedir. ELISA, substrat sinyallerine bağlı olarak hedef proteinin konsantrasyonunu belirlemeye dayalı bir yöntemdir. Kütle spektrometresi, protein biyobelirteçlerinin karakterizasyonuna dayalı bir tekniktir. PCR, hedef genleri tespit etmek için yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemdir [5]. Örneğin, kandan C-reaktif proteini (CRP) testi yapılarak vasküler hastalıklar belirlenebilir. Kronik karaciğer rahatsızlıklarında  $\alpha$ -1-asit-glikoprotein (AGP) sentezinin ve haptoglobulin miktarının azaldığı görülmektedir [6]. Kronik böbrek hastalıklarında kanda kreatinin miktarının arttığı bilinmektedir, bu sebeple kreatinin kronik böbrek hastalıklarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [7]. Albumin (BCG) kiti ile serumdaki albumin konsantrasyonu belirlenebilmektedir. Albumin kitinin kullanımında, brom krezol yeşili (BCG) ile albumin etkileşime girerek kromofor yapı oluşturur ve bu ürün 620 nm’de ölçülerek albumin seviyesi ile doğru orantılı bir sinyal vermektedir [8]. i-STAT cihazında kreatinin, kreatinin amidinohidrolaz, keratin amidinohidrolaz ve sarkozin oksidaz ile reaksiyona girerek hidrojen peroksit açığa çıkarır. Hidrojen peroksit, platin elektrotta elektriksel akım oluşturur. Akım büyüklüğü ile kreatinin miktarı doğru orantılıdır [9]. C-reaktif proteini algılanması için kullanılan ELISA kitinde, antikor kaplanmış 96-kuyucuklu plaka kullanılır, örnekler pipetlenir ve örnekteki C-reaktif proteini antikora bağlanır. Biotinle edilmiş anti-CRP antikorları eklenir ve bağlanmamış antikorların yıkanması sonucu HRP ile konjuge straptavidin pipetlenir ve kuyucuklar tekrar yıkanır. TMB substrat eklenmesi sonucu CRP miktarı ile orantılı bir renk ortaya çıkar. Geleneksel yöntemlerde, kanda bulunan birçok madde bu reaksiyonları etkileyebilir ve hatalı sonuçlar ortaya çıkarabilir [10].

Yonga üstü laboratuvar teknolojisi ile daha az hacimde örnek ve malzeme kullanarak, otomatize sistem ile yanlış pozitif sonucuna neden olan etkenler ortadan kaldırılır, böylece hızlı analiz ve hasta başı testi imkânı sağlanmış olur. Yonga üstü laboratuvar platformlarında hedeflenen proteinin spesifik olarak algılanabilmesi önemlidir. Çoğu analiz yöntemi halen örnek hazırlama, algılama ve analiz sorunları yaşamaktadır [5,11]. Önerilen projede, kronik hastalıkların teşhisi için önem taşıyan hedef proteinin, hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanması için teknik personel gerektirmeyen, valf, pompa vb. hasta başı kullanımını zorlaştıran sistemler içermeyen bir yonga üstü laboratuvar platformu tasarlanmıştır. Kullanıcı, platforma rezervuarların bulunduğu yongayı yerleştirerek örneği belirlenen rezervuara damlattıktan, otomatik analiz sonucunda yonga üstünde ortaya çıkan renk miktarı cep telefonu kamerasıyla ölçerek hedef biyobelirteç miktarını belirleyebilecektir. Böylece, hastalık teşhisi için hastaların klinik ortama olan ihtiyacı, örneklerin transferi ve karmaşık protokolleri ortadan kaldırılarak hem erken teşhis hem de hastalığın seyri ev ortamında kolayca sağlanabilecektir.

## Kitle

Hastaların takibi için imkân oluşturacak olan bu hasta başı platformu, hastanın hayat kalitesi ve kritik durumlarda doktor tarafından erken müdahalenin sağlanması için oldukça önem taşıyacaktır. Önerilen bu yonga üstü laboratuvar platformu ile hastane laboratuvarlarında veya sınırlı imkanlara sahip bölgelerde *in vitro* tanı için

kullanılabilecek maliyeti az, hızlı ve hassas bir teknoloji olacaktır. Önerilen bu fikirde hedef kitlenin hastanelerin test laboratuvarları, imkanları sınırlı bölgelerdeki sağlık kuruluşları, anında analize ihtiyaç duyan kronik hastalar olacağı düşünülmektedir.

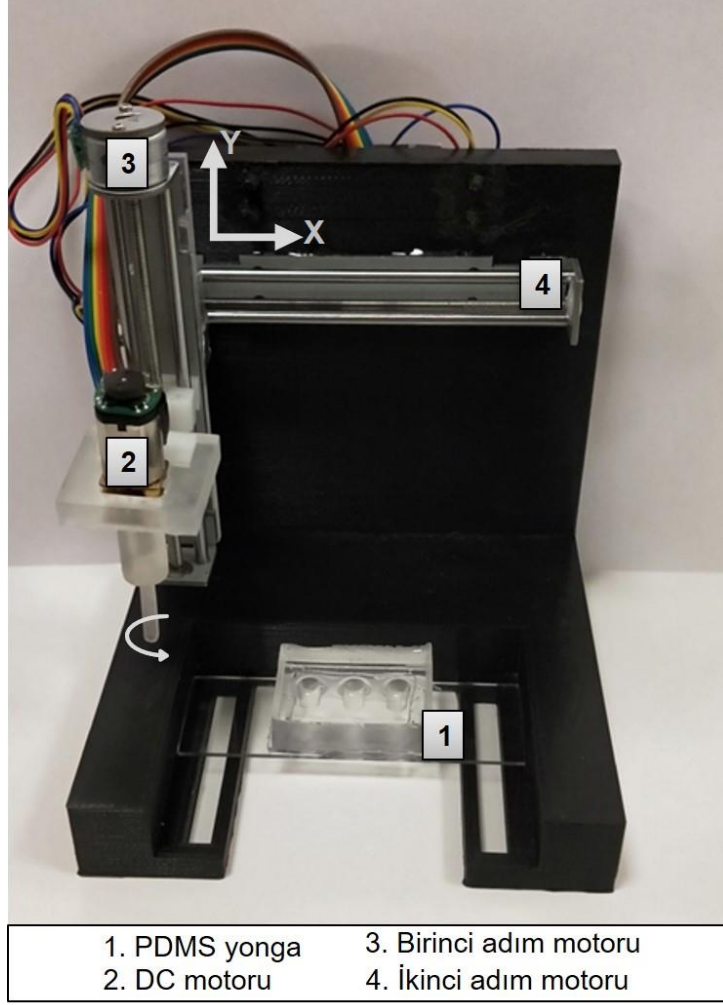
### **Risk**

Önerilen fikirde risk yönetimi yapılmış olup karşılaşılabilecek riskler şu şekilde sıralanabilir: (i) kandan algılaması yapılacak her hedef molekül için algılama işleminin optimizasyon gerektirebilecek olması, (ii) hedef molekülün ışıktan etkileniyor ise ortamdaki ışığın algılama hassasiyetini etkilemesi, (iii) cep telefonlarının kamera performansının birbirinden farklı olması dolayısıyla ölçüm sonuçlarının cep telefonunda cep telefonuna fark etmesi. Bu durumlarda, (i) platform yazılımı açık kaynak olarak erişime açılıp protokol optimizasyonları kullanıcı tarafından platform üstünde gerçekleştirilebilir, (ii) platform ışık geçirmez kapalı kutu olarak tasarlanabilir, (iii) her cep telefonu için standart ölçüm sıvı ile kalibrasyon gerçekleştirilebilir.

### **Yonga Üstü Laboratuvar Platformunun Tasarımı**

Önerilen projede birçok hastalığın takip ve tedavisinde büyük önem taşıyan kan proteinlerinin, kandaki değerlerinin, kolay ve hızlı bir şekilde saptanmasında kullanılması için otomatik olarak teknik personel gerektirmeden hassas bir şekilde belirleyecek yonga üstü laboratuvar platformu geliştirilmektedir. Platform üstünde hedef molekülün algılanması için direkt rekabetçi ELISA protokolü uygulanacaktır. Bunun için analiz edilecek örnek, içerisinde HRP-hedef molekül konjugatı olan PDMS rezervuara damlatılır ve yüzeyi antikorlarla kaplı çubuk rezervuar içerisine otomatik daldırılır. Örnek içerisinde hedef molekül ve HRP-hedef molekül konjugatı antikorlara rekabetçi olarak spesifik tutunur. Ardından plastik çubuk yüzeydeki spesifik olmayan tutunmaları önlemek için PBS ile temizlenir. Temizleme işleminin ardından çubuk TMB solüsyonunun içine alınır. TMB, HRP ile reaksiyona girip ortama mavi renk verir. Oluşan mavi rengin koyuluk derecesi örnekteki hedef molekül miktarı ile ters orantılı olması beklenmektedir.

Bu işlemleri gerçekleştirmek adına, platformda bir takım elektronik, elektromekanik komponentler ve devre elemanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Karıştırma işlemini gerçekleştirmek ve antikor kaplı çubuğu şaftında sabit şekilde tutturmak adına DC motor, rezervuarlar arası hareketi 2 boyutlu olarak sağlayacak adım motorları, motorları sürebilmek için geliştirilmiş motor sürücü kartı, DC motorun dönüş hızını hesaplamak adına enkoder, elektronik ve elektromekanik ekipmanların birbirine bağlanması için gerekli elektronik devre elemanları ve tüm bu elemanların kontrolünü sağlamak amacı ile mikroişlemci kullanılmıştır. Yonga Üstü Laboratuvar Platformunu oluşturan genel bileşenler Şekil 1'de gösterilmiştir.



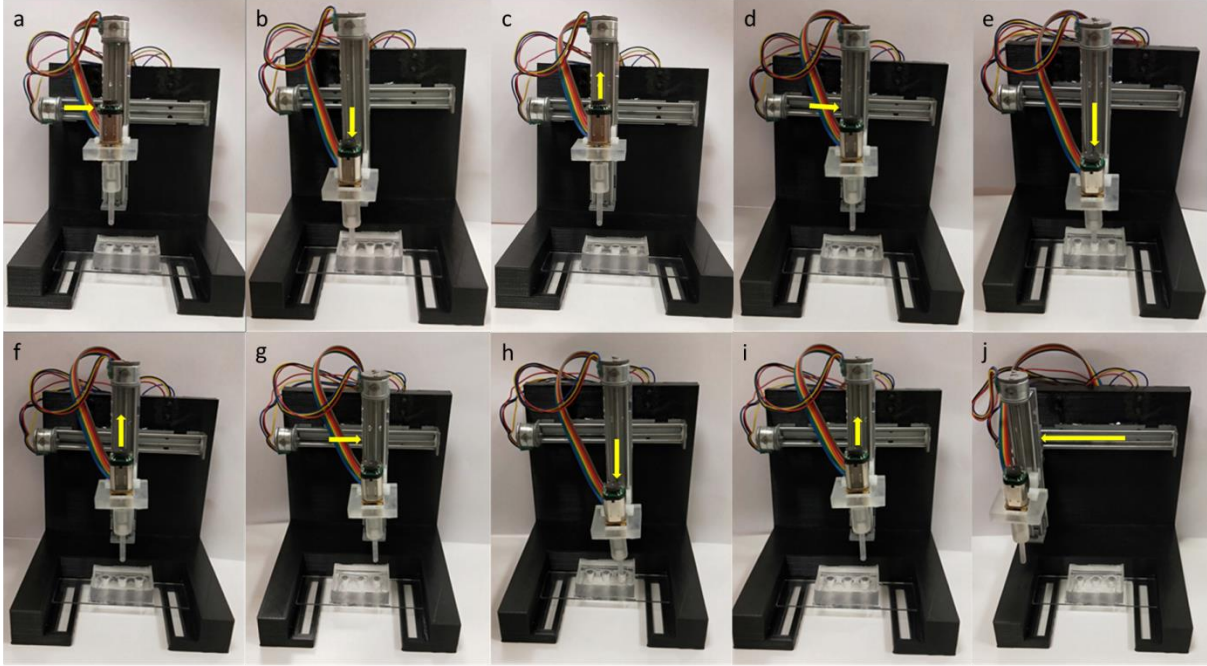
**Şekil 1.** Otomatik hedef molekül analizi için tasarlanan yonga üstü laboratuvar platformu. Platform, renksel değişimin gözlemlenmesi için, üstünde rezervuarların olduğu PDMS yonga ve hedef moleküle özgü antikorlarla kaplı bir çubuğun rezervuarlar arası taşınıp rezervuarlar içinde karıştırılmasını sağlayan bir elektromekanik sistem şeklinde üretilmiştir. Platformun iskeleti Ultimaker 3B yazıcı aracılığıyla PLA fiber kullanılarak basılmıştır. Üretilen platformda 2 tane adım motoru ve 1 tane DC motor kullanılmıştır. Sistem ikinci adım motoru ile x-ekseninde, birinci adım motoru ile y-ekseninde hareket edebilmektedir. DC motoru ile de PDMS yonga rezervuarları içerisinde karışma işlemi gerçekleştirilmektedir.

### ***Elektromekanik Platformun Tasarımı ve Üretimi***

Projenin temel amacı olan, kanda bulunan hedef protein biyobelirtecinin (örneğin kreatinin, vb.) hasta başında direkt rekabetçi enzime bağlı bağışıklık deneyi (ELISA) yöntemi kullanılarak, yonga üstü laboratuvar platformunda renk ölçümleri yapılarak belirlenmesi için elektromekanik platform geliştirilmiştir (Şekil 1). Platformun taban (alt) kısmında gerekli solüsyonların konulması için 3 adet rezervuar bulunmaktadır. Bu rezervuarlarda, kandaki hedef proteininin miktarını belirleyecek renksel ölçümlerin alınabilmesi için gerçekleştirilecek protokollerin uygulanabilmesine elverişli şekilde tasarlanmıştır. Platform, renksel değişimin gözlemlenmesi için, belirlenen kan proteinine özgü antikorlarla kaplı bir çubuğun, belirlenen protokollerin gerçekleşmesi için rezervuarlar arasında hareketi sağlanıp, bu rezervuarlar içinde daha homojen bir reaksiyon elde edebilmek amacı ile karıştırılmasını sağlayan bir elektromekanik sistem şeklinde üretilmiştir. Rezervuarlar üzerindeki bu hareket üç adet motor sayesinde sağlanmaktadır. Sistemin X yönünde (sağ ve sol hareketler) hareket edebilmesi için, vidalı mile sahip olan bipolar adım motoru kullanılmıştır. Y yönünde açısız-doğrusal pozisyon, hız ve ivme kontrolünü sağlaması için, X yönünde hareketi sağlayan adım motorunun aynısı, aşağı ve yukarı hareket sağlamak amacı ile X yönünde kullanılan adım motoruna adapte edilmiştir. Y yönünde hareketi sağlayan adım motorunun, vidalı miline bağlı olan karbon fırçalı, 10:1 oranlı redüktörlü, 6V çalışma geriliminde 3000 rpm hızla dönen, yüksek performanslı mikro DC motor kullanılmıştır. Bu motor sayesinde solüsyonların homojen bir şekilde karıştırılması ve biyobelirteçlerin, çubuk üzerine bağlanmasını arttırması sağlayacaktır. DC motor, karbon fırçalara sahip olmasından dolayı yüksek performansa ve uzun ömre sahiptir. Ayrıca 15V gerilime kadar çalışılabilir olması, saniye başı dönme sayısını arttırmıştır. Bu sayede yüksek hızlarda karıştırma işlemine olanak

sağlamıştır Motorların kontrolü ise Arduino Mega 2560 R3 mikroişlemcisi ve A4988 voltaj regülatörlü motor sürücü kartı ile yapılmıştır.

Kullanılan motorların hareketleri, Arduino mikroişlemci (Arduino Mega 2560 R3) ile kontrol edilmektedir. Adım motorları A4988 voltaj regülatörlü, üç motor sürücü kartı aracılığıyla, Arduino mikroişlemciye bağlanmaktadır. Adım motorlarının ikisi de 6.5V gerilim değerinde çalışmakta ve ~ 0.9 cm/s hızda ilerlemektedir. DC motor ise deneysel devre aracılığı ile Arduino mikroişlemciye bağlanmaktadır. Motorlar, Şekil 2’de görüldüğü gibi sırası ile gerçekleştirilmektedir.

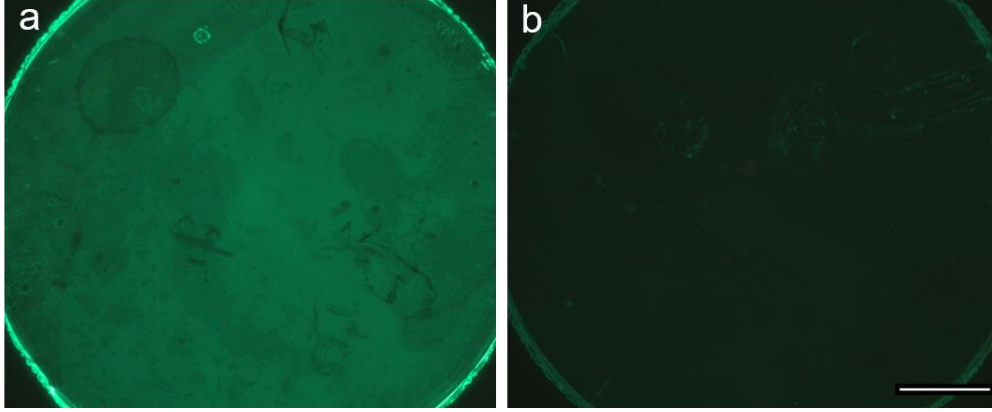


**Şekil 2.** Adım motorlarının platform üzerindeki hareketleri. a), d), g) Birinci adım motorunun +X yönündeki hareketini göstermektedir. b), e), h) İkinci adım motorunun –Y yönündeki hareketini göstermektedir. c), f), i) İkinci adım motorunun +Y yönünde hareketini göstermektedir. j) Birinci adım motorunun –X yönünde hareketini göstermektedir.

DC motorun dakikada yaptığı dönme sayısı ise, farklı gerilimlerde, farklı değerlere sahiptir (Şekil 6). DC motorun dönüş hızı, karıştırma verimliliğini ve buna bağlı olarak bağlanma hızını etkilemektedir. DC motorun dönüş hızı ölçülmüştür ve elde edilen değerlerde karıştırma işleminin verimliliğine etkileri proje kapsamında hesaplanacaktır.

### ***Biyobelirteçleri yakalama yüzeyi kullanılan cam yüzeyin üretilmesi***

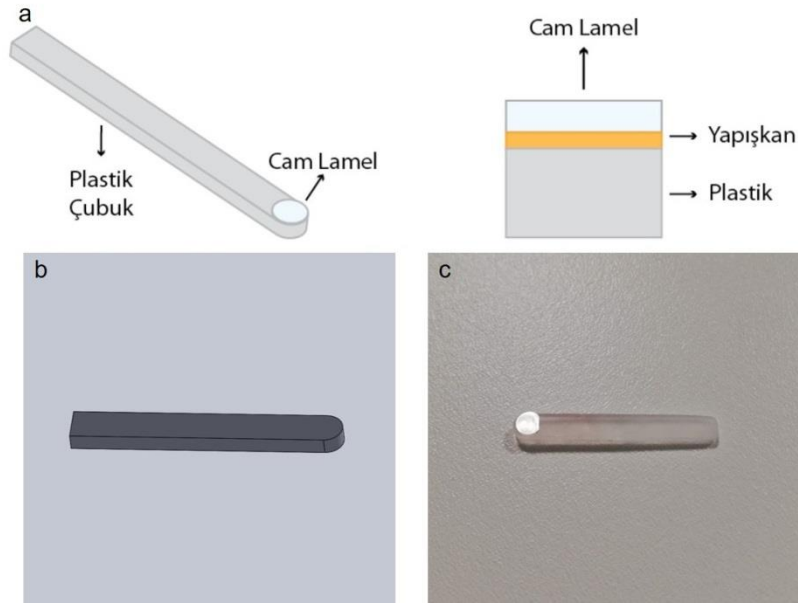
Bu işlem için izlenecek adımlar şöyledir [12,13]: oksijen plazma ile yüzeyi aktive edilen cam lamel (3-mercaptopropyl trimetoksilan (3-MPS)) içine daldırılmıştır. Ardından N-g-Maleimidobutyryloxy succinimide ester (GMBS) solüsyonuna daldırılıp inkübe edilmiştir. Bekleme işleminin ardından Protein-G ve anti-hedef molekül antikorunu ile +4°C’de inkübe edilmiştir. Böylelikle cam yüzeyin yüzeyi antikor ile kaplanmış olacaktır. Hedef molekülün maksimum yakalanması için yüzeyin Protein-G ve antikora tamamen doymuş olması gerekmektedir. Bunun için kullanılması gereken konsantrasyonlar floresan görüntüleme metodu kullanılarak optimizasyonu sağlanmıştır (Şekil 3). Optimizasyonda floresanla işaretlenmiş IgG miktarının doygunluğa eriştiği sinyal, optimum anti-hedef molekül antikor konsantrasyonunu verecektir. Mikroskop görüntülerinden görüldüğü üzere anti-hedef molekül antikor konsantrasyonu arttıkça floresan yoğunluğu da artmaktadır.



**Şekil 3.** 5× objektif altında cam yüzeylerin çevrik ışık mikroskobu görüntüleri. Örnek gösterilen antikor konsantrasyonları sırasıyla a) 1 µg/mL b) 200 µg/mL şeklindedir. Uygulanan örnek bir Anti-hedef molekül antikor farklı konsantrasyonlarda denenip yüzey modifikasyon protokolü test edilmiştir. (Ölçek: 500 µm).

#### ***Antikor kaplı camın yonga üstündeki rezervuarlarda analiz işlemleri için plastik çubuğa entegrasyonu***

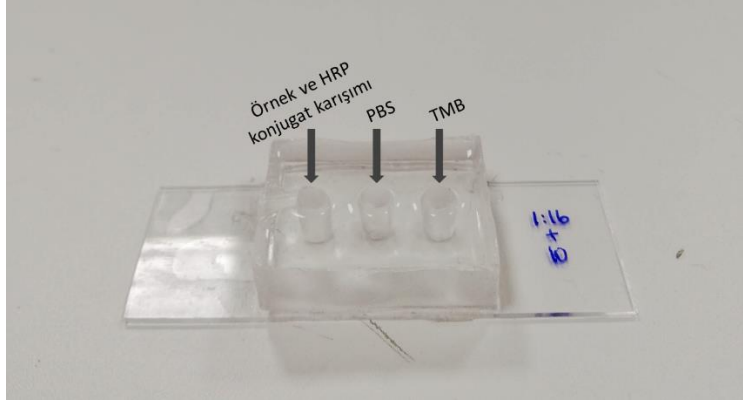
3 mm × 23 mm × 1.5 mm boyutlarındaki çubuk, bilgisayar destekli tasarım programı yardımı ile tasarlanmıştır ve üç boyutlu yazıcıda üretilmiştir. İzopropil alkol ile temizlenen çubuğa 3 mm çapındaki cam lamel, 3B yazıcı reçinesini yapışkan olarak kullanarak plastik çubuğa yapıştırılmıştır [14]. Bu işlem için arka yüzeyi reçine ile kaplanan antikorlu cam, plastik çubuk üstünde 15 s UV ışığa maruz bırakılarak plastik çubuğa yapıştırılmıştır (Şekil 4).



**Şekil 4.** Hedef molekülün yakalama yüzeyi olarak kullanılacak plastik çubuk. a) Cam lamel reçine ile plastik çubuk üzerine yapıştırılacaktır. b) Bilgisayar tabanlı yazılım ile tasarlanan plastik çubuk 3 mm genişliğe, 23 mm uzunluğa ve 1,5 mm kalınlığa sahiptir. c) Üretilen plastik çubuğun cam lamel ile yapışmış son hali.

#### ***Rezervuarları içeren yonganın tasarımı ve üretimi***

Yonganın üretimi için 3 tane 5 mm çap ve 10 mm yüksekliğe sahip olacak şekilde sandviç şeklinde kalıplar bilgisayar destekli tasarım programı yardımı ile tasarlanıp 3B yazıcı ile üretilmiştir (Şekil 5). Daha sonra yumuşak litografi yöntemiyle bu kalıplara polidimetilsiloksan (PDMS) dökülerek PDMS çipler elde edilmiştir [15]. Üretilen yonga, platformun tabanında bulunan hazneye ileri ve geri hareket ettirilebilecek şekilde yerleştirilebilmektedir.



**Şekil 5.** PDMS yonga tasarımı ve üretim. PDMS yonganın cam üzerindeki konum ve boyutu bu şekildedir. Üretilen PDMS yonga 3 tane rezervuar içermektedir. Her bir rezervuarda farklı çözeltiler olacaktır.

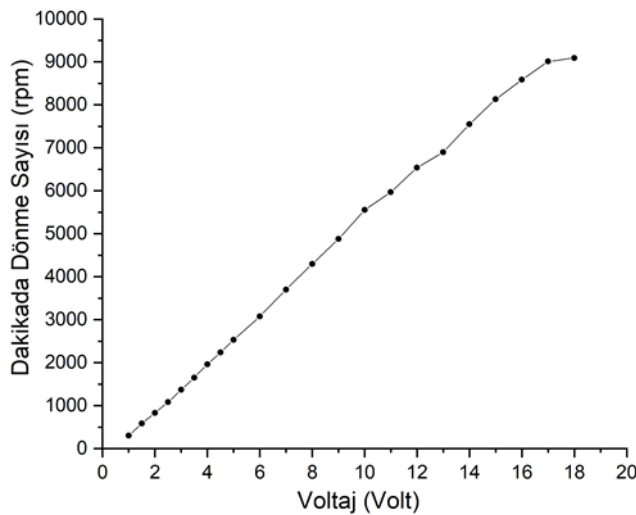
### **Platformun Karıştırma Performansı**

Platformda bulunan rezervuarlardaki sıvıların, uygulanacak protokollerin verimli bir şekilde çalışması için homojen dağılması gerekmektedir. Sıvıların zamana bağlı olarak homojen karıştığını göstermek için karıştırma endeksi değeri hesaplanır [16]. Karıştırma endeksi, denklem 1'de gösterildiği gibi, piksel başına düşen renk yoğunluğu ve ortalama renk yoğunluğuna bağlı olarak hesaplanmaktadır [17].

$$KE(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \left( \frac{I(t,k) - I_{ort}(t)}{I_{ort}(t)} \right)^2}, \quad (1)$$

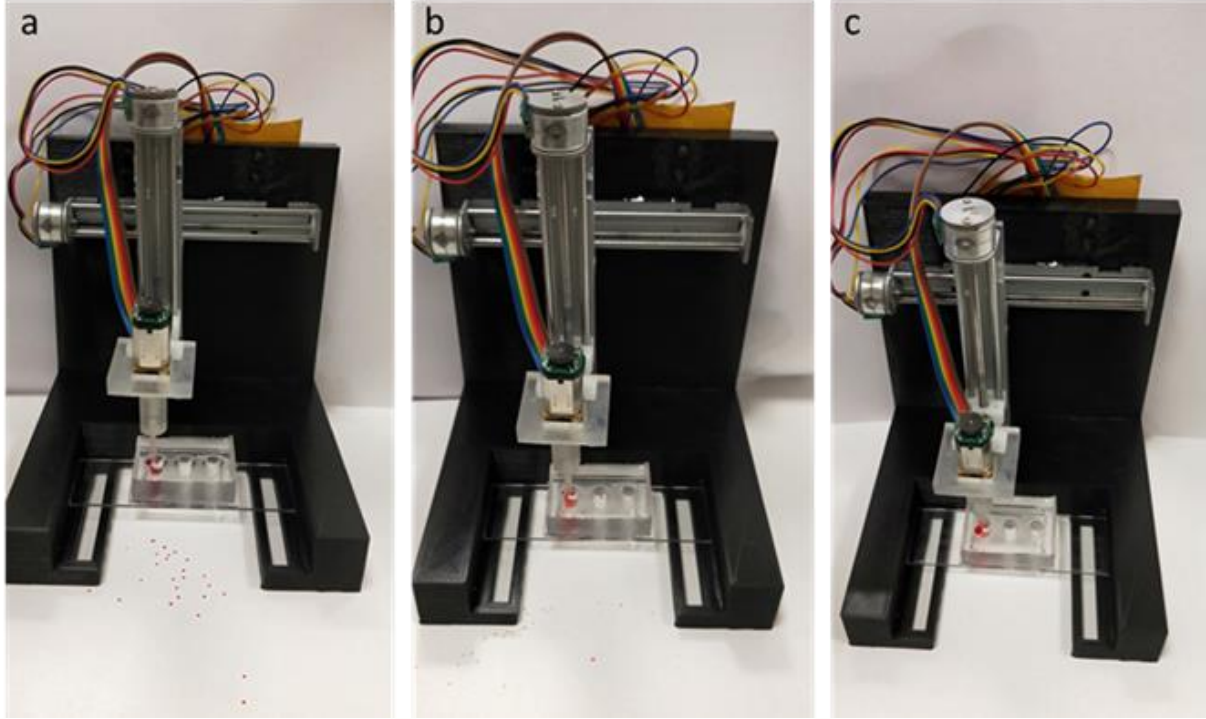
Burada  $KE(t)$  t anındaki karıştırma endeksini,  $N$ , toplam piksel sayısını,  $I(t,k)$ , k pikselinin t anındaki yoğunluğunu ve  $I_{ort}(t)$  ise t anında denetlenen alanda piksellerin ortalama yoğunluk değerini göstermektedir. Karıştırma endeksi değeri sıfıra yaklaştıkça, karışımın homojenliği artmaktadır. Karışma endeksi değeri, 0.1 değerinin altında kalıyor ise, homojen bir karışım elde edildiğine emin olunabilmektedir [16].

DC motor üstüne uygulanan gerilimle farklı hızlarda dönebilmektedir (Şekil 6). Karıştırma deneyleri yapılmadan önce, platformda bulunan rezervuarlardaki sıvıların, DC motorun dönme hızına bağlı olarak, rezervuar dışına sıçrama olmadan karıştırılabileceği maksimum DC motor dönüş hızı belirlenmiştir. DC motorun 4800 – 9000 rpm dönme hızında hareket ettiği, yani 9V gerilimden büyük olan değerlerde çalıştığı durumlarda rezervuar içindeki 100  $\mu$ L sıvıyı, rezervuarın dışına sıçratıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 7). DC motorun 4500 rpm ve altı dönüş hızlarında 100  $\mu$ L sıvıyı sıçratmadığı ölçülmüştür.



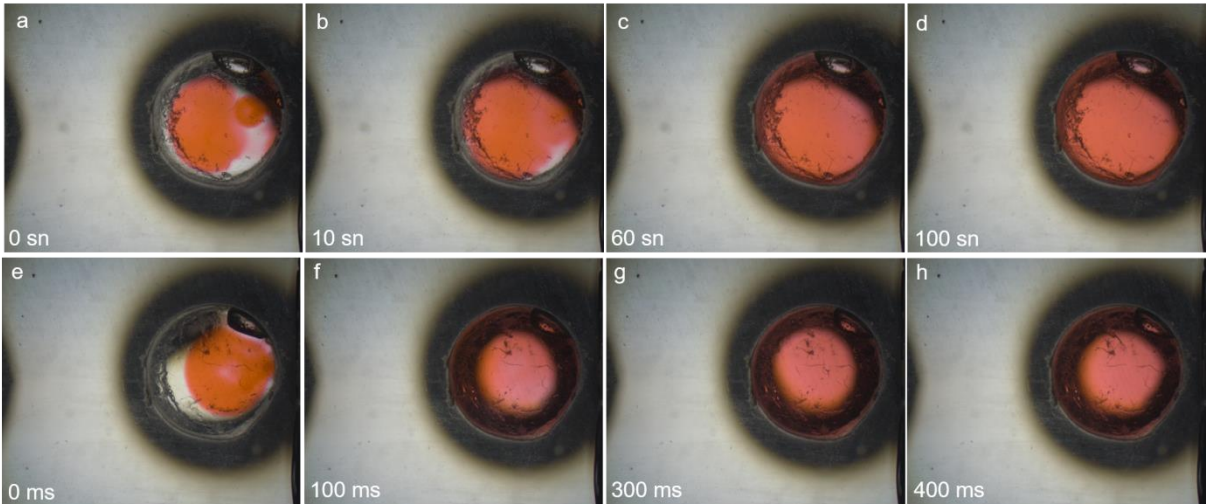
**Şekil 6.** DC motorunun gerilime bağlı dönüş hızı. 1V-18V gerilim değerleri arasında, DC motorun dakikada dönme sayıları verilmiştir. DC motorunun dakikada dönme sayısı 300-9000 rpm arasında değiştiği ve doğrusal şekilde voltaja bağlı arttığı gözlemlenmiştir.





**Şekil 7.** 10V, 12V ve 15V gerilim değerlerinde karıştırılan 100  $\mu$ L sıvının rezervuardan taşması. a), b) sırasıyla 10V ve 12V değerinde bir miktar sıvının deney yapılan yüzey dışına sıçradığı gözlemlenmiştir. c) 15V değerinde ise sıvının çip üzerinde rezervuardan taşıdığı görülmüştür.

Hiçbir karışma tekniği uygulanmadan, difüzyon yolu ile 99  $\mu$ L su ve 1  $\mu$ L kırmızı gıda boyası kullanılarak, ilk bir dakika içinde birer saniye aralıklarla ve birinci dakikadan sonra bir saat boyunca ikişer dakika aralıklarla mikroskop altında görüntüler elde edilmiştir (Şekil 8a-d). Karıştırmanın etkisini gözlemlemek adına 4300 rpm hızda dönen DC motor ile 99  $\mu$ L su ve 1  $\mu$ L kırmızı gıda boyası kullanılarak yapılan karıştırma deneyinde, 1 saniye boyunca 100er milisaniye aralıklar ile rezervuar görüntüleri mikroskop altında çekilmiştir (Şekil 8e-h).

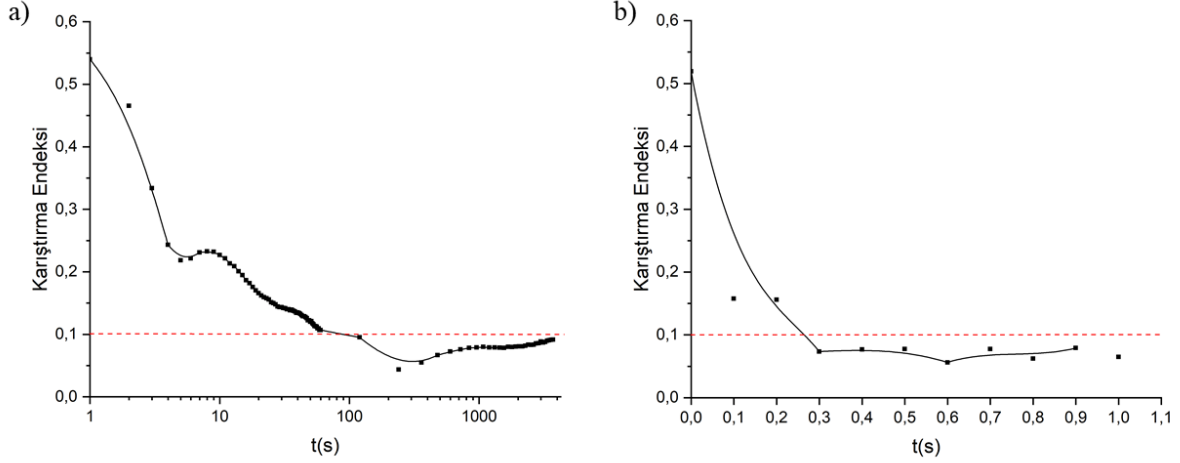


**Şekil 8.** a) ve e) görüntüleri, 99  $\mu$ L suya eklenen 1  $\mu$ L gıda boyasının deney başlangıcındaki görüntüleridir. Su ve gıda boyası bu aşamada hiç karışmamıştır. b), c) ve d) görüntüleri sırası ile, difüzyonun görüntülerinin 10., 60. ve 100. saniyelerindeki görüntüleridir. f), g) ve h) görüntüleri sırası ile, 4300 rpm hızında karışan gıda boyası su karışımının 100., 300. ve 400. milisaniyede elde edilen görüntülerdir.

Karıştırma performansını ölçmek için kullanılacak karıştırma indeksi ile platformun karıştırma performansı belirlenmiştir. Karıştırma verimliliğini ölçmek için, 99  $\mu$ L su ve 1  $\mu$ L kırmızı gıda boyası kullanılarak, platformda hiçbir karıştırma tekniği uygulanmadan, difüzyon yoluyla elde edilen karıştırma indeksi değerleri ile DC motorun sıçrama olmadan en yüksek hızda karışma işlemi belirli sürelerde karıştırılarak, karışma indeksi değerleri



belirlenmiştir. Difüzyon üzerine yapılan hesaplamalar sonucu, yaklaşık 100 saniye sonunda karıştırma endeksi değeri 0.1 değerinin altına düşmüştür ve homojen bir karışım elde edilmiştir (Şekil 9a). 4300 rpm’de DC motor ile yapılan karıştırma deneylerinin sonucunda, yaklaşık 0.3 saniye sonunda karıştırma endeksi değeri 0.1 değerinin altına düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 9b). Bu sonuç bize üretilen platformun gerçekleştirdiği karıştırma işleminin difüzyona göre yaklaşık 330 kat daha hızlı, homojen bir karışım elde edilebildiğini göstermektedir.



**Şekil 9.** a) Difüzyon yolu ile karışan 99  $\mu$ L su ve 1  $\mu$ L gıda boyasının zamana bağlı karıştırma endeksi grafiği. Karıştırma endeksi, 100 saniye sonunda 0.1 değerinin altına düşmüştür ve homojen bir karışım elde edilmiştir. b) . DC motoru ile 4300 rpm hızında karışan 99  $\mu$ L su ve 1  $\mu$ L gıda boyasının zamana bağlı karıştırma endeksi grafiği. Karıştırma endeksi, yaklaşık 0.3 saniye sonunda 0.1 değerinin altına düşmüştür ve homojen bir karışım elde edilmiştir.

#### ***Direkt rekabetçi ELISA protokollerinin platform üstünde uygulanması***

Önerilen fikirde uygulanacak hedef molekülün direkt rekabetçi ELISA protokolünde, kan örneği içerisindeki hedef molekül, HRP-hedef molekül varlığında rekabetçi şekilde cam yüzeyindeki antikorlara yapışacak ev daha sonra TMB ve HRP reaksiyonundan mavi renk ortaya çıkacaktır. Platformda oluşan renk yoğunluğuna göre hedef molekülün miktarını belirlenecektir. Yaptığımız testler sonucunda farklı HRP derişimleri sonucunda ortaya çıkan renk farkını cep telefonu kamerası ile algılanabileceği gösterilmiştir. HRP miktarı arttıkça rezervuarda oluşan rengin koyuluğu artmış. Bundan sonraki aşamada geliştireceğimiz mobil yazılım sayesinde, oluşan renk koyuluğuna karşılık gelen kandaki molekülün miktarı belirlenecektir. Bu yazılım, mavi renk yoğunluğuna göre dijital görüntünün mavi kanalı ile ölçümler yaparak mavi renk yoğunluğunun değerine bakacaktır. Bu sayede, mavi yoğunluğu belirli skalalar ile belirlenerek, analiz sonundaki renk yoğunluğu ölçülebilir ve hedef molekülün miktarı belirlenebilecektir.

#### **Sonuç**

##### **Maliyet Analizi ve Proje Planı**

Ürünün prototipi için gereken başlıca malzemeler; DC motoru, step motoru, Arduino mikroişlemcisi, güç kaynağı, ölçü aleti probu, Step motor sürücü kartı, PLA filament’dir. Yonga tasarımı için gereken ürünler 3Boyutlu yazıcı reçinesi, PDMS, cam lamel’dir. Plastik çubuk için cam lamel ve reçine kullanılacaktır. Cam lamelin yüzeyini kaplamak için kullanılacak malzemeler 3-mercaptopropyl trimetoksisilan (3-MPS), N-g-Maleimidobutyroxy succinimide ester (GMBS), protein-G, anti-hedef molekül antikor’dur. Deney aşamasında kullanılacak ürünler hedef molekül, Horse-radish peroxidase (HRP) konjugat, Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS), 3 3' 5 5'-tetramethylbenzidine (TMB)’dir.

**Tablo 1.** Maliyet analizi tablosu

Ürün Adı	Maliyet
<b>Elektromekanik Platform</b>	
A4988 Step motor Sürücü Kartı	51,90 TL
PLA filament	107,48 TL
DC motor	107 TL
Step motoru	197 TL
Arduino Mega	299,64 TL
<b>Yonga</b>	
PDMS	1,28 TL
Cam lam	1 TL
<b>Antikor Kaplı Çubuk</b>	
3-MPS	1,05 TL
GMBS	2.3 TL
Protein-G	2.28 TL
Anti-hedef molekül antikor	0,32 TL
Cam lamel	10 TL
Reçine	0,94 TL

Elektromekanik platform, yonga ve antikor kaplı çubuğun birim maliyeti Tablo 1’de verilmiştir. Bu kapsamda deney aşamasında ilgili deneylerin yapılması için hedef molekül (0.3 TLbirim test başı maliyeti) , HRP konjugat, (7.27TL birim test başı maliyeti) PBS (0.04 TL birim test başı maliyeti) ve TMB (0.51 TL birim test başı maliyeti) kullanılacak olup, projenin toplam maliyet, 10000 TL’dir.

**Tablo 2.** Proje planı takvimi

No	Temel Falıtyetin Adı	Aylar												Kimler Tarfından Yapılacağı	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
2	Hedef proteinin algılanması için direkt rekabetçi ELISA protokollerinin platformda gerçekleştirilmesi														Cemre Öksüz Betül Karakuzu
3	Hedef proteinin platform üzerinde algılanması														Betül Karakuzu Cemre Öksüz Ergün Alperay Tarım
4	Hedef proteinin cep telefonu kamerası ile analiz edilmesi														Ergün Alperay Tarım Cemre Öksüz
5	Serumda çözülmüş hedef proteinin platformda algılanması														E. Alperay Tarım Betül Karakuzu Cemre Öksüz

## Teşekkür

Desteklerinden ötürü TÜBİTAK’a (217S518) teşekkürlerimizi sunarız.

## Kaynaklar

1. Integrated chronic disease prevention and control [Internet]. World Health Organization. 2002 [cited 2020 Jun 1]. Available from: [https://www.who.int/chp/about/integrated\\_cd/en/](https://www.who.int/chp/about/integrated_cd/en/)
2. Causes of Chronic Kidney Disease [Internet]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 2016 [cited 2020 Jun 1]. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/chronic-kidney-disease-ckd/causes>
3. Todd JC, Sanford AH. Clinical diagnosis by laboratory methods. WB Saunders Company; 1924.
4. Diabetes [Internet]. World Health Organization. 2020 [cited 2020 Jun 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
5. Wu J, Dong M, Rigatto C, Liu Y, Lin F. Lab-on-chip technology for chronic disease diagnosis. *NPJ Digit Med.* 2018;1(1):1–11.
6. Arima T, Motoyama Y, Yamamoto T, Nagata K, Kondo T. Serum glycoproteins in the liver diseases. IV. Alpha-1 acid glycoprotein level in liver cirrhosis. *Gastroenterol Jpn.* 1977;12(2):43–6.
7. Kidney Disease Tests and Procedures [Internet]. Kidney Health Australia. 2018 [cited 2020 Jun 1]. Available from: [https://kidney.org.au/cms\\_uploads/docs/kidney-disease-tests-and-procedures.pdf](https://kidney.org.au/cms_uploads/docs/kidney-disease-tests-and-procedures.pdf)
8. Albumin (BCG) Assay Kit (Colorimetric) Assay [Internet]. Abcam. [cited 2020 Jun 1]. Available from: <https://www.abcam.com/albumin-bcg-assay-kit-colorimetric-ab235628.html>
9. Schenk PW, Cransberg K, Wolff ED, de Rijke YB. Point-of-care creatinine testing in children at risk for sudden deterioration of renal function. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(11):1536–41.
10. Human C-Reactive Protein ELISA Kit [Internet]. Sigma Aldrich. [cited 2020 Jun 1]. Available from: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/rab0096?lang=en&region=TR&gclid=CjwKCAjwztL2BRATEiwAvnALcqGg2rtVjfFoSSzyRUIB4V9Lo54wQUHdK0HkOlcCwflFqLwsDIGZPBoCssAQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/rab0096?lang=en&region=TR&gclid=CjwKCAjwztL2BRATEiwAvnALcqGg2rtVjfFoSSzyRUIB4V9Lo54wQUHdK0HkOlcCwflFqLwsDIGZPBoCssAQAvD_BwE)
11. Hong JW, Studer V, Hang G, Anderson WF, Quake SR. A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture. *Nat Biotechnol.* 2004;22(4):435–9.
12. Inan H, Kingsley JL, Ozen MO, Tekin HC, Hoerner CR, Imae Y, et al. Monitoring Neutropenia for Cancer Patients at the Point of Care. *Small methods.* 2017;1(9):1700193.
13. Wang S, Esfahani M, Gurkan UA, Inci F, Kuritzkes DR, Demirci U. Efficient on-chip isolation of HIV subtypes. *Lab Chip.* 2012;12(8):1508–15.
14. Kecili S, Tekin HC. Adhesive bonding strategies to fabricate high-strength and transparent 3D printed microfluidic device. *Biomicrofluidics.* 2020 Mar;14(2):024113.
15. Tekin HC, Cornaglia M, Gijs MAM. Attomolar protein detection using a magnetic bead surface coverage assay. *Lab Chip.* 2013;13(6):1053.
16. Tekin HC, Sivagnanam V, Ciftlik AT, Sayah A, Vandevyver C, Gijs MAM. Chaotic mixing using source–sink microfluidic flows in a PDMS chip. *Microfluid Nanofluidics.* 2011;10(4):749–59.
17. Ottino JM. The kinematics of mixing: stretching, chaos, and transport. Vol. 3. Cambridge university press; 1989.