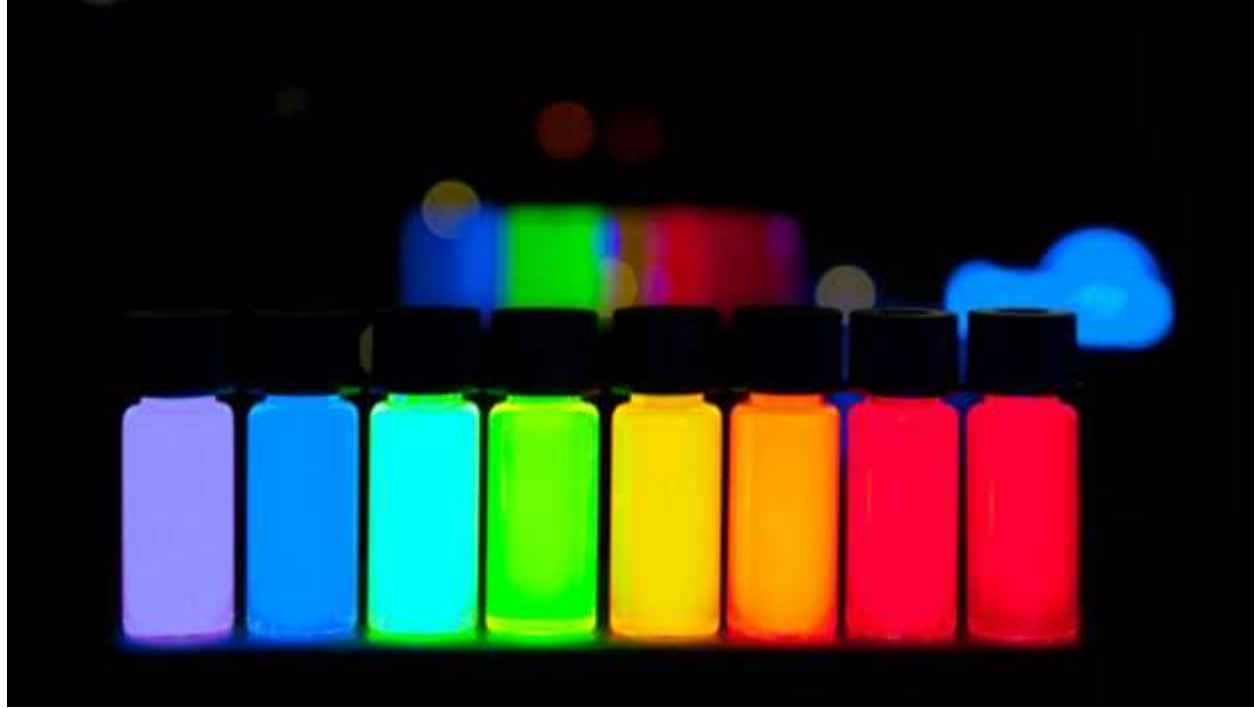


Optik Tabanlı Biyosensörler

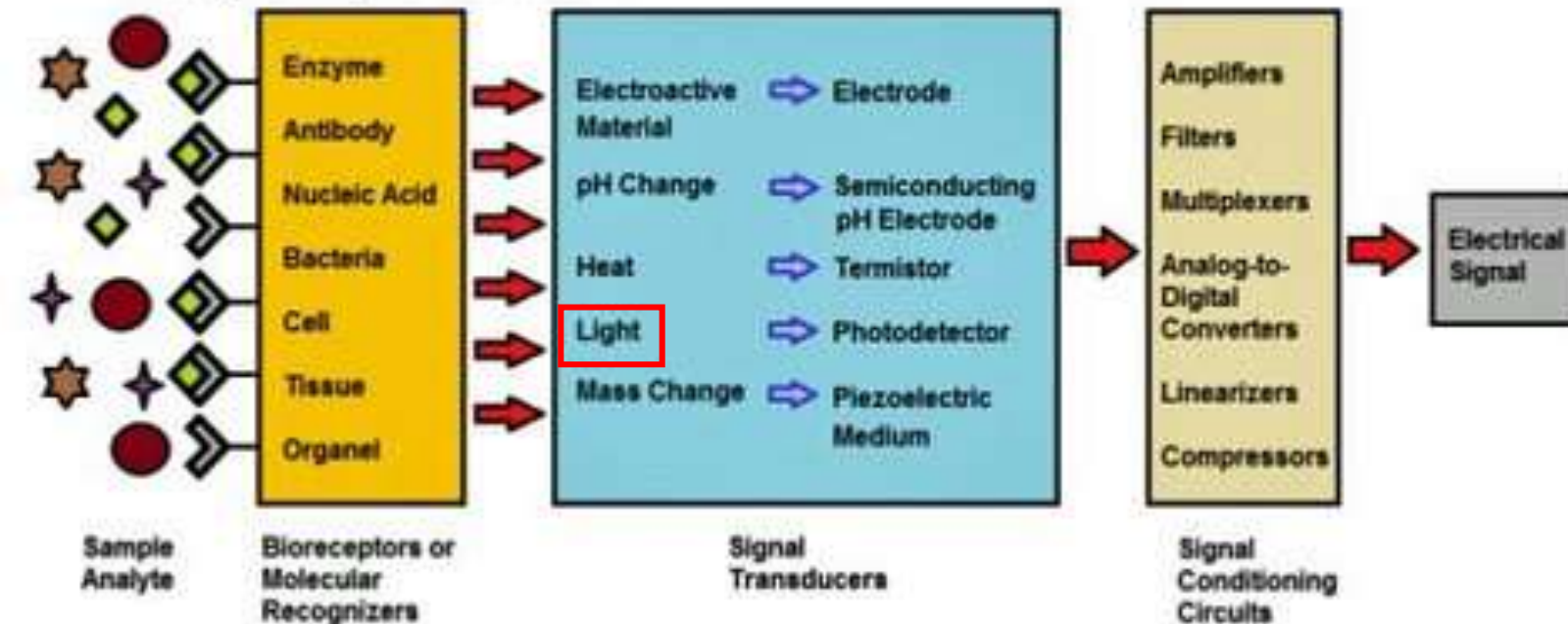


Dr. Öğr. Üyesi Ş. Gökhan Elçi

Biyosensör nedir?

Parts of biosensor

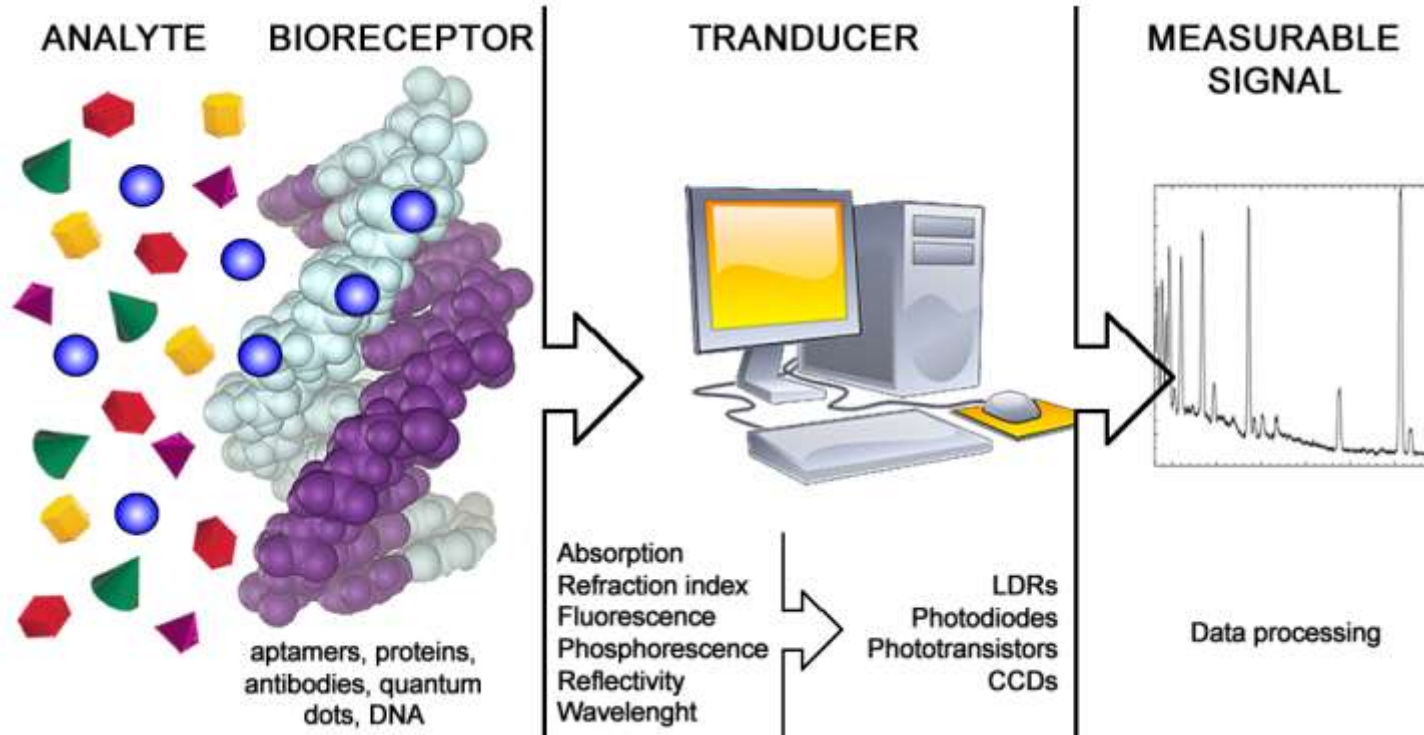
- Bioreceptors
- Transducer
- Signal processor



- Klasik kullanılan biyosensör elementleri bioreceptor kısmında kullanılan moleküllerdir.
- Bunlara ilaveten nanomalzemelerin kullanılması ile beraber yeni biyosensörlerin önü açılmıştır.
- Bu yeni sensör sistemlerinden en yaygını floresan biyosensörlerdir.

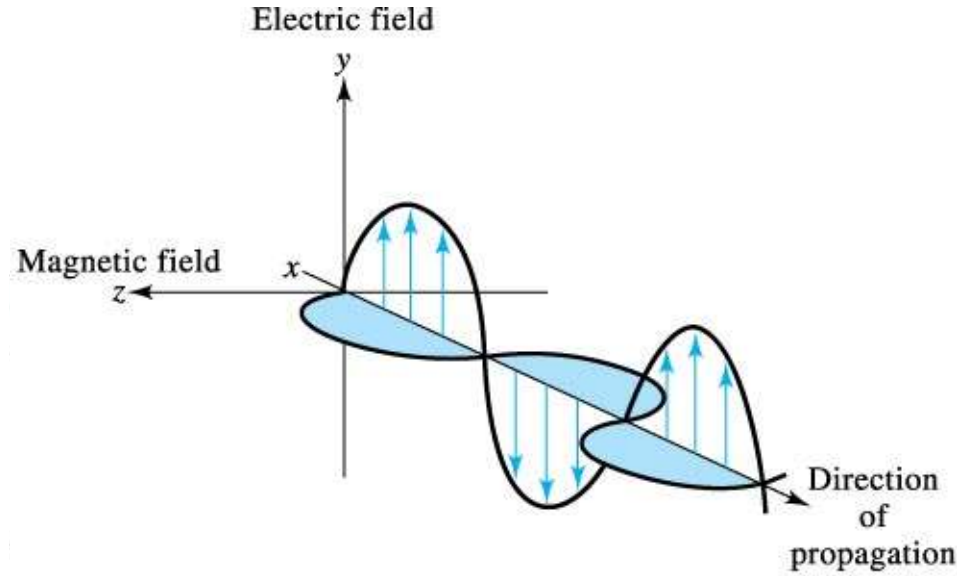
Optik Biyosensörler

- Bioreseptörler ile etkileşime giren analitin oluşturduğu sinyallerin türünün ışık olduğu sensör çeşitlerine optik biyosensörler denir.



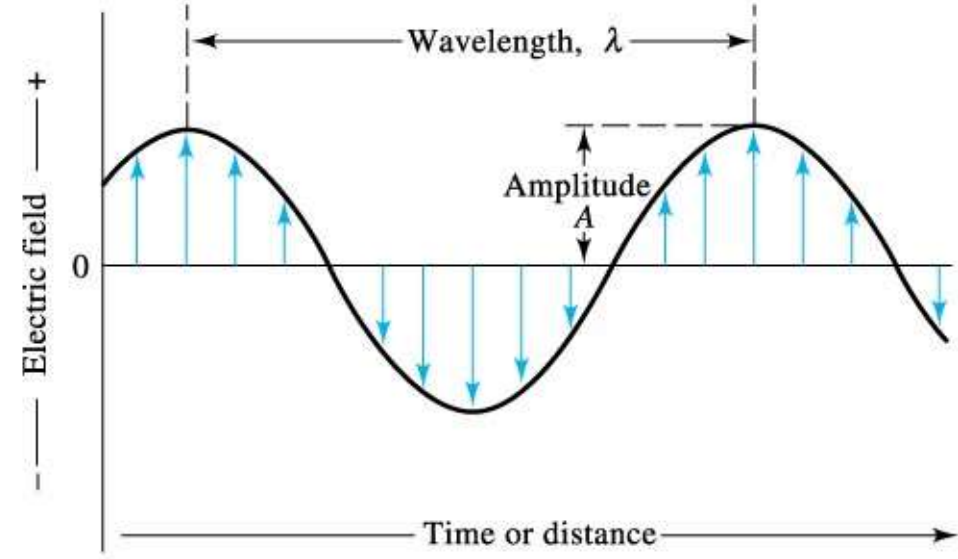
Elektromanyetik ışımanın özellikleri

- Elektromanyetik ışıma boşlukta yüksek bir hızla geçen bir enerji formudur. Elektromanyetik ışıma; dalgaboyu, frekans, hız ve genlik özelliklerine sahip bir dalga olarak tanımlanabilir. Ses dalgalarının aksine, ışık ortamdan geçmek için herhangi bir desteğe ihtiyaç duymaz, bu yüzden vakum içerisinden bile geçebilirler.
- Dalga modeli absorpsiyon ve emisyon gibi ışıyan enerji olaylarının açıklanmasında yetersiz kalır.
- Bu yüzden, elektromanyetik ışımlar foton ve quanta olarak adlandırılan parçacıklar veya kesin enerji paketleri şeklinde kullanılırlar. Bu ikili ışıma ile ilgili görüş bir arada bulunmazlar fakat birbirlerini tamamlarlar.



(a)

© 2004 Thomson - Brooks/Cole



(b)

- Tek bir frekanstaki ışımının dalga özelliği. (a) şıkında x eksenine eksen-polarize olmuş bir dalga görülmektedir. Elektrik alanı, manyetik alana dik bir şekilde hareket etmektedir. (b) şıkında, sadece elektrik alanındaki salınımı görmekteyiz. Dalganın genliği salınım sırasındaki dalgaboyunun maksimum yüksekliği ile ölçülür.

TABLE 24-1

Wavelength Units for Various Spectral Regions		
Region	Unit	Definition
X-ray	Angstrom unit, Å	10^{-10} m
Ultraviolet/visible	Nanometer, nm	10^{-9} m
Infrared	Micrometer, μm	10^{-6} m

Type of
quantum change:

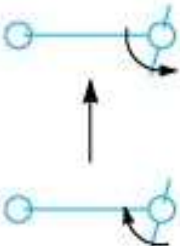
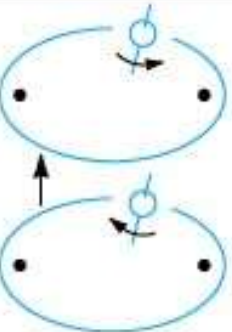
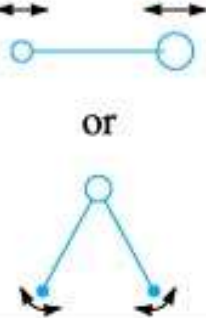
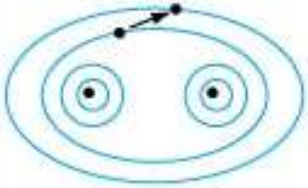
Change of spin

Change of
orientation

Change of
configuration

Change of electron distribution

Change of
nuclear
configuration

						
10^{-2}	1	100	10^4	10^6	10^8	Wavenumber, cm^{-1}
10 m	100 cm	1 cm	100 μm	1000 nm	10 nm	100 pm
						Wavelength
3×10^6	3×10^8	3×10^{10}	3×10^{12}	3×10^{14}	3×10^{16}	3×10^{18}
						Frequency, Hz
10^{-3}	10^{-1}	10	10^3	10^5	10^7	10^9
						Energy, J/mol

NMR

ESR

Microwave

Infrared

Visible and
ultraviolet

X-ray

g-ray

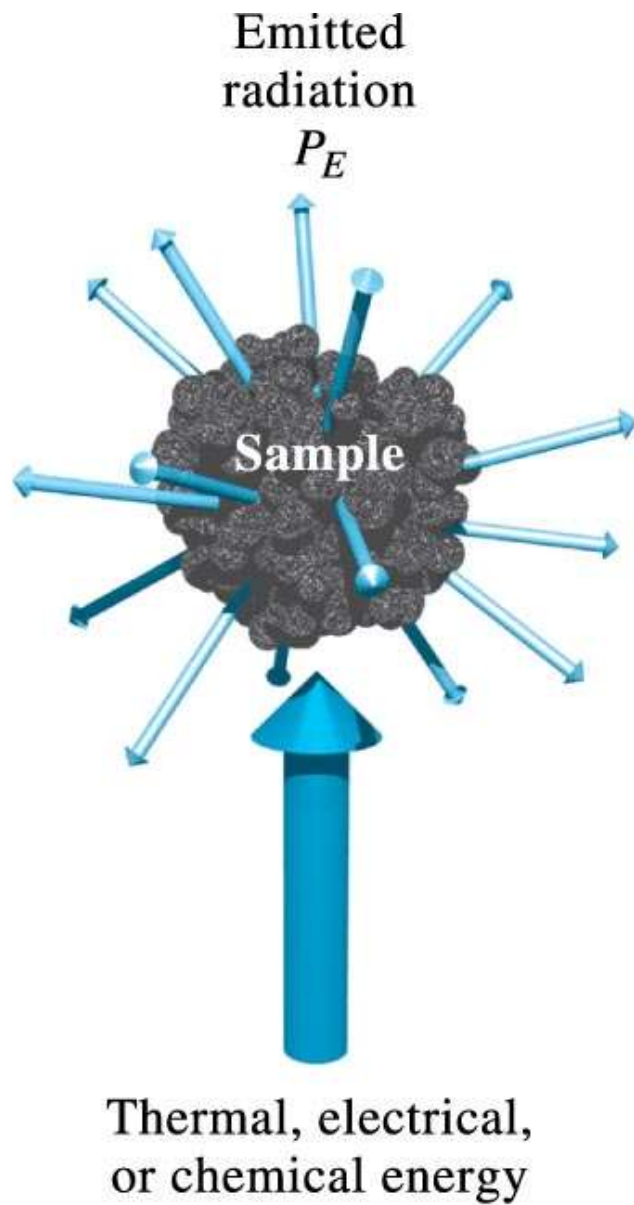
Type of
spectroscopy:

Spektroskopik ölçümler

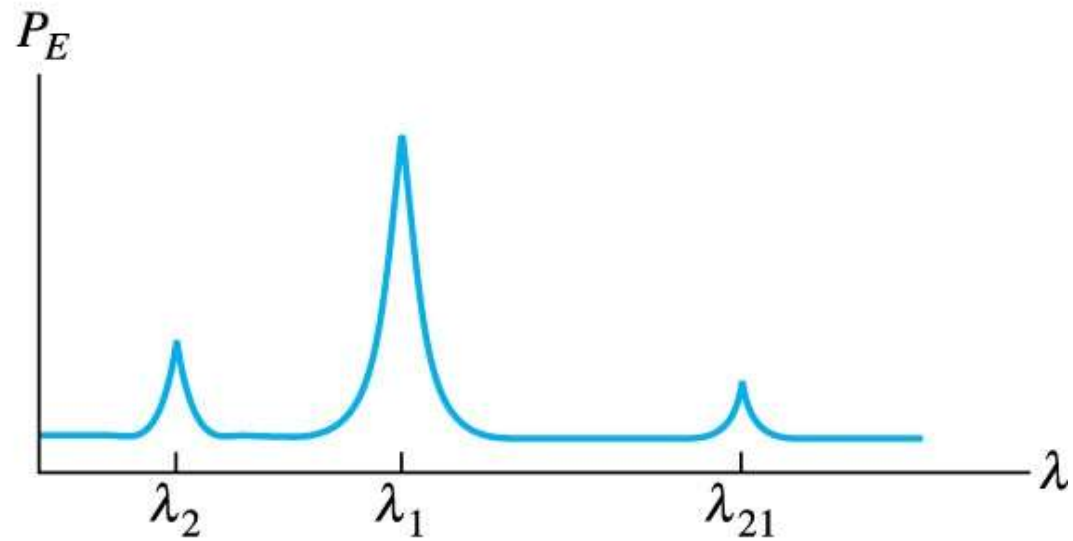
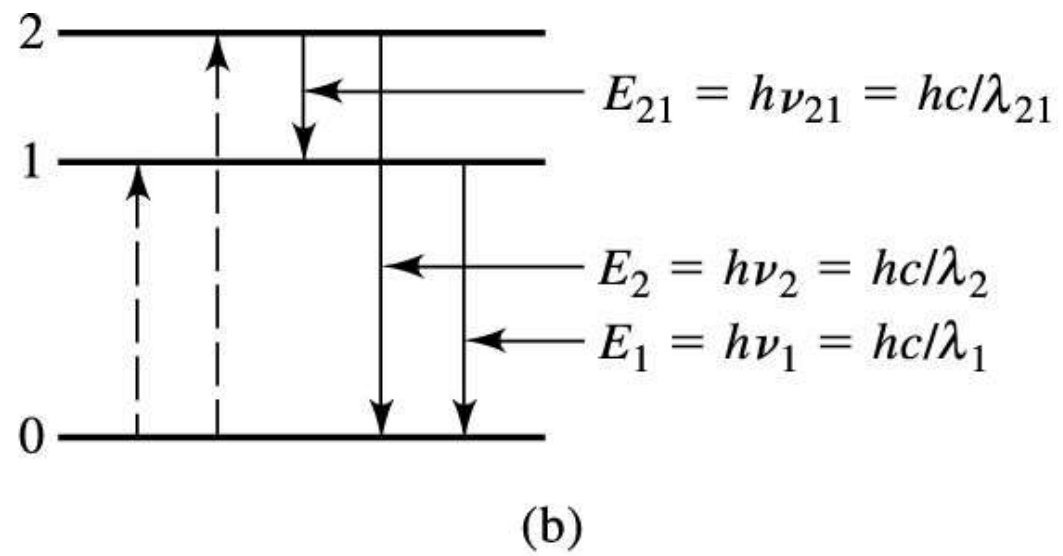
- Spektroskopik yöntemlerde ışıma ile maddenin etkileşimi kullanılarak örnek hakkında bilgi sahibi olmaya çalışılır. İncelenen örnek; ısı, elektrik enerjisi, ışık, parçacık veya kimyasal reaksiyonlar gibi bir uyarım formu ile uyarılır. Analit bu esnada en düşük enerjiye sahip formundadır yani **ground state**'indedir. Uyarılmanın etkisi ile bir miktar analit daha yüksek enerjiye sahip duruma geçiş yapar. Bu formada **excited state** denir. Analit hakkında bilgi sahibi olabilmek için biz uyarılma sonucunda absorplanan ışıma miktarını ölçerek yada excited state'ten ground state'e geri dönerken ortaya çıkan ışımayı ölçerek gerçekleştirebiliriz.

Spektroskopik ölçümler (devam)

- Emisyonda, analit ısı, elektrik enerjisi veya kimyasal reaksiyon formlarından biri ile uyarılması sonucu oluşur. **Emission spektroskopisi** uyarının ısı veya elektrik enerjisi olduğu metotlara söylenirken, **kemilüminesans spektroskopisi** analitik kimyasal reaksiyon sonucu uyarılması olarak adlandırılır.
- Analit ground state konumuna geri dönerken yaydığı ışımının ölçülmesi ile analitin türü ve konsantrasyonu hakkında bilgi elde edilebilir. Böyle bir sonucun ölçümü sonucu bir grafik ile ifade edilir ve bu grafikler spektrum olarak adlandırılırlar. Spektrumlar, ışıyan radyasyon miktarına karşılık, frekans veya dalgaboyu şeklinde çizilir.



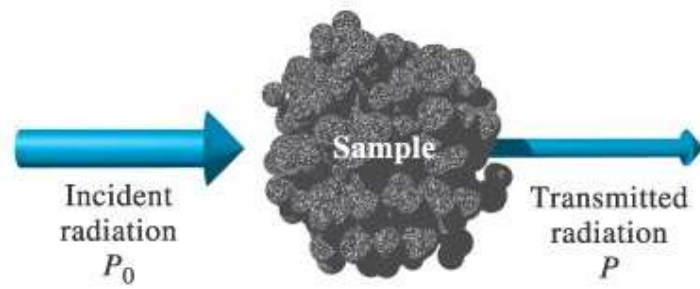
(a)



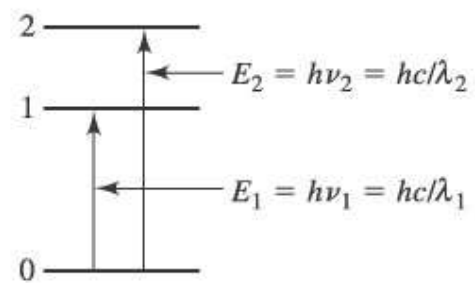
(c)

Spektroskopik ölçümler (devam)

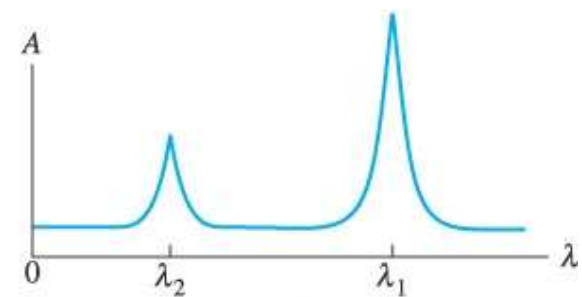
- Bir örneğin dışarıdan bir elektromanyetik kaynak ile uyarılması sonucu çeşitli sonuçlar ortaya çıkabilir. Işımanın yaydığı bir kısım ışınlar absorplanabilir ve analitin bir kısmının excited state konumuna geçmesine sebep olabilir. **Absorpsiyon spektroskopisinde**, absorbe olmuş olan ışık miktarı dalgaboyunun bir fonksiyonu olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilir. Bu sayede kalitatif ve kantitatif sonuçlara ulaşılabilir. **Fotoluminesans spektroskopisinde** absorpsiyon sonrasında açığa çıkan ışımlar ölçülür. En yaygın fotoluminesans spektroskopi formları **floresans** ve **fosforesans** spektroskopisidir.



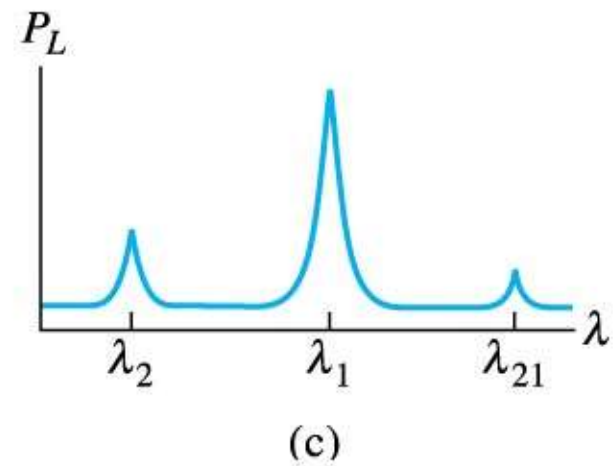
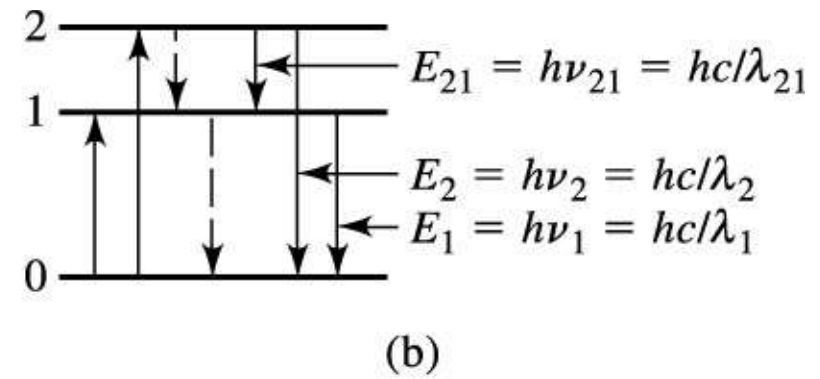
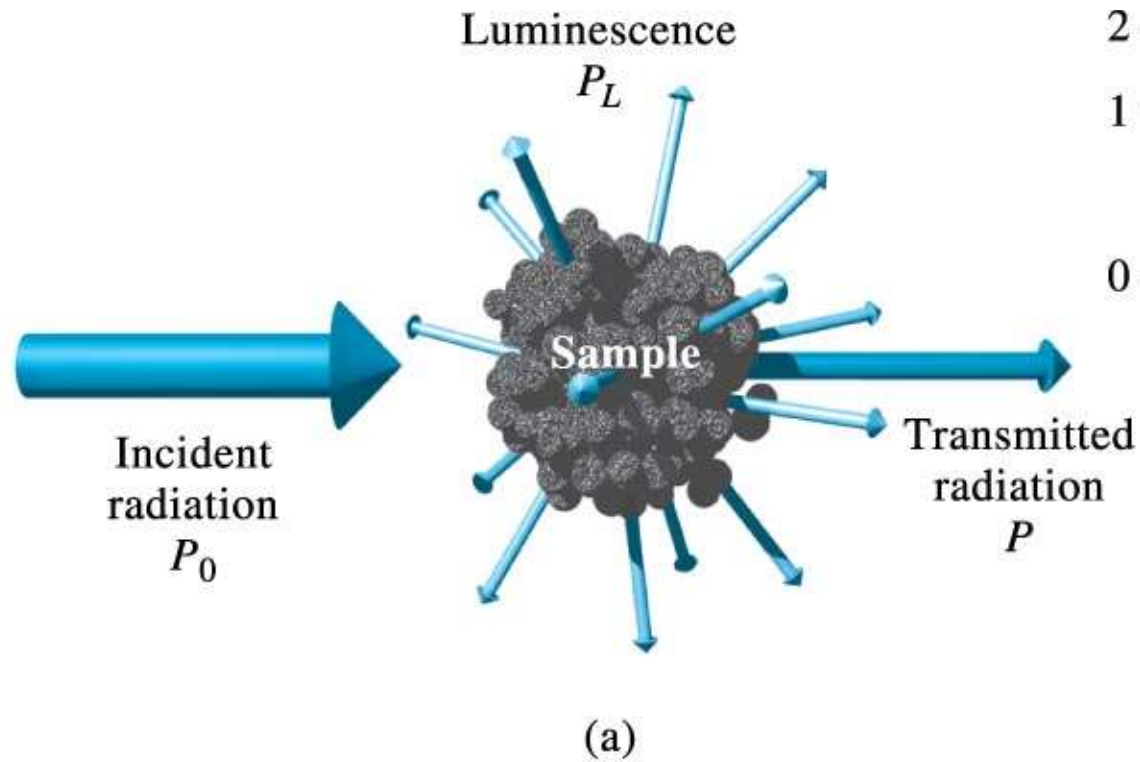
(a)



(b)



(c)

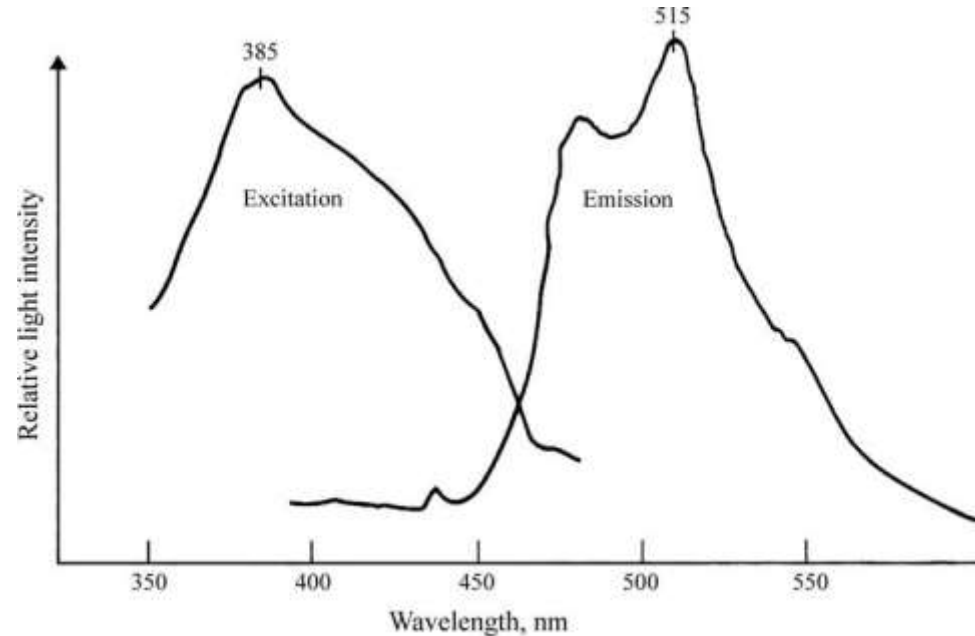


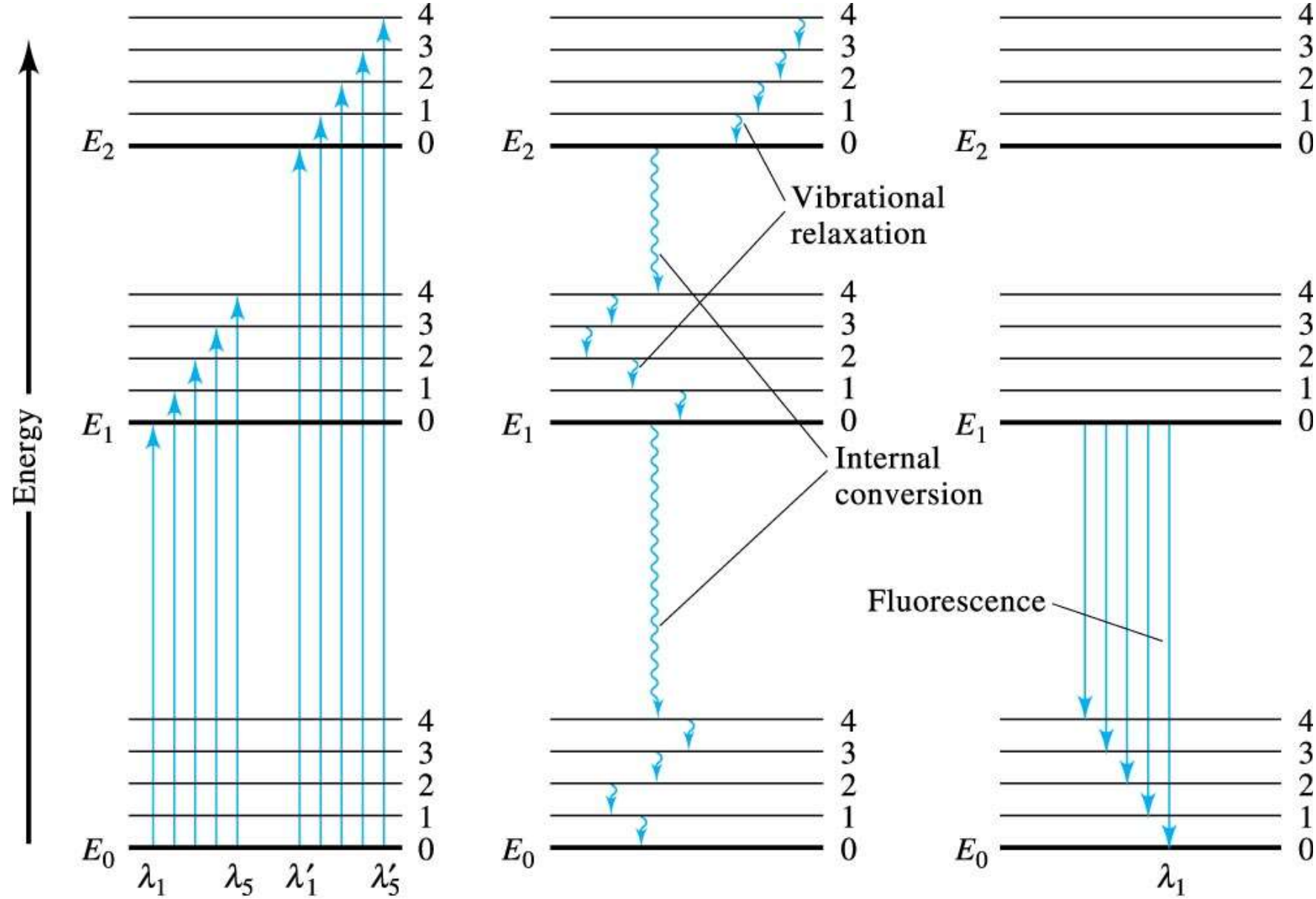
Luminol



Floresans nedir?

- Tüm bu bilgiler ışığında floresans aslında bir emisyon şeklidir.
- Işığın absorplanması sonucu uyarılmış bir atomun (excited), temel hale dönerken görünür bölgede yaymış olduğu ışıma floresans denir.





(a) Molecular absorption

(b) Nonradiative relaxation

(c) Fluorescence

Moleküler floresans Spektroskopi

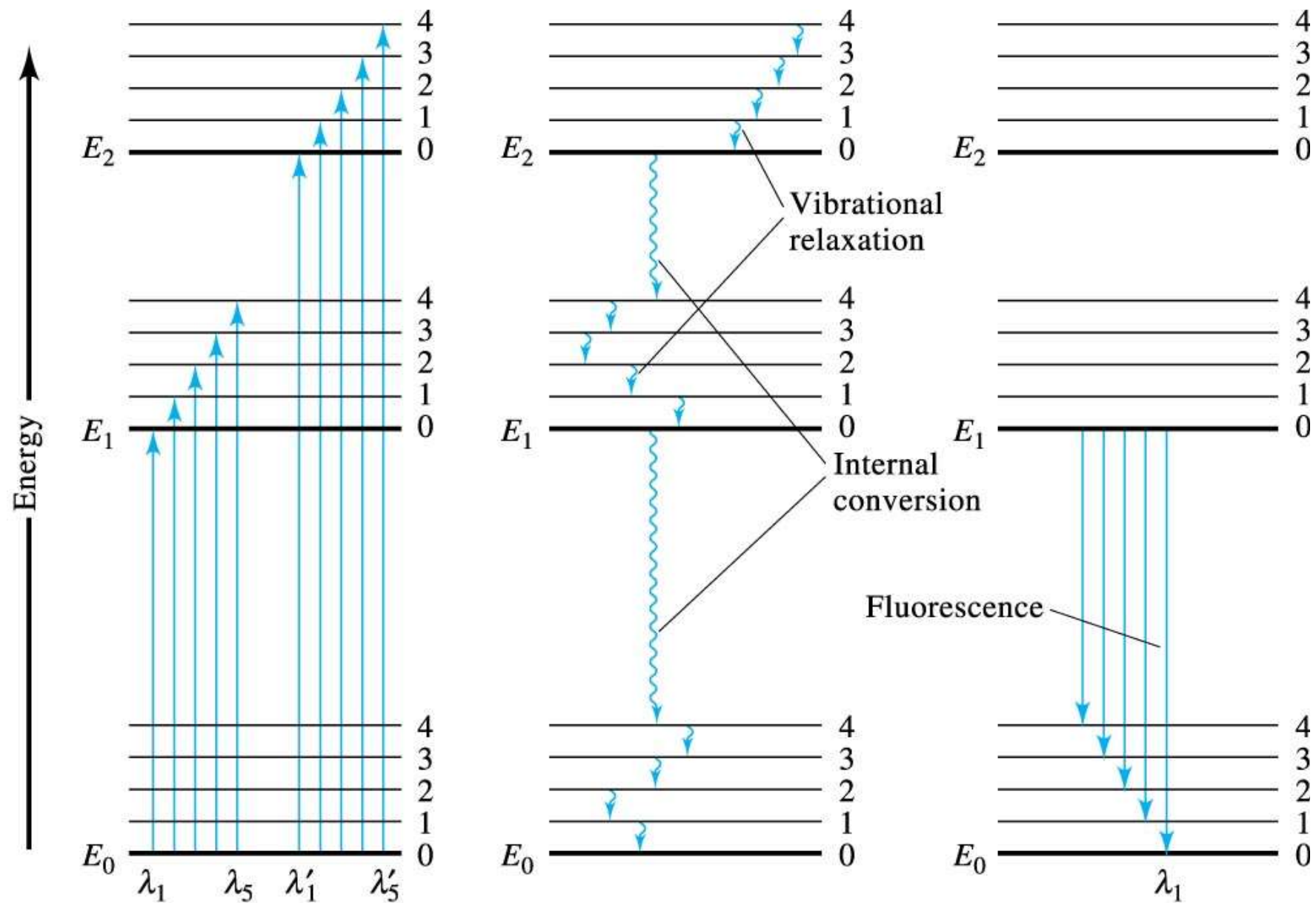
- Moleküler floresans yönteminde numune, kendi absorpsiyon dalga boyunda (buna uyarma dalga boyu da denir) uyarılır ve bundan daha uzun bir dalga boyunda (emisyon veya floresans dalga boyu) yayılan ışın ölçülür.
- Genelde floresans emisyonu, gelen ışına dik doğrultuda ölçülerek gelen ışınların dedektöre girmesi önlenir.
- Uyarılmış türün emisyonu çok kısa süreli ise floresans, uzun süre devam ederse de fosforesans kavramları kullanılır.

Moleküler floresans Spektroskopisi(devam)

- Moleküler floresans spektroskopisinin en çekici özelliklerinden biri sahip olduğu duyarlılıktır. Genelde absorpsiyon spektroskopisine oranlar bir ila üç bin kat daha iyidir.
- Bir diğer avantajı ise, absorpsiyon spektroskopisine oranla floresans spektroskopisinin sahip olduğu geniş lineer konsantrasyon aralığıdır. Floresans yöntemlerin uygulanabilirliği, absorpsiyon sistemlerine oranda daha kısıtlıdır. Bunun da sebebi, nispeten sınırlı sayıda kimyasal sistemin floresans yapabiliyor olmasından kaynaklanır.

Moleküler floresansın prensipleri

- Moleküler floresans, bir örneği absorpsiyon dalgaboyunda, veya uyarılma dalga boyu olarakda adlandırılır, uyarılıp, daha uzun bir dalga boyu olan emisyon dalga boyunda veya floresans dalga boyu olarakta aldandırılır, yaydığı ışımaya ölçülerek gerçekleştirilir.
- Genellikle, floresans emisyonu uygun açılar olucak şekilde geçen ışınların girişiminden kurtularak ölçülür.
- Kısa süreli oluşan emisyonlara floresans, daha uzun süreli olanlara ise fosforesans adı verilir.



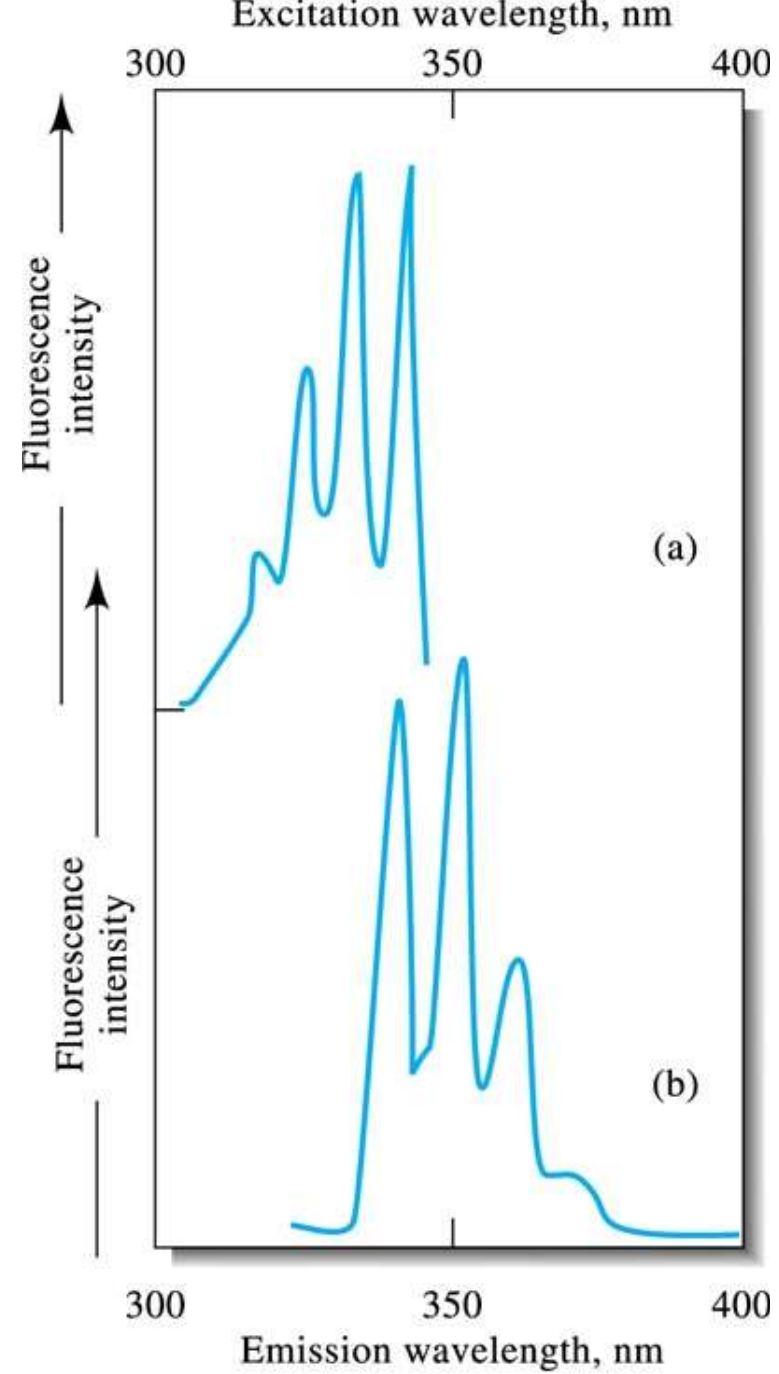
(a) Molecular absorption

(b) Nonradiative relaxation

(c) Fluorescence

Uyarma spektrumları ile Floresans spektrumları arasındaki ilişki

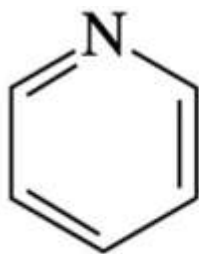
- Titreşim düzeyleri arasındaki enerji farkları, temel ve uyarılmış haller için hemen hemen aynı olduğundan, bir bileşik için absorpsiyon veya uyarma spektrumu ve floresans spektrumu genellikle birbirlerinin yaklaşık ayna görüntüsü şeklinde olup rezonsans çizgisinde çakışma vardır.
- Bu ayna görüntüsü kuralına birçok istisna vardır. Özellikle, uyarılmış ve temel hallerin molekül geometrileri farklı ise veya moleküllerin farklı kısımları farklı floresans bantları oluşturabiliyorsa, ayna görüntüsü kuralı işlemez.



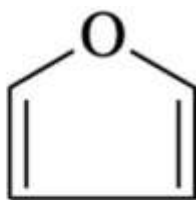
Floresans yapabilen türler

- Işının absorplanması sonucu uyarılan bir molekülün türlü mekanizmalarla ışın yayarak temel hale dönmesine floresans adı verilir.
- Buna göre ışını absorplayan tüm moleküller floresans özelliği gösterebilir. Fakat, çoğu molekül bu davranışı göstermez, çünkü yapıları gereği olarak ışımasız yollarla temel hale dönebilirler.
- Floresans gösteren molekül sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı, moleküller floresansın kuantum verimi olarak adlandırılır.

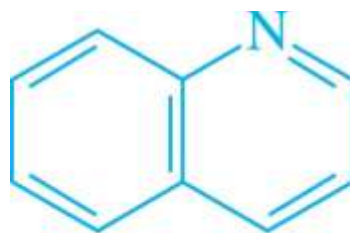
$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}}$$



pyridine



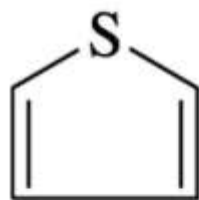
furan



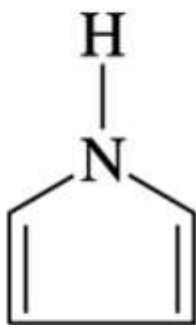
quinoline



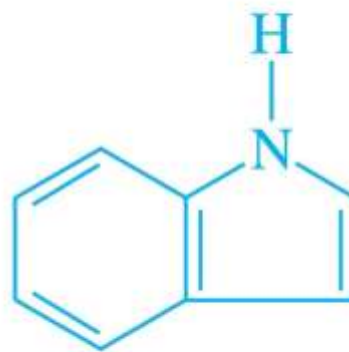
isoquinoline



thiophene



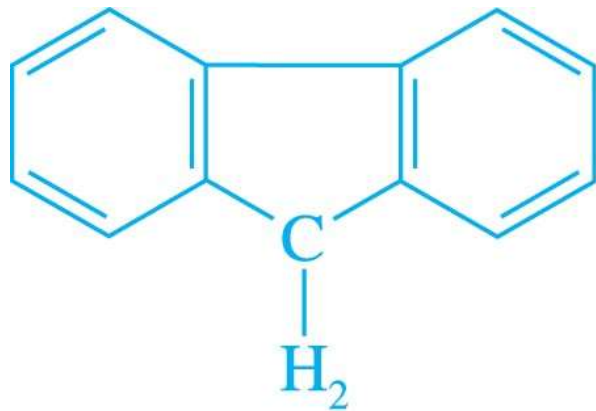
pyrrole



indole

Floresans yapabilen türler

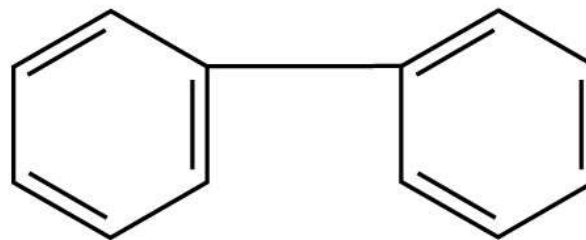
- Aromatik halka içeren bileşikler, en şiddetli ve kullanışlı moleküler floresans emisyonu verirler.
- Sübstide edilmemiş aromatik hidrokarbonların çoğu, çözeltide floresans verirler.
- DeneySEL bulgulara göre, floresans özelliği rijit moleküllerde artış gösterir.
- Bir metal iyonu ile kompleks oluşturdıklarında, bazı organik şelatlaştırmacı reaktiflerin floresansında görülen artış da yapısal rijitlik ile açıklanabilir.



fluorene

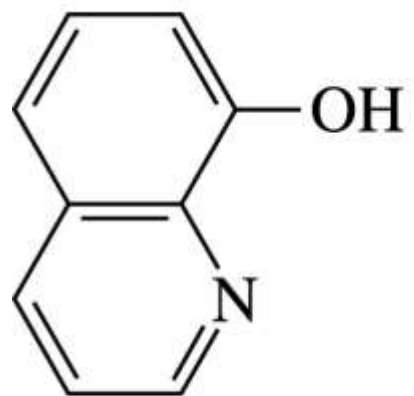
$\Phi : 1$

© 2004 Thomson - Brooks/Cole



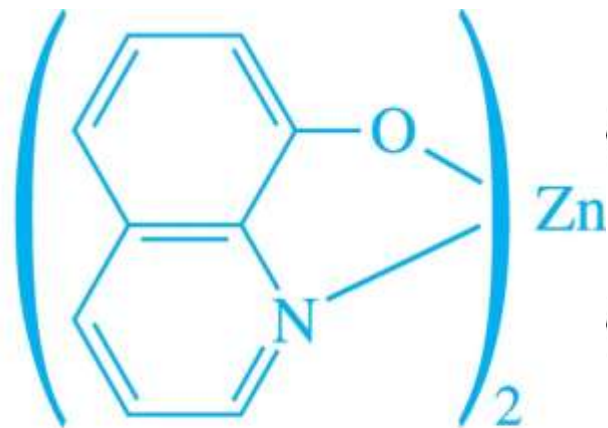
biphenyl

$\Phi : 0.2$



nonfluorescing

© 2004 Thomson - Brooks/Cole



fluorescing

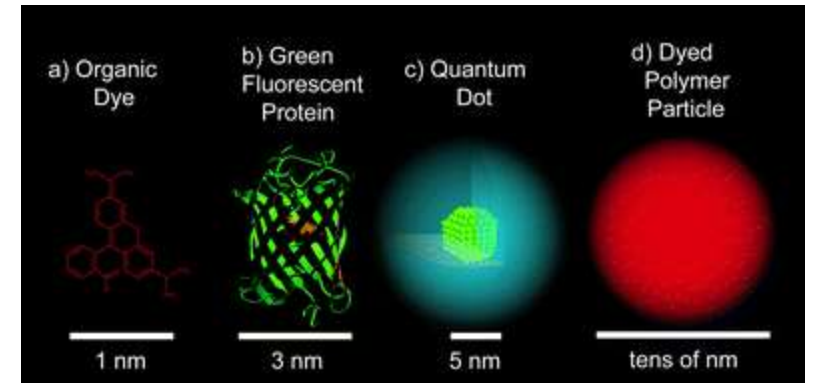
Floresan tespit yöntemleri

- The term *sensing* refers to the detection of a particular entity (e.g matter, energy) by a specialized device (i.e sensor).
- Yani, algılama dediğimiz terim belirli bir varlığın (madde, enerji, vs.) özelleştirilmiş bir cihaz (sensör gibi) ile ölçülmesi şeklinde tanımlanır.
- Floresans tespit yöntemi bunlardan biridir ve uyarım yapılan bir floresans molekül veya yapıdan ortaya çıkan görünür bölgedeki ışımının gözlemlenmesi ile yapılır.

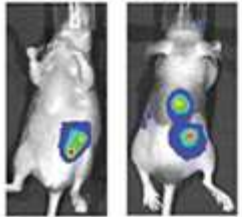
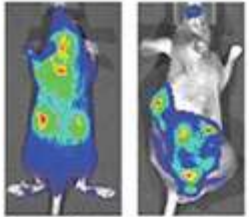
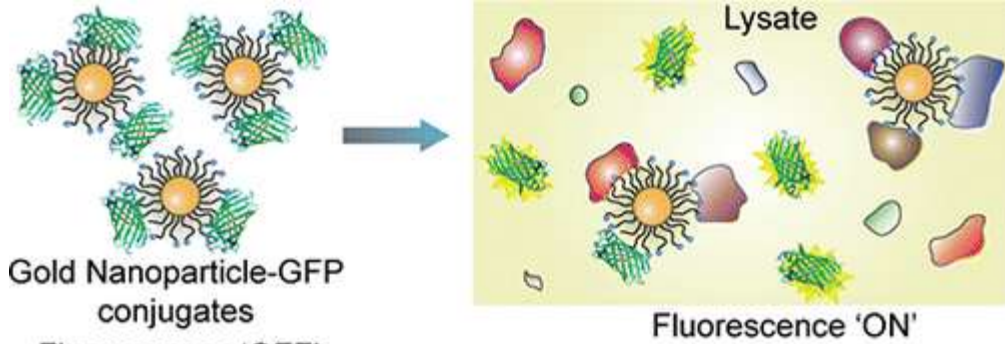


Floresan biyosensörler nasıl çalışır?

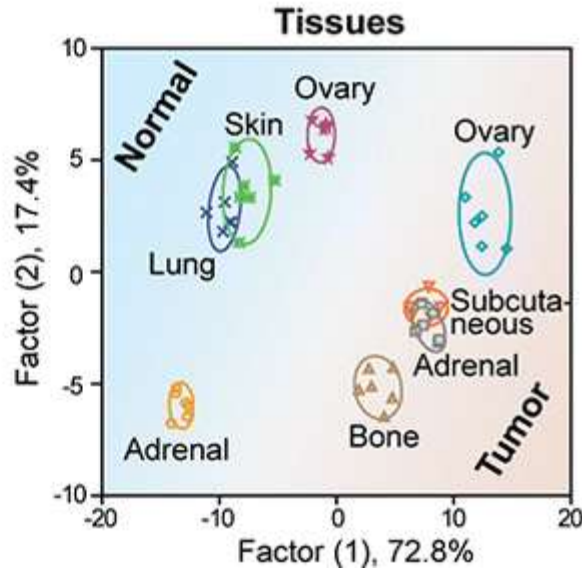
- Floresan biyosensörler genellikle floresans özelliğine sahip organik moleküller, nanoparçacıklar, proteinler veya bunların birleşimlerinden oluşur.
- Bu moleküller kullanılarak çeşitli biyosensör yapıları oluşturulmaktadır ve bunları 5 farklı kategori altında sınıflandırabiliriz.
 - Turn-on (Kapa aç)
 - Turn-off (Aç kapa)
 - FRET (Floresan rezonans enerji transferi)
 - Kemilüminesans
 - Kolorimetrik



Turn-on (Kapa aç) ve Turn-off (Aç kapa)



Generation of metastases



- Altın nanoparçacık-floresan protein ikilisi etkileşim içinde olduğunda, floresans sinyali **KAPALI** iken, analitin parçacıkla etkileşmesi ile beraber floresan sinyali **AÇILIP** sinyaller alınabilir hale gelmektedir.
- Bu tip sensörlere Turn-on (Kapa aç) türü sensörler denir.
- Bu gözlemlenin tam tersi olduğu durumlarda ise Turn-off (Aç kapa) türü sensörler denir.

FRET (Floresans rezonans enerji transfer)

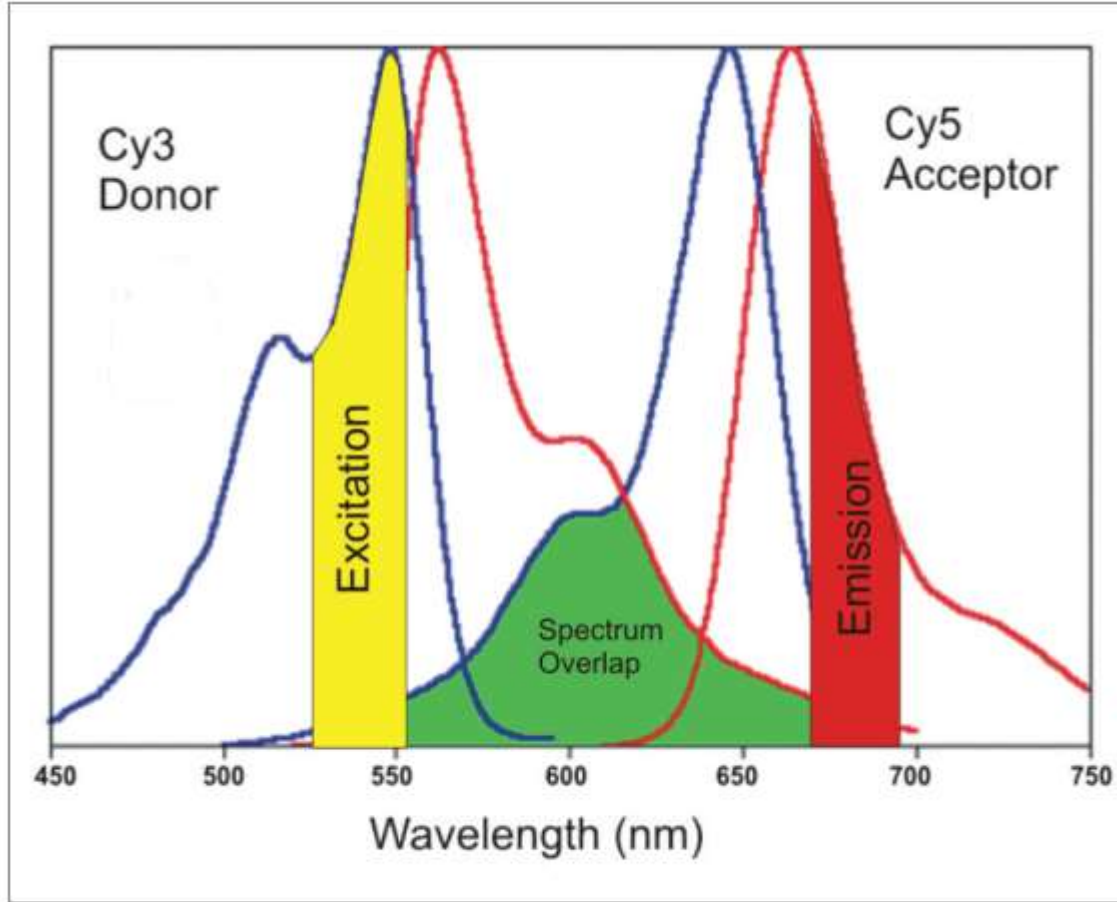
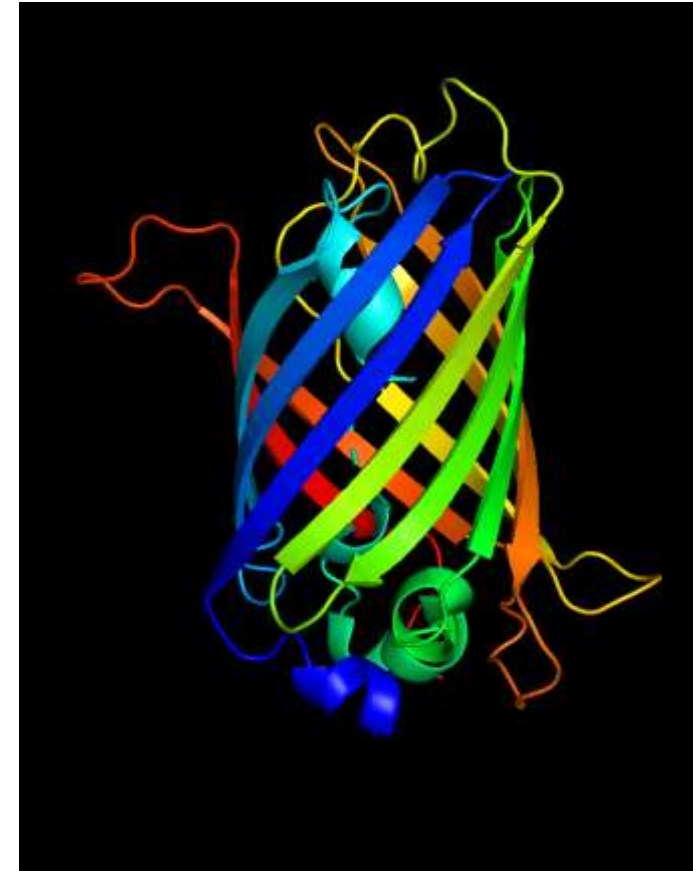
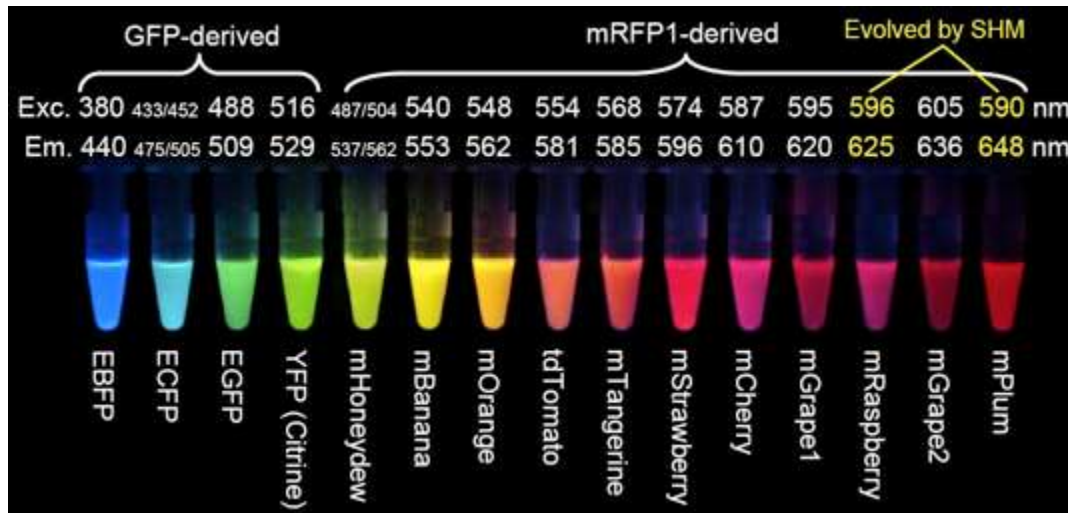


Figure 1. Schematic representation of the spectral overlap integral

- Bu tip sensörlerde iki tip floresan molekül kullanılarak(acceptor ve donor), aralarındaki mesafeye bağlı olarak enerjinin aktarımı ile gerçekleşen sensörlerdir.
- İki molekülün spektrumdaki çakışmalarının sonucu ve birinin excitation dalgaboyunun diğerinin emisyon dalgaboyuna yakın olması sayesinde, bu iki molekül birbirine yaklaştığında enerji iletimi gerçekleşir ve bu sayede sinyal değişimi izlenerek bir sensör oluşturulur.

BRET (Bioluminescence resonans energy transfer)

- Biyolojik maddeler kullanarak (örn: floresan proteinler), FRET e benzer şekilde enerji aktarımı gerçekleştirerek yapılan sensörlere BRET biyosensörleri adı verilir.



Kolorimetrik sensörler



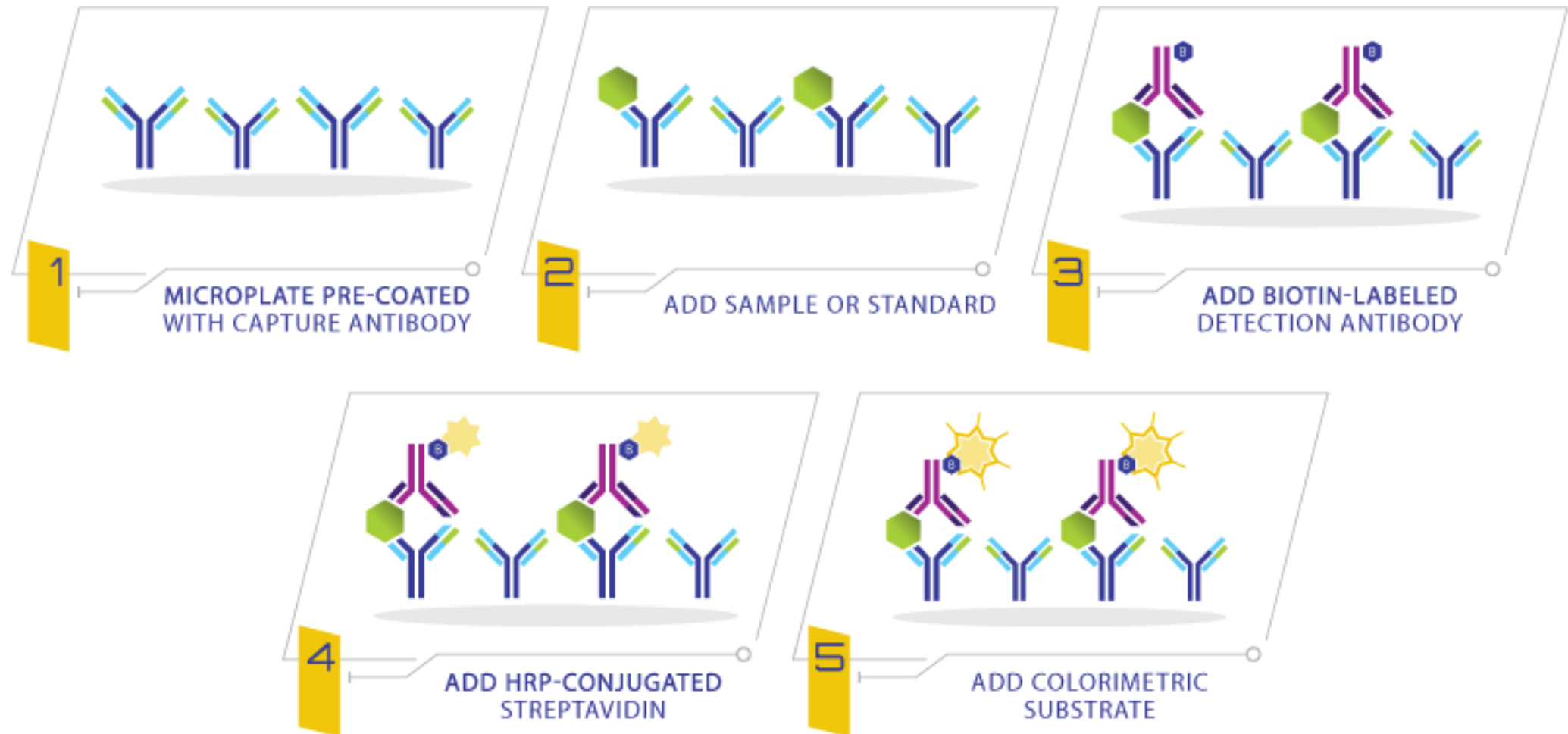
- Pop Quiz:

- Hamilelik testi bir kolorimetrik sensör müdür yoksa farklı tip bir sensör müdür?

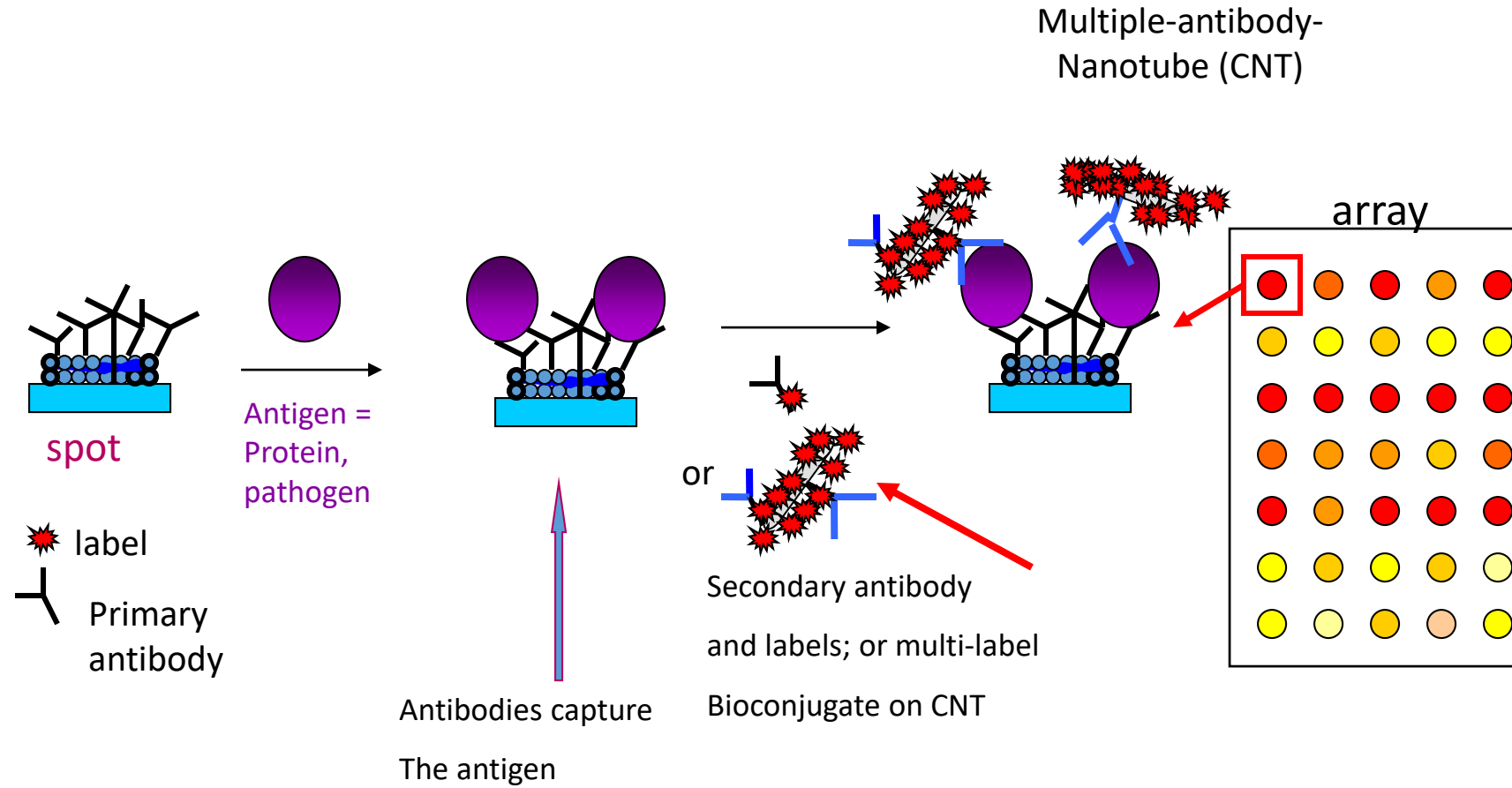
- Cevap:

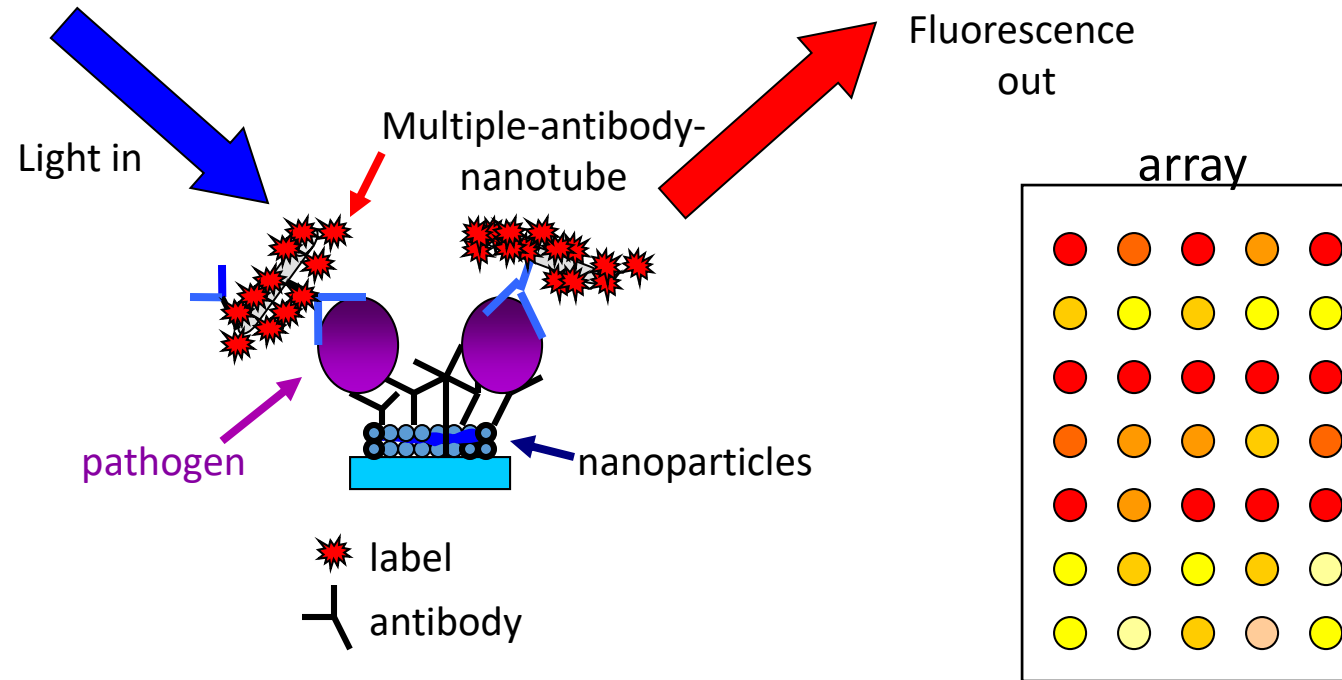
- Evet bir kolorimetrik sensördür ve işlem idrar içindeki human chorionic gonadotropin (HCG) hormonunun test stripi içerisindeki kimyasallarla reaksiyona girmesi sonucu hamile olunması halinde çift, yokken tek şeridin renklenmesi ile ortaya çıkar. Bu şekilde renk değişimlerinin gözlendiği sensörler kolorimetrik sensörlerdir.

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)



Fluorescence-based sandwich immunoassay





Fluorescence from all spots measured simultaneously



At the bed side



**At medical
emergency sites**



In medical labs



**For home-based
medical care**

Chemical Nose (Kimyasal burun)



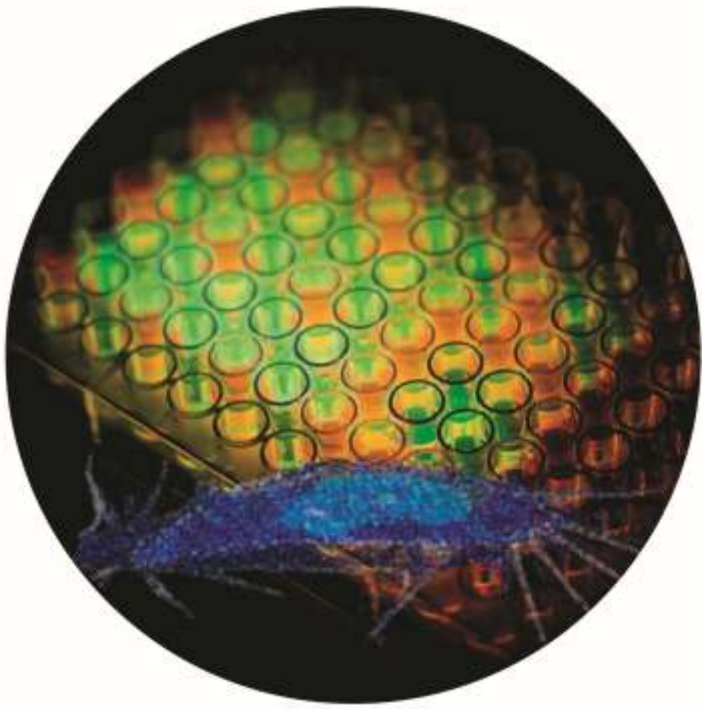
- Pop Quiz:

- Burunda koku alma işlemi nasıl yapılır?

- Cevap:

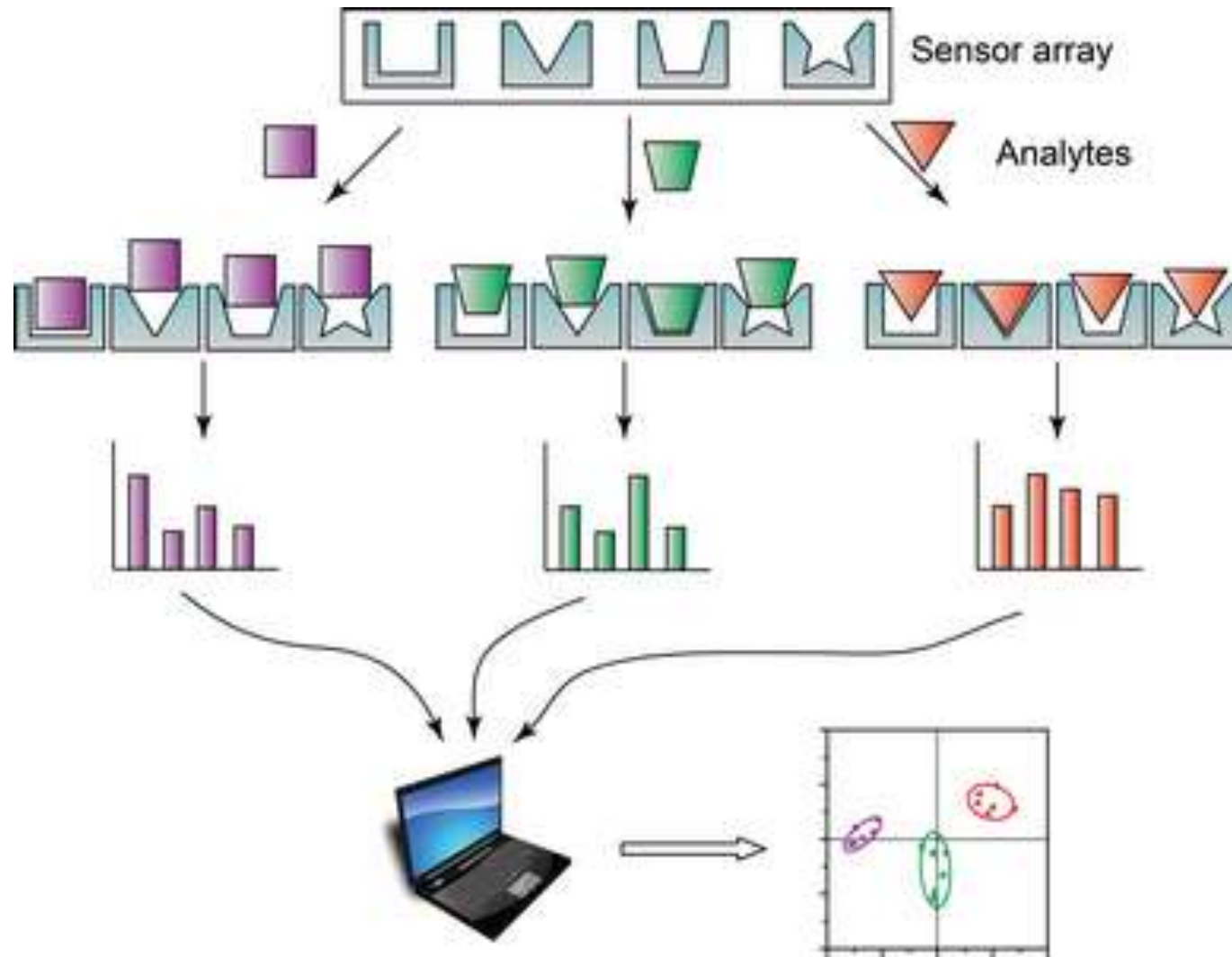
- Spesifik reseptörler yerine seçici reseptörler kullanılarak bir çok farklı kokuyu aynı reseptörler kullanılarak ayırt edilebilir.

Chemical Nose (Kimyasal burun)



- Kimyasal burun tarzı biyosensörler, aynı insan burnuna benzer şekilde spesifik etkileşimleri kullanmak yerine seçici etkileşimler yardımı ile analitlerin sınıflandırılmasını sağlarlar.
- Böylelikle, DNA, protein, hücre, doku karışımı vs gibi basitten kompleks karışımlara kadar farklı ortamlardaki maddelerin analizleri sağlanabilir.

Kimyasal burun

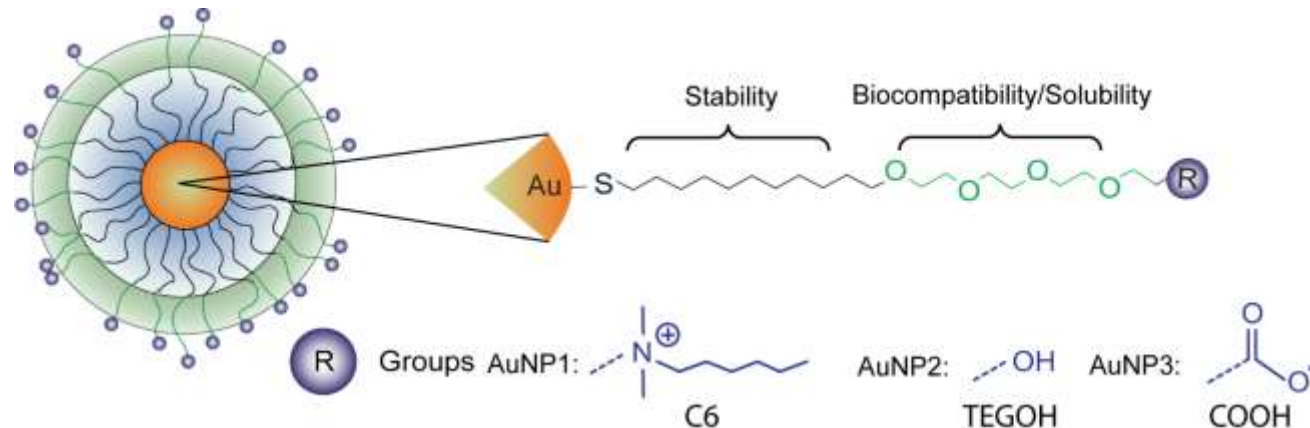


Nanomalzemelerin biyosensör uygulamaları

- Optik biyosensörlerde, nanomalzemelerin kullanımı yaygınca karşılaşılan bir durumdur.
- Bunun sebebi nano boyutta parçacıkların floresans, fosforesans gibi ışımlar yapabilmeleri veya var olan ışımları soğurarak yok edebilmelerinden kaynaklanır.

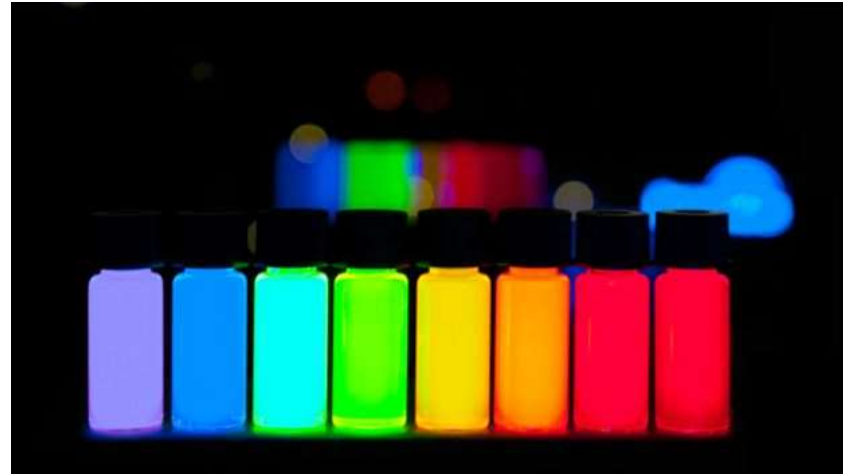
Altın nanoparçacıklar

- Altın nanoparçacıkların en önemli özelliklerinden biri fluorescence quencher (florasans kapayıcı) olmasıdır.
- Ayrıca yüzey kimyasını farklı gruplarla düzenleyebilecek olmanızdan dolayı seçici etkileşimler elde edilmesi çok kolay bir hal alır.

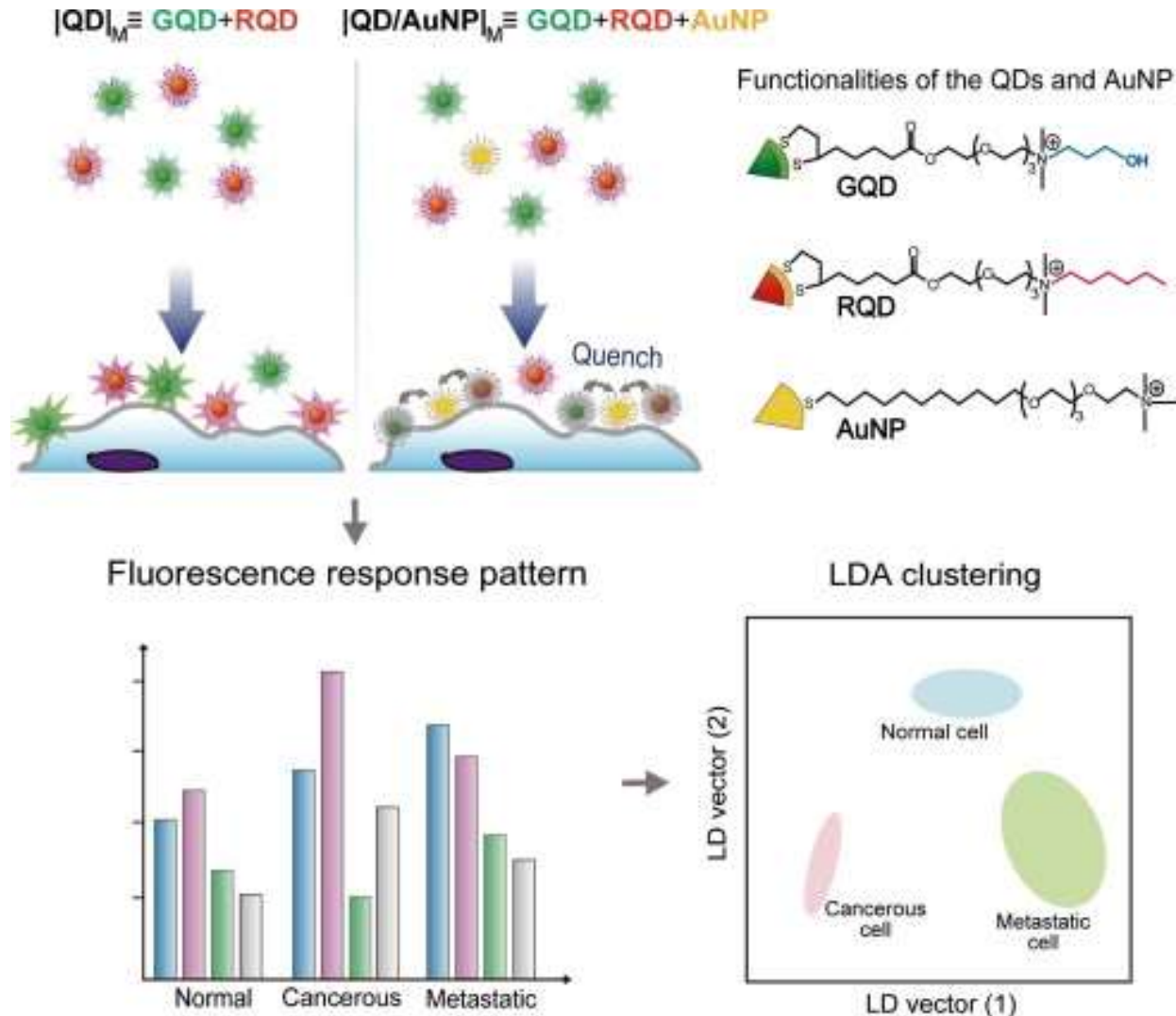


Kuantum noktacıkları

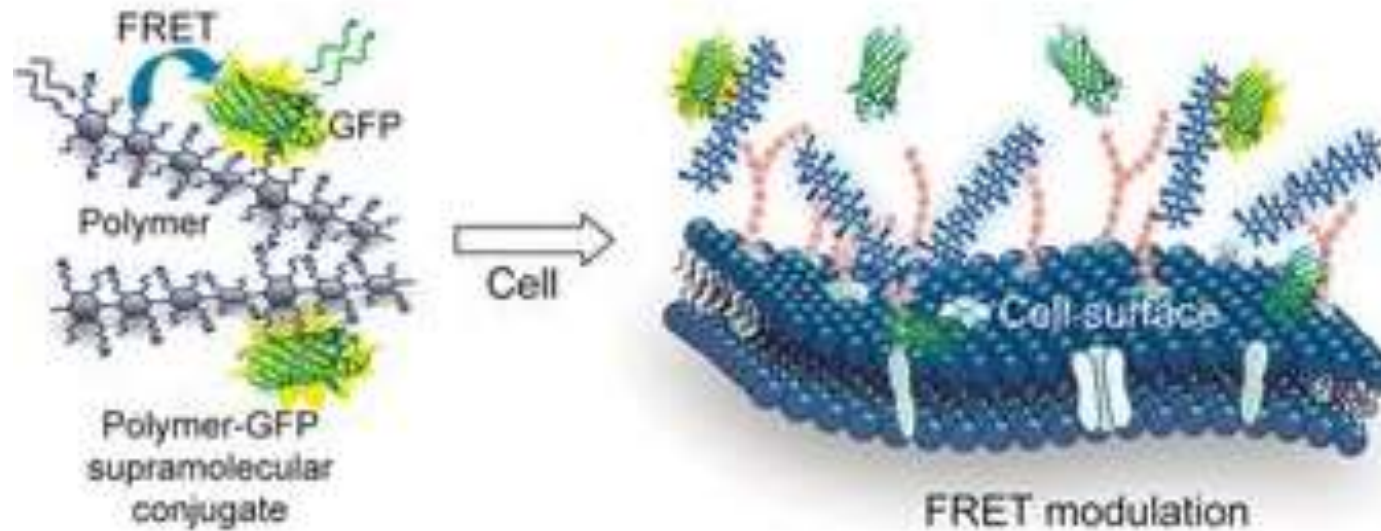
- Kuantum noktacıklarının en büyük özelliği gökkuşadı içerisinde yer alan tüm görünür bölge ışımlarını gösterebilen floresans ışığı yayabilme potansiyellerinin olmasıdır.
- Altına benzer şekilde yüzey kimyası kullanılarak seçici bağlar kurabilen yapıların elde edilmeside mümkündür.



AuNP ile QD karıştırılırsa ne olur?

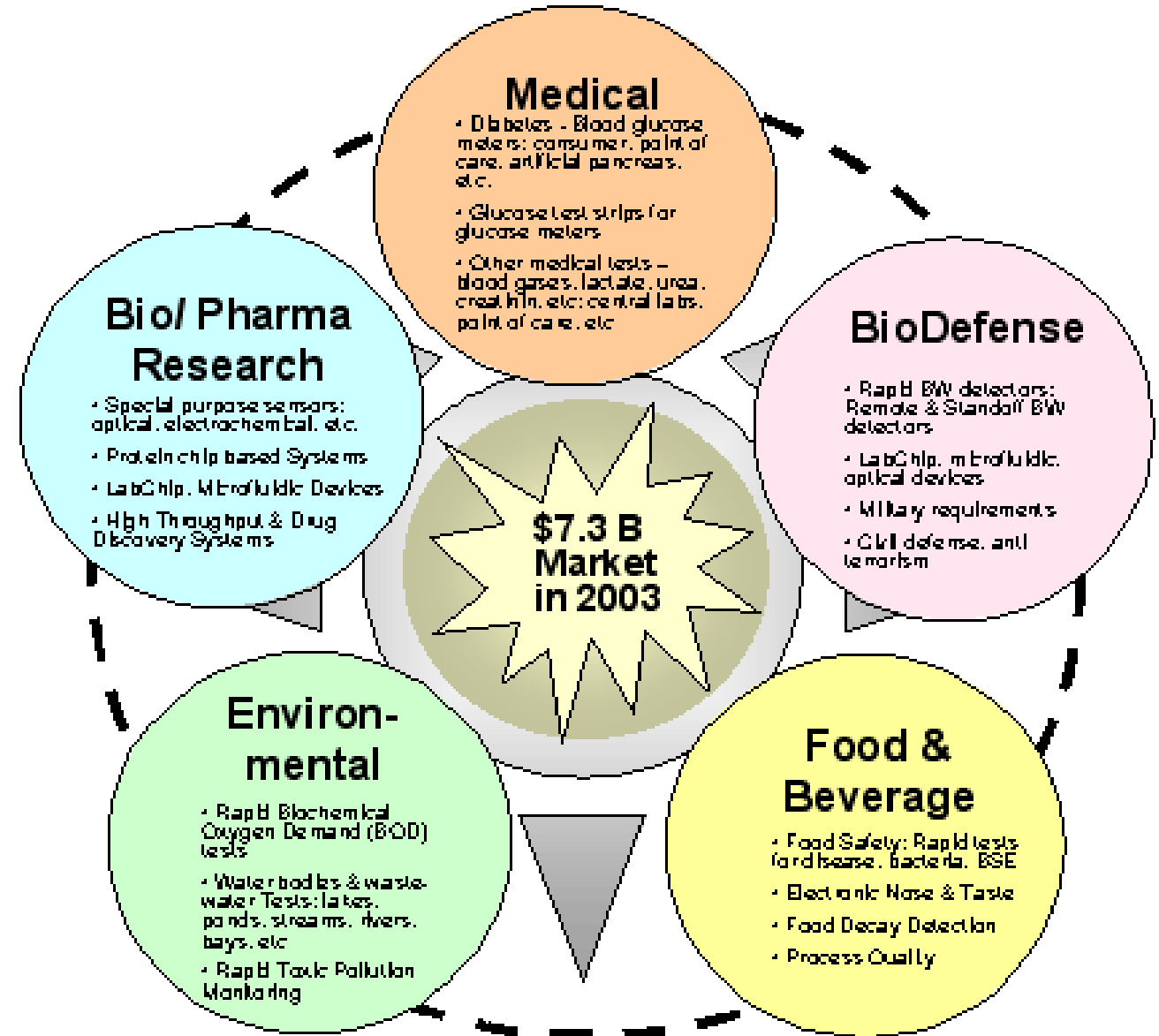


iki floresans molekül yan yana gelirse ne olur?



Potansiyel Uygulamaları

- Klinik tanı
- Yiyecek ve tarım işlemleri
- Çevre görüntüleme
- Savaş maddelerinin tespiti
- Belkide daha fazlası...

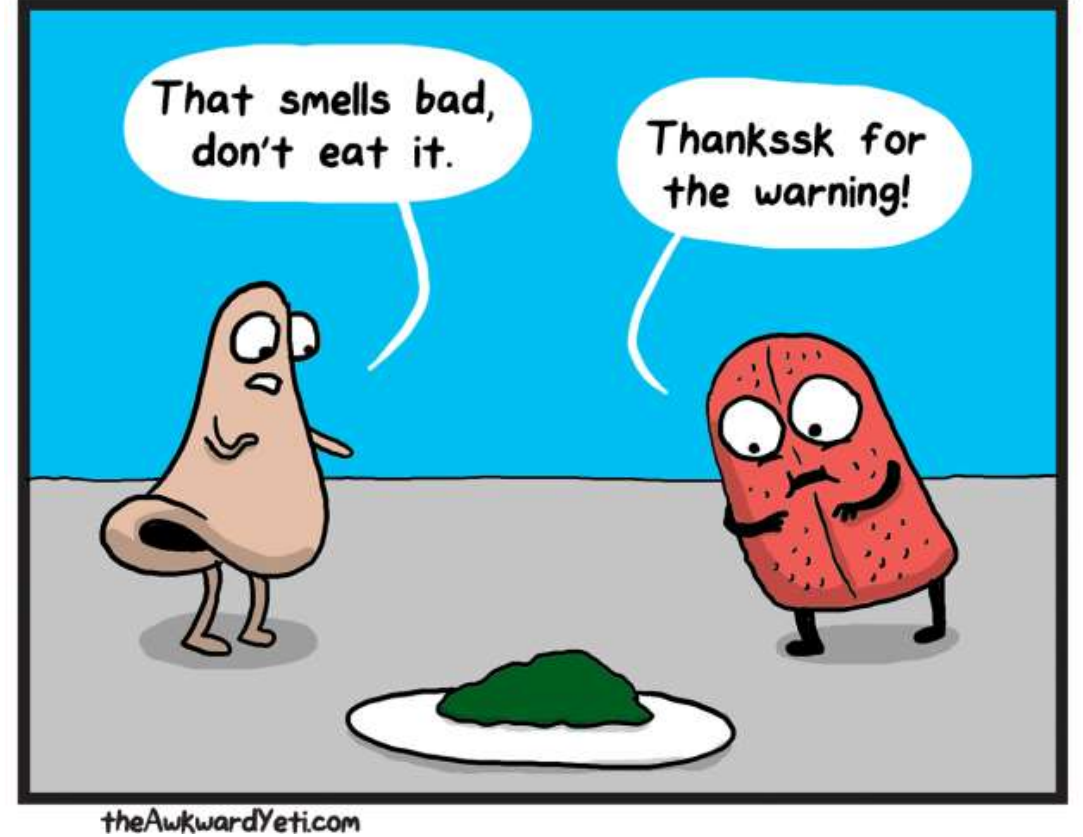


Sonuç

- Çeşitli kimyasallar kullanılarak veya floresans özelliğe sahip moleküllerin sıvı faz içerisinde reaksiyon girmeleri veya etkileşimde bulunmaları sonucu ortaya çıkan ve gözleyebildiğimiz tipte sensörler floresan sensörler sınıfına girmektedirler.
- Bu tip sensörlerin avantajı ucuz bir üretime sahip olmaları (antibody, antijen kullanılmadığı için), sonuçların kolay işlenebilir veya anlaşılabilir olmaları ve sıvı fazda olmalarından dolayı biyolojik sıvılarda daha kolay kullanılabilir olmalarıdır.

Düşünülecek yiyecekler (Food for thought)

- e-burun (e-nose)
- e-dil (e-tongue)
- Kimyasal dil (chemical tongue)
- Array (sıralı) bazlı sensör sistemleri



Sorusu olan?

