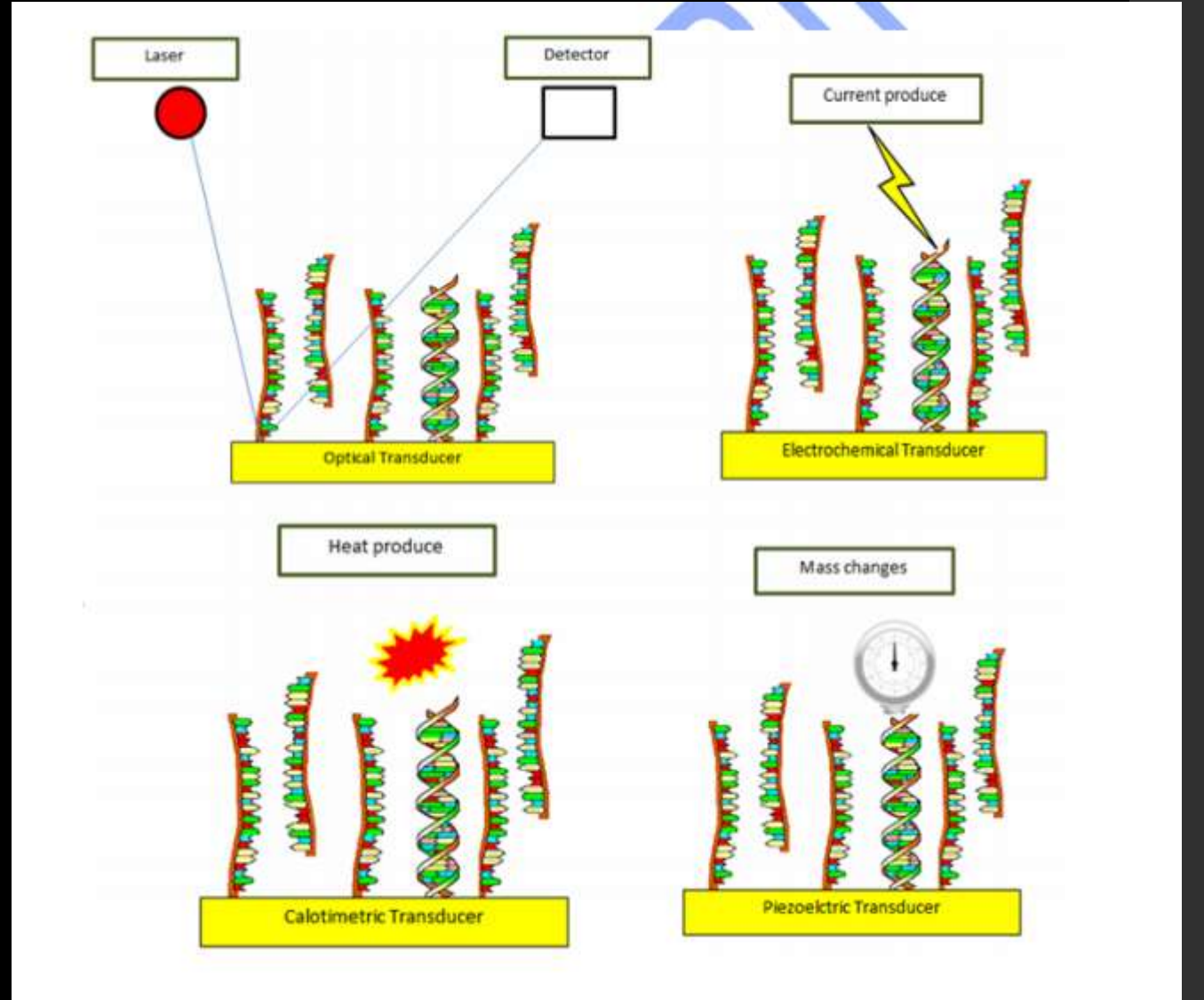


DÖNÜŞTÜRÜCÜLER

Biyosensör Bileşenleri ve Türleri

Biyolojik tanıyıcı ajan kendi spesifik olduğu ajanı tanır, onunla etkileşime girer ve çevirici sistemin algılayabileceği sinyali üretir. Bu substrat için enzim olabildiği gibi, antijen için antikor, şeker için lektin, tamamlayıcı sekans için nükleik asit olabilir. Biyosensörün yapılandırılmasında en önemli nokta, biyolojik tanıma işleminin hassaslığı, hedef kimyasala spesifikliğidir. Her reaksiyon için kullanılabilecek evrensel kavramda bir çevirici vardır.



Sınıflandırma Tabanlı Dönüştürme Metotları

Biyoalgılama materyalleri ve dönüştürme araçları arasındaki ara birim formatları tabanında, biyosensörler, iki genel kategoriye ayrılabilir:

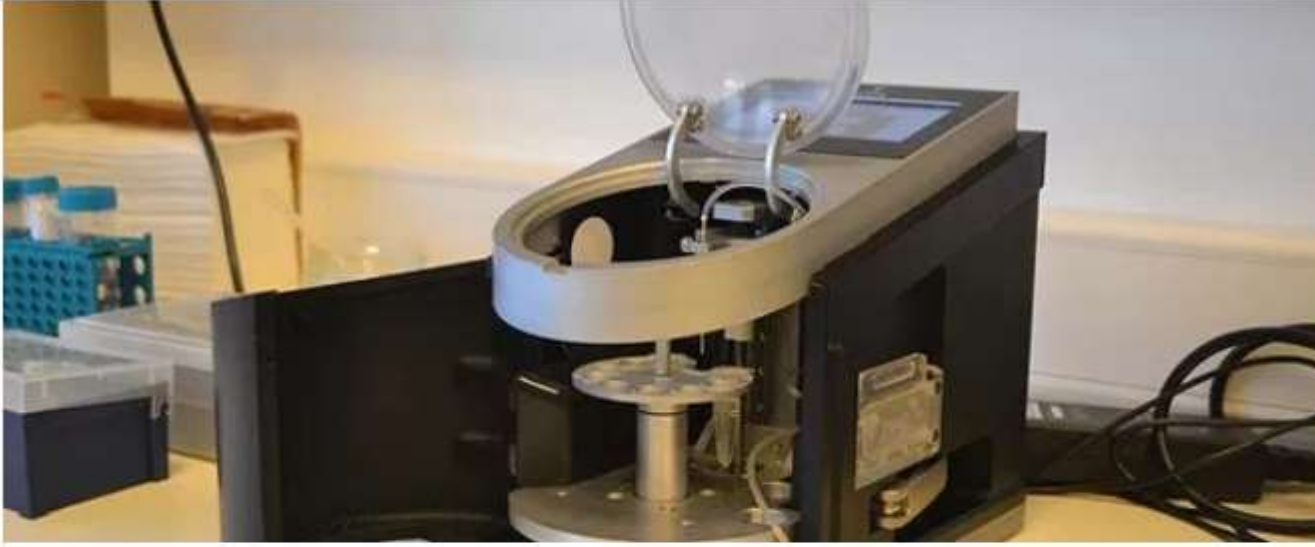
- Doğrudan biyosensörler (veya label free biyosensörler)*, içinde fiziksel ve kimyasal sinyaller doğrudan analitin varlığını ve miktarını göstermektedir (örneğin, glikoz, bakteri, ammonia), çevricilerden her hangi birini kullanarak, enzim elektrotlarının birçoğu, impedans, optik fiber, yüzey plazmon rezonans (SPR), yüzey akustik dalga kılavuzu (SAW) veya QCM transdüserler.

- Dolaylı biyosensörler (veya etiketli biyosensörler)*, içinde analitlerin varlığının sebep olduğu kimyasal reaksiyon etiketler vasıtasıyla tespit edilebilir (örneğin enzimler, ışıma, metal partiküller) bunlar da çeşitli elektrokimyasal, impedans, optik, alan etkili transistör (FET), QCM, kalorimetrik ve manyetik transdüserler gibi transdüserleri kullanarak biyokimyasal sinyalleri yükseltmektedir. Bariz şekilde, aynı biyosensör ya doğrudan ya da dolaylı olarak farklı uygulamalarda kullanılabilir. Kullanılan farklı dönüştürme araçları bazında, biyosensörleri elektrokimyasal, optik, pizoelektrik, termal ve manyetik biyosensörler olarak sınıflandırabiliriz.

- ***Elektrokimyasal Dönüştürücüler*** : Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili dönüştürücülere rastlanmaktadır.

Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, diğer tiplerle kıyaslandığında en eski ve en gelişmiş biyosensörlerdir. Erken dönemlerde, genellikle biyosensörler özellikle klinik glikoz analizi için geliştirilen enzim elektrotları şeklindeydi. Sonra, enzim-bağımlı imünoelektrokimyasal (IEC, Immunochemical) deney Heinemann ve meslektaşları tarafından elektrokimyasal biyosensörlerin hassasiyetini artırmak için geliştirildi [60]. Bir tamponun elektriksel özelliklerinin etkisi (enzimatik reaksiyon tarafından veya Ab-Ag etkileşimince sebep olunan) çeşitli elektrokimyasal metotlarla ölçülebilir. Elektrokimyasal biyosensörler üzerine son araştırmalar elektrot tasarımlarının geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır (örneğin küçültme, etkin elektron transferi, nanomateriyaller ve daha iyi sabitleme prosedürleri). Elektrokimyasal biyosensörler sonra amperometrik/voltmetrik, potansiyometrik ve iletkenlik/kapasitans/impedans biyosensörler olarak ayrılabilir. Bunların hepsi ileride değerlendirilecektir.



YERLİ “ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR” (MİSENS) CİHAZI, KANSER İLAÇLARININ DNA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİ ANINDA ÖLÇECEK

© 20/10/2016 Bilim Dalları, Bilimsel Araştırmalar, Genel, Manşet, Üniversiteler, Yerel

f Facebook

t Twitter

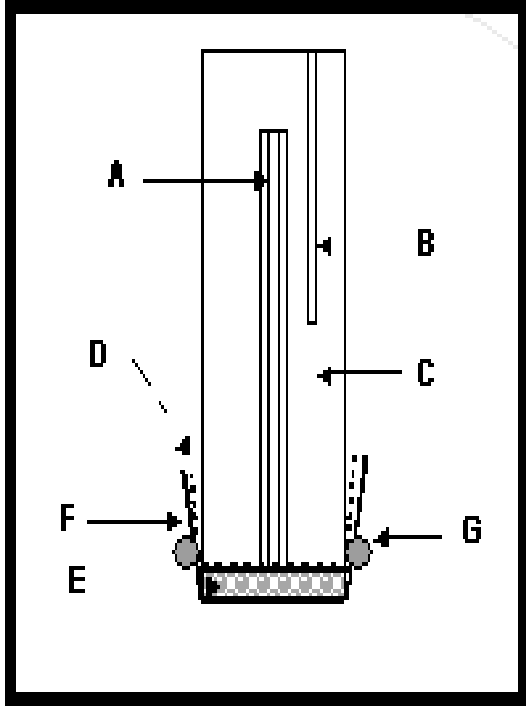
G+ Google +

Stumbleupon

in LinkedIn

Pinterest

Yerli “Elektrokimyasal Biyosensör” (MiSens) Cihazı, Kanser İlaçlarının DNA Üzerindeki Etkilerini Anında Ölçecek. TÜBİTAK BİLGEM ve GTÜ’nün iş birliği ile üretilen ve taşıdığı özellikler bakımından dünyada ilk olan “biyosensör”, başta kanser ilaçlarının DNA üzerindeki etkileri olmak üzere birçok tıbbi analizde kullanılıyor.



**Amperometrik esaslı
bir biyosensörün**

şematik gösterimi

A: Çalışma elektrodu(Pt),

B: Referans elektrot

(Ag/AgCl),

C: Elektrolit çözelti(KCl),

D: İç gaz geçirgen

membran(Teflon),

E: İmmobilize enzimi

içeren biyoaktif tabaka

F: Dış koruyucu

membran(Selüloz a setat

v.s)

Bir mikro çalışma elektrotu ile bir karşıt elektrot arasına dışarıdan denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur bu iki elektrot arasından akım geçer. Bu yöntem amperometri adı verilir. Çalışma elektrodunda indirgenen ve yükseltgenen madde bir katyon, bir anyon yada yüksüz bir bileşik olabilir. Çözeltide destek elektrolit denen ve elektrotlar arasına uygulanan gerilim değerlerinde elektroaktif olmayan iyonların fazla miktarda bulunması çözeltinin elektriksel direncini azaltır (Yıldız, 1999). Türlerin indirgenme ve yükseltgenmesi genelde çalışma elektrodunda gerçekleşir ve ikinci bir elektrot referans olarak kullanılır. Çalışma elektrodunun anot yada katot olarak iş görmesi tamamen analitin yapısına bağlıdır. Buna örnek olarak glukoz oksidaz biyosensörü verilebilir, burada enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'nin tayini mümkün olabildiği gibi glukozun oksidasyonu süresince tüketilen oksijen de izlenebilir. H_2O_2 'nin izlenmesi durumunda bir platin elektrot anot olabilmektedir ki +0,6V/SCE gibi pozitif bir değerde polarizasyonu olasıdır. Diğer durumda, oksijenin izlenmesi halinde,

kullanılacak çalışma elektrodunun negatif bir potansiyelde (-0,6V/SCE) polarize olması ve katot görevini görmesi gerekmektedir.

Oksijen problemleri platin bir katot ve gümüş klorür ile kaplı gümüş bir anodu içermektedir. Bunların her ikisi KCl çözeltisi içerisinde olup analit örnekten oksijen duyarlı membran vasıtasıyla ayrılmaktadır. Membran boyunca difüze edilen oksijen katotda indirgenir, oluşan akım ise örnek içerisindeki oksijen miktarı ile orantılıdır. Biyolojik sistemlerin bu tip elektrotlar üzerine immobilizasyonu ile biyosensörlerin hazırlanması mümkündür ve enzimatik reaksiyonlarında oksijen tüketen yada üreten enzimler bu tip sistemlerde biyolojik materyal olarak kullanılabilirler (Tran Minh, 1993).

Amperometrik/Voltmetrik Biyosensörler: Amperometrik ve voltmetrik biyosensörler elektro kimyasal sistem ile kendi akım potansiyel ilişkilerine göre sınıflandırılabilir. Amperometrik sensörler, voltmetrik sensörlerin bir alt grubu olarak görülebilir. Amperometrik sensörlerde, elektrokimyasal hücrelere sabit bir potansiyel uygulanmaktadır ve sonra ilişkili akım bir indirgenme veya oksidasyon reaksiyonuna bağlı olarak elde edilir.

Ancak, bir voltmetrik sensör, örneğin doğrusal veya döngüsel voltmetrik diğer modlarda çalışabilir. Bunun sonucunda, her mod için ilgili akım ve gerilim farklı olacaktır.

Genellikle, amperometrik biyosensörler konsantrasyon bağımlı akımı biyolojik olarak aktif materyalle kaplı elektrokimyasal elektrot aracılığıyla ölçerler. Amperometrik dönüştürme, oksidasyon ve elektro aktif türlerin bir elektrot yüzeyinde indirgenmesi üzerine temellenmiştir. Elektriksel akım ve analit konsantrasyonu arasındaki ilişki Cottrell denklemi ile ifade edilebilir:

$$i = n F A C_0 [D/(\pi t)]^{1/2} \quad (5)$$

Burada i = ölçülecek akım

n = transfer olan elektron sayısı

F = Faraday sabiti, eşitlik başına 96 487 C

A = elektrot alanı

C_0 = analit konsantrasyonu

D = difüzyon sabiti

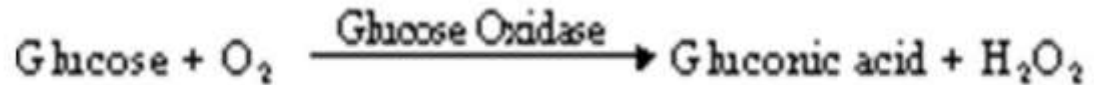
t = potansiyel uygulandıktan sonra geçen süre

- Sabitlenmiş potansiyel bir maddenin oksidasyon veya redüksiyonu sonucunda elektriksel potansiyelde meydana gelen değişime odaklanmaktadır.
- Üç tip elektrod kullanılır:
 - Altın, karbon veya platin elektrodlar gümüş veya gümüş klorid elektrodlarla eşlenir. Oksidasyon sonrasında elektron hareketliliği meydana gelerek potansiyelde değişim tetikler.
- Üç farklı jenerasyon vardır:
 - Reaksiyon ürünü dönüştürücüde elektriksel cevaba neden olur
 - Reaksiyon ürünü ve dönüştürücü arasında bulunan «arabulucu» uyarılır ve daha güçlü bir elektriksel cevaba neden olur
 - Reaksiyon doğrudan cevabı oluşturur dönüştürücüye ihtiyaç duyulmaz.
- Amperometrik dönüşüm enzimler, nükleik asitler, immunmoleküller ile çalışabilir. Buna en tipik örnek şeker biyosensörüdür.

- **Amperometri**
Sabit potansiyelde polarize elektrotlardaki akım değişimlerinin titrant hacmine karşı izlendiği titrasyonlara amperometrik titrasyonlar denir.

Şeker biyosensörü

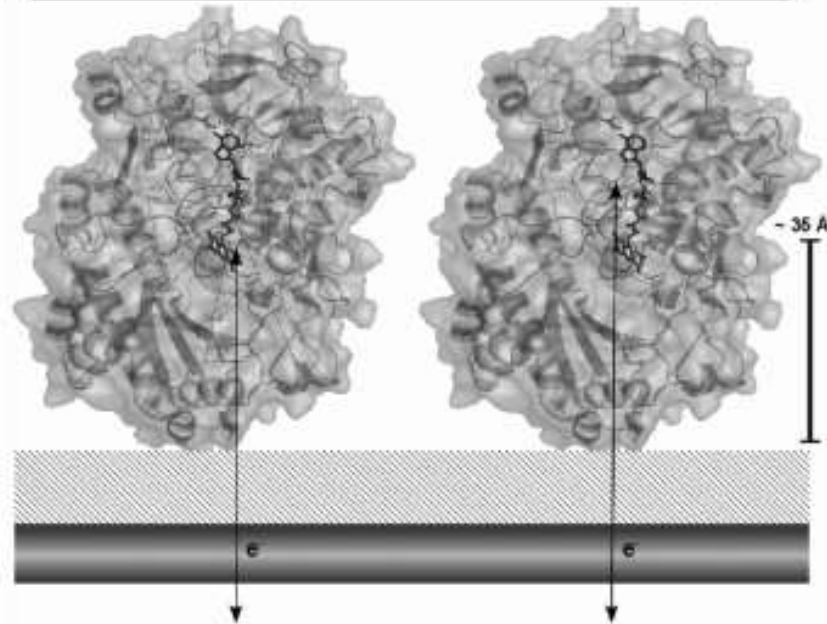
- Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O_2 harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O_2 elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O_2 ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O_2 olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır.



analytical task

direct electron transfer (ET)

example: glucose oxidase (GOx)



key features & challenges for direct ET by GOx

- glucose oxidase (GOx; EC=1.1.3.4) from *Aspergillus niger*;
Source: PDB Database (DOI:10.2210/pdb1cf3/pdb); crystal structure at 1.8 Å, GOx expressed in *Saccharomyces cerevisiae*
- active as homodimer
- in black: cofactor FAD, in dark grey: Valine537 (active site)
- distance from the active site of the active site to the outer protein shell is about 20 to 40 Å
=> rather long distance for direct ET!!!
- effective ET occurs usually ≤ 10 Å
- orientation of the active site with respect to electrode surface and substrate diffusion

Potensiyometrik Biyosensörler: Potensiyometrik ölçümler net akım akışı olmayan faradik olmayan bir elektrot sürecinden oluşur ve elektrot üzerinde önemli miktarda gerilim oluşumu ile sonuçlanan bir elektrot yüzeyinde yük yoğunluğu birikimi prensibi üzerine çalışır. Potensiyometrik biyosensörler, uygun biyoreseptörler ve uyumlu transdüserler kullanarak, bir iyonun iyonofora bağlanmasından kaynaklanan elektriksel gerilimdeki değişiklikleri takip eder. Potensiyometrik tespit, biyolojik algılama elementi içeren bir elektrokimyasal hücre içerisinde genellikle ya bir ürünün aktivitesi ya da elektrokimyasal reaksiyondaki bir tepkenin aktivitesinin gerilimini ölçer. Ölçülen gerilim Nernst denklemi ile verilir:

$$E = E_0 + [RT/(nF)] \ln a \quad (6)$$

Burada $E = V$ birimi ile ölçülen gerilim

$E_0 = a = 1 \text{ mol l}^{-1}$ için standart gerilim

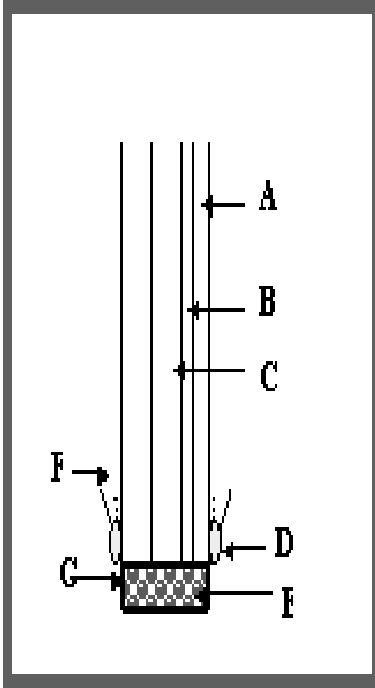
R = gaz sabiti

T = K biriminde sıcaklık

F = Faraday sabiti

n = elektron transfer sayısı

a = ilgili iyonun nispi aktivitesi



Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi

- A: Elektrod dış ceketi,
- B: İç doldurma çözeltisi,
- C: CampH elektrot,
- D: O-ring,
- E: İmmobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka,
- F: Gaz-geçirgen membran,
- G: Koruyucu membran.



Potansiyometri, bir çözelti içerisine daldırılmış iki elektrot arasında oluşan potansiyel farklanmasını ölçer. Elektrotlardan bir tanesi referans olup, kendi çevresinde bağımsız sabit bir potansiyele sahiptir. Prob elektrot olarak adlandırılan bir diğer elektrodun potansiyeli ise indirgenme/yükseltgenme reaksiyonlarının olduğu sıvı faz ile katı yüzey arasındaki bölgede oluşan potansiyeli ifade etmektedir. İletken tel ve bir redoks sistemi arasındaki bölge düşünüldüğünde, indirgenen/yükseltgenen türler ve iletken arasında elektronların değişimi söz konusudur. İndirgenme ve yükseltgenme hızları eşitlendiğinde bir denge durumuna ulaşılacak ve elektrodu çevreleyen çözeltinin kompozisyonu sabitlenecektir. Bu durumda denge potansiyeli, Nernst eşitliği ile ifade edilmektedir (Tran Minh, 1993).

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

[Ox] ve [Red] ifadeleri sistemdeki yükseltgenen ve indirgenen türleri göstermektedir. Nernst eşitliğinin bu gösterimi sadece çok seyreltik çözeltilerde geçerlidir. İyonik konsantrasyon arttıkça, ideal termodinamik şartlardan uzaklaşılır ve bu durumda konsantrasyon(C) ifadesi yerini iyonik aktiviteye bırakır(a);

$$a = \gamma c$$

Burada görülen γ ; aktivite katsayısını ifade etmektedir.

- Potansiyometrik biyosensörlerde iyon seçici elektrod ve iyon hassas dönüştürücü mevcuttur. İki farklı elektrod içerir ve elektrodlar arasında elektriksel iletkenlik ve empedans değişimi prensibi ile analitin okuması yapılır.
- En popüler örneği üre sensörüdür.

Potansiyometrik biyosensörleri temel alan sistemlerin hazırlanması için farklı elektrotlar mevcuttur. Cam pH elektrotları bunlardan biri olup hidrojen iyonları konsantrasyonunun(pH) yada monovalent katyonların izlenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, bu tip elektrot yüzeylerinin hidrofobik membranlar ile kaplanması CO₂ ve NH₃ gibi gazların tayinini mümkün kılmaktadır.

Cam membran yapısının modifikasyonu ile NH₄⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ gibi monovalent katyonlara duyarlı elektrotların oluşturulması mümkündür, ki bu elektrotlar daha sonra enzim sensörlerinde kullanılabilirler. Buna örnek olarak üre-duyarlı enzim sensörü verilebilir ki burada enzimatik reaksiyon sonucu oluşan NH₄⁺ iyonları üreaz kaplı cam membran ile tayin edilebilmektedir.

pH elektrodunun, gaz geçişini mümkün kılan hidrofobik bir membran ile kaplanması durumunda CO₂ ve NH₃ gibi asidik yada bazik gazların membranda geçişi mümkün olup gaz konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan pH değişimi gerçekleşecek ve bu da gaz duyar biyosensörlerin hazırlanmasında temel oluşturacaktır (Yıldız, 1999).

İletkenlik/Kapasitans/İmpedans Biyosensörler: İletkenlik, kapasitans ve impedans biyosensörleri elektriksel alandaki farklı değişimleri ölçerler. Bu değişiklikler çözeltinin veya aracı maddenin genel elektriksel iletkenliği ve elektrot yüzey üzerindeki sabitlenmiş tabakaya bağlı olan ve aynı zamanda impedimetrik reaksiyon gösterebilme ile yansıtılabilen kapasite değişimi olabilir. Erken dönem iletkenlik/impedans biyosensörleri, hedef analitlerce sebep olunan, araçlar üzerindeki iletkenlik değişikliklerini temel almışlardır. Ancak, çözeltinin direnci var olan tüm iyonların göçü ile belirlenir ve iletkenlik ölçümlerinin genellikle nispeten belirsiz oldukları düşünülür.

Bu problem, düzlemsel mikroelettronik iletken hücreler içinde veya üzerinde sabitlenmiş enzimlerin katalitik aksiyonları sonucu oluşan iletkenlikteki değişikliklerin izlenmesi ile çözülebilir [73]. Çoğu enzim reaksiyonları katalize eder ve bu da çözeltinin iletkenliğinde genel değişikliklere sebep olur ve böylece iletkenlik ölçen biyosensörlerde algılama elementleri olarak büyük bir potansiyel sergilerler.

İletkenlik ve kapasitans biyosensörleri, impedans biyosensörlerinin gerçekten basit versiyonlarıdır. İmpedans ve direnç, kapasitans ve indüktans arasındaki ilişki şu şekilde ifade edilebilir:

$$Z = R + jX = R + j(X_L - X_C) \quad (7)$$

Burada Z = impedans, kompleks sayı

R = direnç

X = reaktans

X_C = kapasitif reaktans = $(2\pi f C)^{-1}$, ki burada f = frekans ve C = kapasitans

X_L = indüktif reaktans

j = imajiner birim

Optik Biyosensörler

Optik metotlar, biyolojik ve kimyasal analitlerin algılama teknikleri arasında en eski ve en oturmuş teknikler arasındadır. Biyosensörlerin üretiminde çeşitli optik teknikleri kullanılmıştır. Tipik bir optik biyosensör bir ışık kaynağından, belirli özelliklerde ışık demeti oluşturmak için bir urup optik bileşen ve bu ışığı yönlendirme ve değiştirme etkeni, bir dönüştürülmüş algılama başı (boyalar ve proteinler ve fonksiyonel kimyasal gruplarla dönüştürülmüş, optik fiber veya antikorlarla kaplanmış kristaller) ve bir ışık dedektörü. Daha önceki değerlendirmelerimize benzer şekilde, iki tip optik biyosensör formatı vardır:

Hedef analitin doğrudan ve dolaylı tespiti. Doğrudan formatta, analit, dalga kılavuzunun optik özelliklerini doğrudan etkiler; örneğin gözden çabuk kaybolan dalgalar (ışık içerisinden yansıtıldığı zaman, optik dalga kılavuzu dışında, aracı içinde üretilen elektromanyetik dalgalar) veya yüzey plazmon titreşimi (dalga kılavuzu yüzeyine yerleştirilmiş ince bir filmde çabuk kaybolan bir dalga). Doğrudan formatta, ışıma, metal partiküller veya nanopartiküller gibi optik etiketler, hedef analite oranla optik sinyaller üretmek için kullanılır. Optik biyosensörler, yüzeye tutunma, ışıma, fosforesan ışıma, polarizasyon, rotasyon, müdahale veya harmonik üretim gibi doğrusal olmayan konular da dâhil optik olgular temelinde tasarlanabilir

1.3.1.2 Termometrik tayin

Biyosensörlerin, reaksiyon entalpilerindeki farklanmayı temel alan termometrik tayin amacına yönelik olarak kullanımları mümkün olmaktadır. Sıcaklığın belirlenmesinde kullanılan çeşitli metodlar mevcuttur (optik, mekanik, elektriksel vb.). Bu amaca yönelik sistemlerde en çok kullanılan elektriksel metodlar olmaktadır ki bunların kullanımı ile sıcaklıktaki değişimin direk olarak sinyale dönüşümü gerçekleşmektedir.

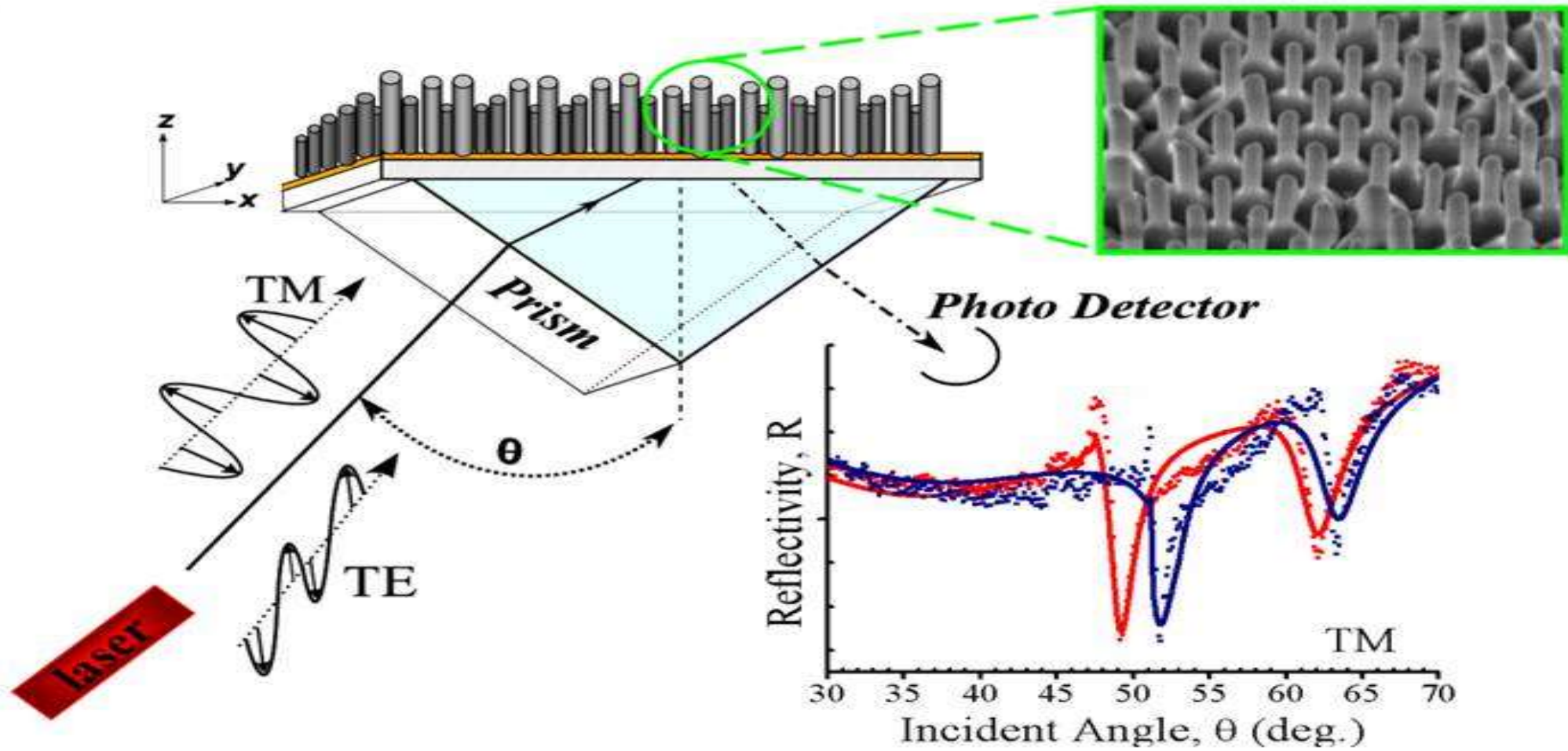
Metal oksitler ve polikristal semikondüktörlerin karışımı olan *termistörler* küçük boyutlu ve indirgenmiş kalorifik kapasitelerinden dolayı hızlı cevap veren sistemleri oluşturmaktadırlar (Tran Minh, 1993).

1.3.1.3 Piezoelektrik tayin

Piezoelektrik ölçümler, bir elektriksel polarizasyonu yada kuartz gibi bazı anisotropik dielektrik materyallerde oluşan polarizasyondaki farklanmayı temel almaktadır. Bu polarizasyon uygun yönelimli bir kuvvetin uygulanması sonucu açığa çıkmaktadır. Elektriksel alanın

uygulanması durumunda ilgili materyalin vibrasyonu yada deformasyonu, piezoelektrik etkiyi tersinir hale getirmektedir. Piezoelektrik cihazlar, kütledeki ufak farklanmaların tayinine yönelik olarak kendi rezonans frekanslarında kullanılmaktadırlar. Bu farklanmalar, enzim-inhibitör assosiyasyonlarının yanı sıra antikor bağlanmalarını da kapsayan biyolojik reaksiyonlardan kaynaklanabilmektedir (Dinçkaya, 1999).

- Optik tranduser şeması



Emilim ve Yansıtma Biyosensörleri: Emilimdeki optik yanıt verme, Lambert Beer Kanunu (Denklem 8) temel almıştır ve bu da düzenli bir aracı birim tarafından yayılan ışının yoğunluğunu optik özellikler kimyasal konsantrasyondan etkilendiklerinde bir ani ışık fonksiyonu olarak sınıflandırır. Emilim A, şu şekilde ifade edilir:

$$A = -\log (I/I_0) = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (8)$$

Burada, I = iletilen ışığın yoğunluğu

I_0 = anlık ışığın yoğunluğu

ϵ = $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ içindeki katsayının ortadan kalması

C = M içindeki analit konsantrasyonu

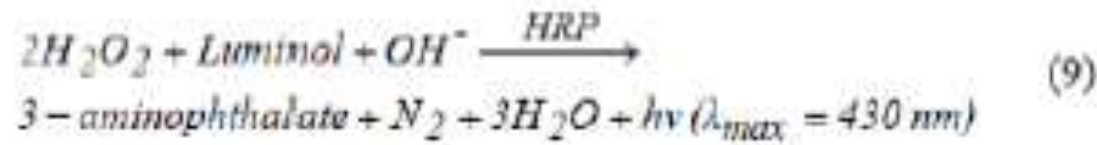
l = cm biriminde aracı içinden geçen ışığın yol boyu

Emilim/yansıma transdüserleri, biyosensörlerde enzimler, antikorlar ve DNA/RNA propları ile birlikte kullanılırlar. Son zamanlarda, enzim bağışıklık deneyi tabanlı bir emilim biyosensörü ette ve süt ürünlerinde penisilin kalıntıları tespiti için geliştirilmiş [84]; bir emilim biyosensörü, immüno-manyetik ayrıştırma ile birleştirilerek gıdalarda Escherichia coli O157:H7 tespitinde [85] kullanılmış; ve tek kullanımlık bir alıcı-tabanlı emilim biyosensörünün su örneklerindeki nitrat tespitinde kullanıldığı rapor edilmiştir [86].

Işınım Biyosensörleri: Işıma, moleküllerin uyarıldıktan sonra temel durumlarına geri dönerlerken ışın yaydıkları zaman doğan durumdur. Kimyasal ışıma ve biyolojik ışıma, biyosensörlerde ve hücre-tabanlı biyosensörlerde enzim, antikor, DNA propu gibi çeşitli şekillerde kullanılmışlardır. Kimyasal ışımanın ışık emisyonu, kimyasal reaksiyon ile belirlenirken, biyolojik ışımanın ki canlı organizmaların (bakteri, balık, haşaratlar ve mantarlar) enzimlerle katalize edilen reaksiyonlarıyla belirlenir. Işınım biyosensöründe, sabitlenmiş biyoalgılama materyallerine sahip bir algılama tabakası, örnekteki belirli hedef analiti tespit edebilmektedir. Işık yayılımı başladıktan sonra, ışık dalga kılavuzu ile ışık dedektörüne gönderilir.

Işıldayan enzimatik bir sensör, genellikle hassas bir şekilde ATP, NAD(P)H veya H_2O_2 ve ışıldayan sistemlerle düzen içinde çalışan yardımcı enzimler de dahil daha karmaşık sistemlerle tespit edilebilir [87]. Örneğin, H_2O_2 'yi tespit etmek için, kimyasal ışımalı bileşikler çoğunlukla luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4

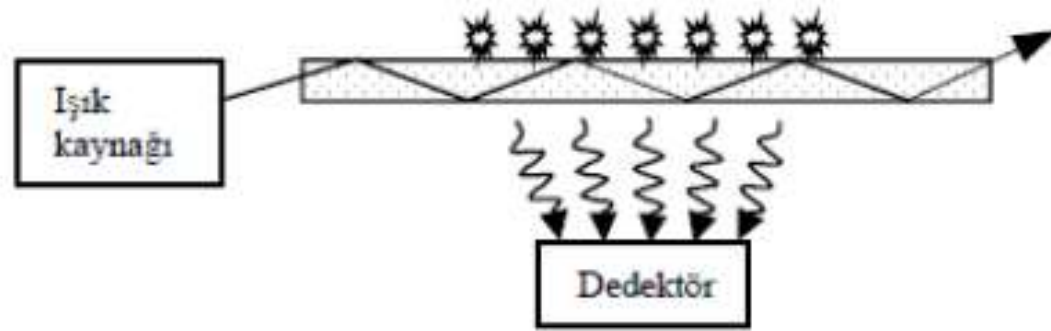
phthalazinedione) ve ilgili hidrazid'leri kullanırlar. Luminol aracılı, karaturp peroksidaz (HRP, EC 1.11.1.7) varlığında kimyasal ışıma, hidrojen peroksiti aşağıdaki gibi tespit edebilir:



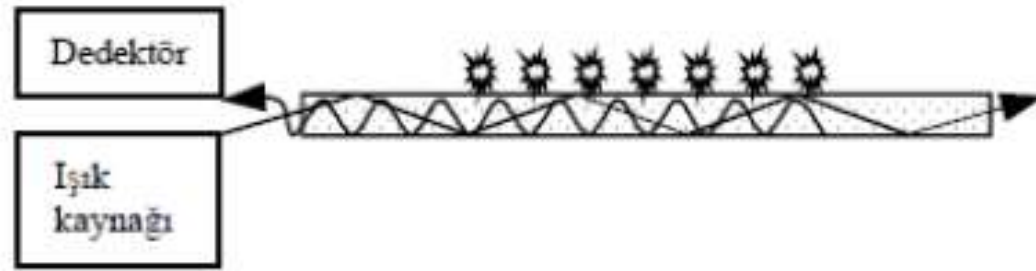
H₂O₂ ölçümü, algılama membranında 10⁻⁸ M limit tespiti ile peroksidaz kullanılarak bir dakikada yapılabilir ve benzer şekilde limit tespiti ATP ve NADH için sırasıyla 10⁻¹¹ ve 10⁻⁹ M olabilir [88]. Kimyasal ışınım sinyalleri çok hızlı bozulduğundan, substratın hızla kimyasal ışınım ayıraçla karıştırılması ve ışık dedektörünün sinyali kaydetmesi için uygun bir band genişliğinin olması gerekmektedir.

Genellikle ışınım biyosensörler; enzimler, antikorlar, canlı mikroplar, kırmızı hücreler veya bunlardan herhangi ikisinin kombinasyonunun biyoalgılama materyalleri olarak kullanılmasıyla tasarlanır. Bunlar, pestisitlerin, patojenlerin ve gıda bileşenlerinin tespitinde kullanılırlar. Örneğin, bir biyolojik ışınım ve hücre-tabanlı sensör, su örneklerinde hidrojen peroksit toksisitlerinin, fenol ve mitomisin C [89] tespitinde kullanılmışlardır; bir immünomanyetik kimyasal ışınım fiber optik biyosensörü, kıyılmış sığır etinde, tavuk karkasında ve marul örneklerinde E. coli O157:H7'in tespitinde kullanılmış [90]; ve bir ATP biyolojik ışınım biyosensör, biyoenerjetik olarak gıdalarda canlı patojenlerin varlığını onaylamıştır [91].

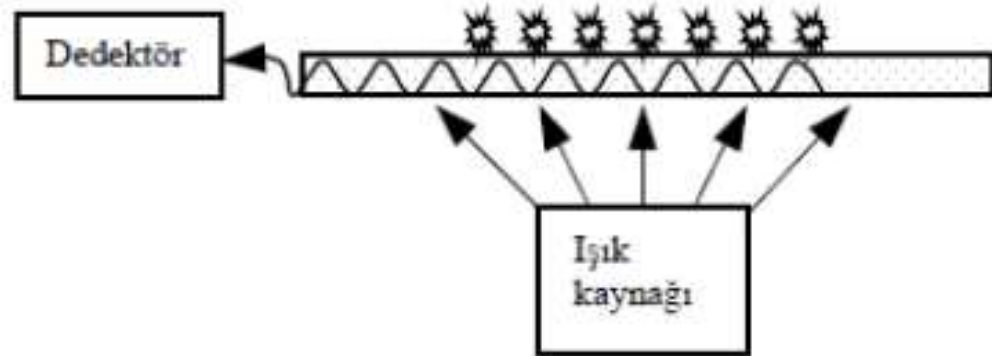
(a)



(b)



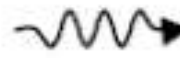
(c)



Fluoroforlar



Uyarı



Yayılma

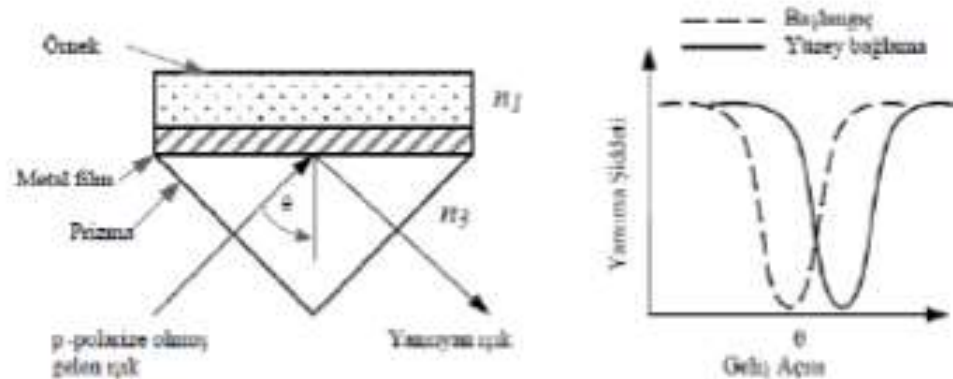
Işıma Biyosensörler: Işıma; ışıma boyalar, fluoroforlar ve fluorokromlar gibi belirli moleküllerde dış ışık kaynağı uygulandığı zaman ortaya çıkar.

Yayılım sinyali, uyarma ışığına göre tipik olarak daha zayıftır ve daha uzun dalga boyuna sahiptir. Işıma reaksiyonu veya yayılma, ışık kaynağıyla veya yarılmaya aniden ortaya çıkar. Çoğu ışımaya biyosensörlerde, biyolojik materyallerinin hızlı kaybolan dalga ile yüzeyde birleşerek özellik verir. Liley [83] tarafından tanımlandığı üzere, yüzey-bağlantı ışıma etiketlerin tespitinde hızlı kaybolan dalga kullanımının temel olarak üç farklı formatı vardır: hızlı kaybolan dalga kullanarak fluoroforu uyarır (Şekil 5a), fluoroforu uyarma ve dalga kılavuzundan yayılan ışınları toplama (Şekil 5b), ve optik dalga kılavuzundan yayılan ışını toplama (Şekil 5c).

Işıma biyosensörler aynı zamanda yüzeye özel bağlanma olaylarını ölçebilmektedirler. Dalga kılavuzları, arzu edilen optik özelliklere sahip materyallerden yapılabilirler ve kolayca biyolojik materyallerinin sabitlenirken kolayca değiştirilebilirler. Sensör tasarımı, çok çeşitli görünebilir ve IR yakınındaki ışık kaynakları ve dedektörlere bağlı olarak adapte edilebilir.

SPR Biyosensörler: Yüzey plazmon rezonansı (SPR, Surface Plasmon Resonance) dönüştürmesi, sensör arayüzü üzerindeki ince biyolojik filmlerinin optik yansıma indeksindeki (RI, Refractive Index) küçük değişiklikleri ölçmede analitik bir araç olarak yaygın şekilde kullanılır. SPR, yüksek derecede iletken bir metal ve bir dielektrik materyal arasındaki arayüz boyunca uzanan bir yüzey plazmonunun optik uyarılması sonucu oluşur. Uyarılma koşulları, metal ve örnek materyallerin geçirgenliğince ve aynı zamanda dalga boyu ve anlık ışının açısı tarafından belirlenir (Şekil 6). Rezonans açısı, kırılma indeksindeki (RI) ve gerçek metal yüzeyden 800 nm'ye kadar olan bir mesafede arayüzeydeki dielektrik sabitindeki değişikliklere karşı hassastır. Yüzeyden mesafe arttıkça, hassasiyet katlanarak düşer, bu da SPR tabanlı biyosensörün küçük partiküller üzerinde daha iyi çalışmasını sağlar [98]. RI'daki değişiklik, sensör yüzeyinde devam eden biyokimyasal reaksiyon ile ilgilidir. Bundan dolayı, bir antijen-antikor sistemi ve bir DNA tamamlayıcı parça sistemi, SPR-tabanlı biyosensör üretiminde kullanılmaktadır.

Sensör yüzeyindeki elektrik yüklerinin miktarı, diğer parametreler sabit tutulurken, ani ışımların dalgaboylarındaki, açısının, yansıma yoğunluğunun ve örneklerin yansıma indeksi değiştikçe, yansıma fazı değişikliklerin ölçülmesi gibi çeşitli şekillerde belirlenebilir.



Optik Fiber Biyosensörler: Bir optik fiber, sistem tespiti için örneği uzaktan kontrol ederken ışığa rehberlik etmek ve ışığı örnekten çevirmek için düz transdüser olarak kullanılır. Aracının kendisinin doğal optik özelliklerindeki değişim bir dış spektro-foto-metre tarafından algılanır. Optik fiberin yanındaki polimerik desteğin üzerine veya içine yerleştirilen bir indikatör veya kimyasal ayıraç, tespit edilebilir optik sinyal üretmek için aracı olarak kullanılır. Optik fiberleri dönüştürme metodu olarak kullanmanın avantajları, sahada kullanım kolaylığı ve gerçek-zamanlı tespit, rahatlık ve esneklik, potansiyel uzun etkileşim ve düşük maliyettir.

Fiber optik biyosensörlerinden biri de düzlemsel dalga kılavuzu optik biyosensörüdür. Bu biyosensör kaybolma etkisinin tespitini temel almıştır. Kaybolan dalgalar (EW, Evanescent Waves), dolaşan ışığın dalga kılavuzundan geçerken, çözeltiyle doğrudan temas ettiği sırada ortaya çıkar ve dalga kılavuzu yüzeyinde toplam dahili yansımaya uğrar. EW, çözelti içinde yayılır ve solüsyon yüzeyinden uzaklaştıkça katlanarak bozunur.

Kaybolma alanı içindeki bağlayıcı, etiketli antikorlar, örnek antijenin konsantrasyonu ile ilgili olabilirler. Ölçülen değişiklik, emilim, ışıma veya ışık saçılması olabilir.

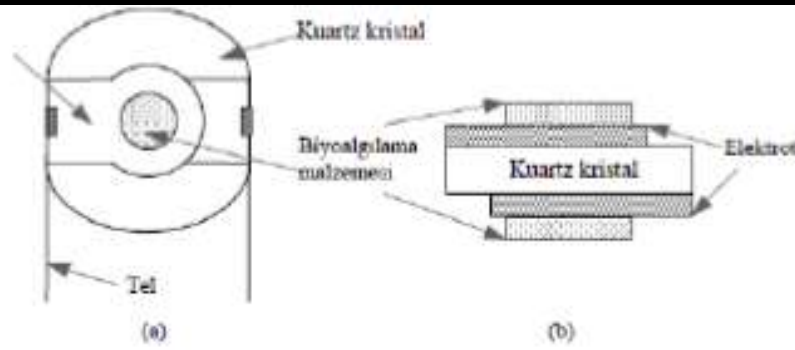
Fiber optik biyosensörler, gıda işleme ve çevre izleme uygulamalarında çok başarılı sonuçlar sergilemişler ve hem pestisit kalıntıları hem de bakteri hücreleri tespitinde çok iyi performans göstermişlerdir. Işınır ışığın dar nüfuz derinliği, sonuç olarak hedef bakterinin etkin şekilde yakalanmasını gerekli kılmaktadır. Ancak, optik fiber'in temas eden alanı (genellikle çok küçük bir alan) ve gıda örneğinin karmaşıklığı, etkin bir yakalama kabiliyetini garanti edememektedir. Aşılması gereken diğer bir engel, pratik uygulamalarda fiber ucun yeniden meydana gelmesidir.

Diğer Optik Biyosensörler: Robinson ve meslektaşları tarafından geliştirilen [102] ışınır kılcal -dolum cihazı (FCFD, Fluorescent Capillary Fill Device) EW tabanlı biyosensörler için tipik bir oluşum formatıdır. Bu cihaz, bir birinden 100 μm 'lik yakın mesafeyle ayrılmış iki cam düzlem içerir. Alttaki düzlem, optik dalga kılavuzu gibi davranır ve kendi yüzeyinde sabitlenmiş bir antikor tabakası taşır. Bu biyosensör kılcal doldurma sisteminden yararlanır, sistem kullanımı kolay yüksek hacimde yeniden üretilebilir örnek verir. Tüm ayraç maddeler FCFD cihazında bulunduğundan, kullanıcının ayraçla kuluçkaya yatırmak için biyosensörü örneğe sadece daldırması yeterli olacaktır. FCFD, hem küçük hem de büyük analitleri geniş çaplı örnek matrisleriyle, her hangi bir ön işlem gerçekleştirmek zorunda olmadan analiz etmek için kullanılır.

Pizoelektrik Biyosensörler

Pizoelektrik biyosensörler, elektrik, kütle ve viskoelastisitede geliştirilen teorileri temel almış ve ticari olarak bulunabilen kuartz kristal mikrobalans gibi enstrümanları kullanmaktadır. Pizoelektrik sensörler, diğer tip sensörlere göre hassasiyet, çok yönlü uygulama, düşük maliyet ve basitlik açısından üstünlük göstermekte ve etiketsizdirler.

Tipik bir piezoelektrik algılama başı, kuartz kristal levhayı ve kristalin iki zıt yanına yerleştirilmiş iki uyarma elektrotundan (Şekil 7) oluşur. Levha doğal veya sentetik kuartz kristalinden kesilir. Elektromekanik birleşme ve uygulanan elektrik alanından kaynaklanan gerilim kristal simetrisi, kesme açısı ve elektrot konfigürasyonuna bağlıdır. Farklı elektro-mekanik birleşme, kalınlık kesme modu (TSM, Thickness Shear Mode), yüzey akustik dalga (SAW, Surface Acoustic Wave), yatay kesme (SH, Shear Horizontal) SAW, SH akustik düz mod (APM, Acoustic Plate Mode) ve bükülgen düz dalga (FPW, Flexural Plate Wave) da dâhil, farklı tiplerde akustik dalgalara yol açar.



Şekil 7. QCM biyosensörde kullanılan pizoelektrik kristal algılama başının yapısı, (a) üstten görünüm ve (b) en-kesit görünümü.

Piezoelektrik biyosensörler, temel olarak kristal yüzeyi üzerindeki kütle değişimi sonucu piezoelektrik kristalinin rezonant frekansındaki değişikliklerin ölçülmesi üzerine temellenmiştir (genellikle antikor-antijen reaksiyon veya bir DNA parçası ve bunun tamamlayıcı sırası gibi biyokimyasal etkileşim tarafından sebep olunur). İki ana tip piezoelektrik cihaz bulunmaktadır: kuartz kristal mikrobals (QCM, Quartz Crystal Microbalance) ve yüzey akustik dalga (SAW) cihazı. Piezoelektrik biyosensörler üzerine yapılan yoğun araştırmalar, bu sistemlerin biyokimyasal reaksiyonları tek adımda, düşük maliyetli olarak tespit etme potansiyelini göstermektedir.

15 MHz altındaki frekanslarda çalışan QCM, piezoelektrik kristalin yüzeylerindeki değişimlerin incelenmesinde ve ilgi duyulan antikorun takip eden tespitinde kullanılmıştır. Frekans atlama ve yüzey kütle değişimi arasındaki ilişki Sauerbrey denklemi ile verilmiştir:

$$\Delta f = -2.3 \times 10^6 f_0^2 \Delta M/A \quad (10)$$

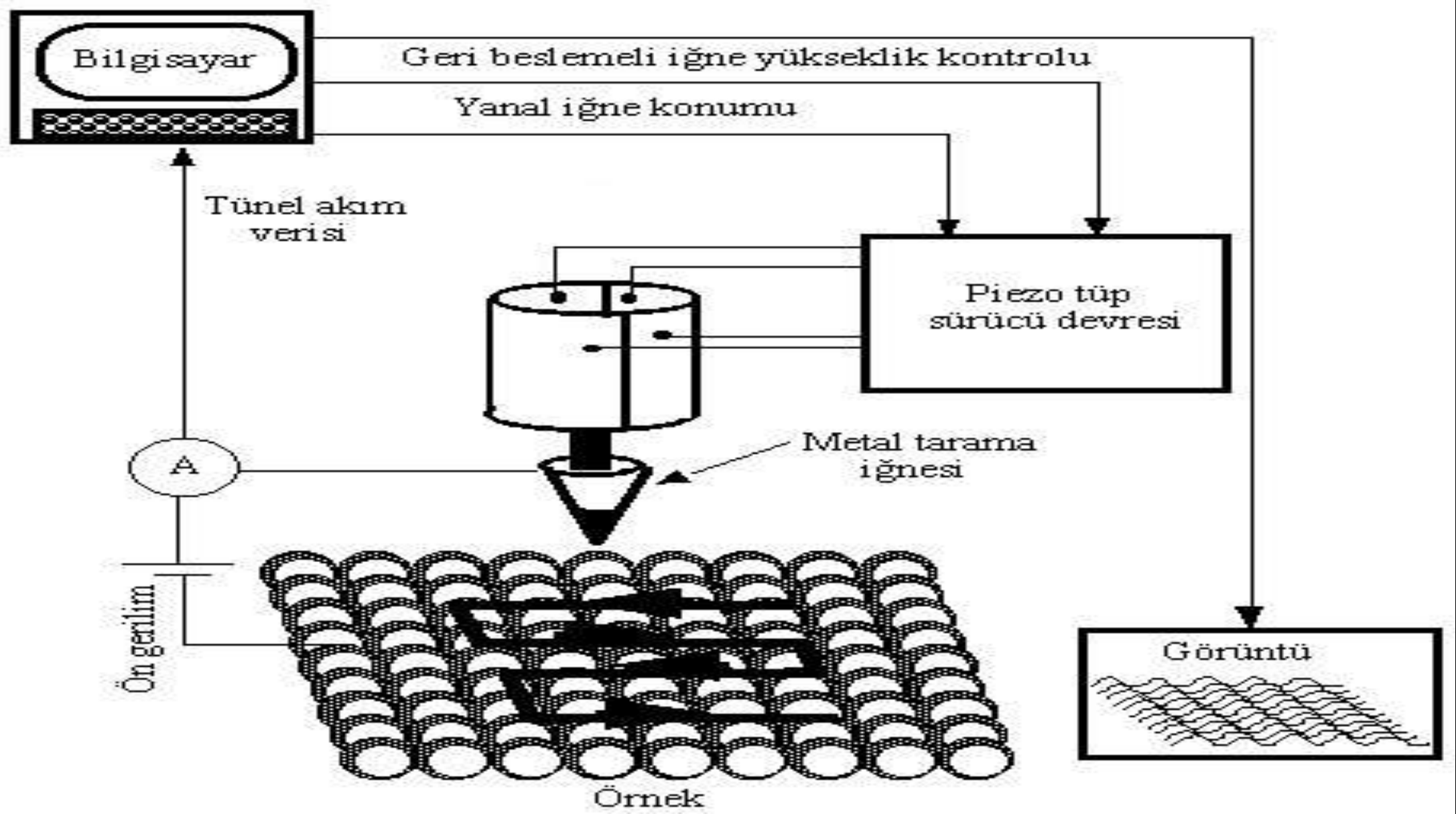
Burada Δf = Hz biriminde, kaplamalı kristalin frekansındaki değişiklik

f_0 = MHz biriminde kristalin rezonant frekansı

A = cm^2 biriminde kaplanmış alan

ΔM = g biriminde depolanmış kütle

- Kütle hassas tranduser şeması



Termal Biyosensörler

Termal biyosensörler aynı zamanda *kalorimetrik biyosensörler* olarak adlandırılır. Bunlar bir biyoalgılama materyalinin (enzim, organel, mikroorganizma, bitki veya hayvan hücresi veya doku) termometre, termopil veya termistör gibi bir fiziksel transdüser ile bütünleştirilmesi ile geliştirilmişlerdir. Tablo 1’de gösterildiği üzere, analitik çözelti kalorimetrisinde, enstrümanlar ısı iletimi, isoperibol kalorimetri ve izotermal kalorimetri [116] şeklinde sınıflandırılır. Biyokimyasal reaksiyonlar için entalpi değişimi 25 ve 100 kJ mol⁻¹ [117] aralığındadır. Örneğin, glikoz oksidaz ile katalize edilen glikozla tedavi; veya ürazla katalize edilen üre, sırasıyla 80 ve 49 kJ/mol ortaya çıkarır. Genel olarak, izotermal koşulların, biyosensör sinyallerinin açıklanmasında yer aldığı düşünülür. Ya biyosensörün termal kütlesi, ısının hızla dağılacığı şekilde çok büyüktür; ya da tüm cihazın ısısı bir su sirkülasyonu vasıtasıyla düzenlenmektedir [19]. Termal biyosensörler üç grupta da geliştirilmiştir. Ama, en fazla termal biyosensör termistör-tabanlı biyosensörlerdir ve bunlar belirli enzimlerin dâhil olduğu biyokimyasal reaksiyonlar sırasında açığa çıkan ısı ölçümü tabanlıdır. İki temel sebep, termistör biyosensörleri daha başarılı kılmaktadır: son derece hassas ve küçültülmüş termistör ve çok kolay akış-enjeksiyon analizi (FIA, Flow Injection Analysis). Termistör biyosensörler, 0.001°C’de ısı değişikliklerini tespit edebilecek çok hassas termistöre ihtiyaç duyarlar.

Manyetik Biyosensörler

Son zamanlarda, manyetik biyosensörler daha fazla dikkat çekmektedir ve bu konu Megens ve Prins [122] tarafından değerlendirilmiştir. Mikroakışkan kanallar içindeki manyetik mikro ve nano partiküllerin magnetodirenç etkisi kullanılarak hassas şekilde tespit edilmesi temelinde boyutları küçültülmüş biyosensörler, hassasiyet ve boyut bağlamında gelecek vaat etmektedir. Ancak, gelecekteki zorluk, örneğe nüfuzu ve tespiti tek bir kartuşta bir araya getirerek işi otomatik olarak yapabilmektir. Manyetik partiküller ayrıca mikro kanallardaki biyoreaksiyonlara belirgin bir destek olarak kullanılmakta [123] ve tek bakteril hücreler manyetik-hidro-dinamik akış tarafından yüklenebilir ve taşınabilir [124].

2.3.5 Biy algılama Materyallerinin Sabitle nmesi

Biyosensörün cevap sinyallerini alabilmek için, biy algılama materyalleri transdüser ile bağlanmalıdır. Biy algılama materyalleri transdüserler üzerine sabitleyici fiziksel ve kimyasal metotlar tipik olarak emilim, mikro hapsetme, tuzağa düşürme, çapraz bağlama ve kovalent bağlamadır [20,24]. Sabitlemenin belirli prosedürleri transdüser yüzeyinin doğasına, biy algılama materyallerinin özelliklerine ve biyosensörün yapısına bağlıdır.

Enzimler ve antikorları değerlendirdiğimizde, bu moleküller metal, metal oksit, karbon ve cam yüzey üzerinde tutunurlar ve transdüserler için hidrofobik, iyonik ve Van der Waals etkileşimlerle yaygın şekilde kullanılırlar [23]. Yüzeye tutunma, biy algılama materyalleri üzerinde daha az bozunmaya yol açan en basit sabitleme metodudur. Ancak, bağlanma zayıf ve kullanım ömrü kısadır (birkaç gün). Yüzeye tutundurulan biy algılama materyali, ısıdaki, pH'daki, iyonik güçteki, akış oranı ve substratlardaki değişimlere karşı hassastır. Ayrıca, tutundurma, biy algılama materyallerinin kimyasal dönüştürmede optimal etkinlik için moleküler odaklanmasını desteklemez.

Tuzağa düşürme metodunda, biy algılama materyali, transdüser yüzeyi yakınında bir jel, macun veya bir polimer matrisi içinde tuzağa düşürülür. Jellere polyacrylamide, nişasta jeli, naylon ve silastic jeller dâhildir. Polimetrik materyaller, iyi yapılanmış bir iskelet, seçici iyon geçirgenliği, gelişmiş iletkenlik gibi birçok

fonksiyon kazandırabilir ve elektron transfer sürecine aracılık eder. Tuzağa düşürme metodu, transdüser yüzeyinde makro-moleküllerin sürekli konumlanmasını sağlayamaz ve ömrü nispeten kısadır, genel olarak birkaç hafta kadardır.

Çapraz bağlama metodunda, genelde glutaraldehide, hexamethylene diisocyanate ve 1,5-dinitro-2,4-difluorobenzene gibi çift işlevli etken maddeler, biyomoleküller arasında katmanları kararlı hale getirecek moleküller arası bağları oluşturmak ve transdüser üzerindeki biyoalgılama materyallerinin sabitlenmesinde reaksiyon tabakalarından sızmasını önlemede kullanılır [125]. Bu metot yüksek mekanik dayanıklılık sağlamaz ve substrat difüzyonunu sınırlayabilir.

Kovalent bağlanma kullanıldığında, kovalent kimyasal bağları biyoalgılama materyali ve transdüser yüzeyi arasında oluşur. Enzimler, antikorlar, karbohidratlar ve oligonükleotitler belirli moleküler özelliklere sahiptirler. Proteinler, makro-moleküllerde, normal olarak amino, karboksil, sulfhydryl veya amino asitlerin aromatik yan zincirlerine bağlanırlar. Yüzeyde tutundurma, tuzağa düşürme ve çapraz bağlama metotlarıyla kıyaslandığında, kovalent bağlanma daha iyi ve aylarca kalıcılığı süren yüzey yapısı sağlamaktadır.

BIYOSENSÖR TASARIMI

