

**Manyetik Parçacıkların Kullanıldığı Biyosensörlerde
Mikro/Nano Demir Parçacıklar Kullanarak İşaret Arttırma Ve
Hassasiyeti Geliştirme**

Program Kodu: 3001

Proje No: 114E886

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Kutay İçöz

Bursiyer(ler):

Omary Mzava

Şeyda Varlı (kısmi yer aldı)

Zehra Taş (kısmi yer aldı)

Haziran 2016
KAYSERİ

Önsöz

Bu proje de manyetik parçacıkların kullanıldığı biyosensörlerde kullanılmak üzere manyetik parçacıkların topaklanmasını esas alan işaret kuvvetlendirme ve böylece hassasiyet geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Literatürde manyetik ayrıştırma için geliştirilen manyetik parçacıkların dipol-dipol etkileşimi teorik olarak incelenmiş daha sonra da deneysel olarak biyosensörlerde işaret artırma amacıyla kullanımı irdelenmiştir. Bulunan sonuçlar ile SCI indeksli bir makale, Biosensor2016 konferansında poster ve NanoTR12 konferansında sözlü bildiri üretilmiştir.

Bu proje 3001 Başlangıç Ar-Ge projeleri desteği kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Emeği geçenlere ve değerlendirenlere teşekkür ederiz.

İçindekiler

İçindekiler	iii
Tablo ve Şekil Listeleri	iv
Özet	vi
Abstract	vii
1. Giriş	1
2. Literatür Özeti	2
3. Gereç ve Yöntem	6
3.1 Dene platformunun karakterize edilmesi	8
4. Bulgular	9
4.1 Parçacıklar arasındaki açı (θ)'nın etkisinin incelenmesi	9
4.2 Parçacık malzemesinin manyetik alan duyarlılığının (χ) topaklanmaya etkisinin incelenmesi	10
4.3 Manyetik Alan Şiddetinin Topaklanmaya Etkisi	10
4.4 Manyetik parçacık boyutunun topaklanmaya olan etkisinin incelenmesi	11
4.5 Demir Nano Parçacık Deneyleri	12
4.6 Bakteri üzerine gerçekleştirilen deneyler	13
4.7 Altın Yüzeylerde Gerçekleştirilen Deneyler	15
4.8 Mobil Cihazlar ile Yapılan Ölçümler	17
5. Tartışma/Sonuç	18
Kaynaklar	20

Tablo ve Şekil Listeleri

Tablo 1: Bakteri deneyleri sonucunda ölçülen piksel alanları ve hesaplanan normalize kuvvetlendirme oranları	14
Şekil 1. ELISA ve sandiviç yapısı. Yakalayıcı antikor (antibody) yüzeyde hedefi yakalamak için, bağlayıcı molekül ve işaret molekülü ise işaret elde etmek için sandiviç yapısını oluşturur. Sinyal molekülü flüoresan özelliğine sahip olup belli dalga boyundaki ışıkta ışımaya yapar.....	3
Şekil 2. Biotin ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik parçacıklar ile streptavidin algılama. Silisyum dioksit yüzey biotin APTES (3-Aminopropyl) triethoxysilane ile streptavidine bağlanacak şekilde fonksiyonel hale getirilmişken bağlanmanın olmaması istenen bölgeler Octadecyltrimethoxysilane (ODS) ile bloklanmıştır. (a) da optik mikroskop ile çekilen ve belli alanlara bağlanmış manyetik parçacıklar (b) de kontrol yüzeyi (c) de ise manyetik parçacıkların SEM görüntüsü verilmiştir (Osaka et al. 2006).....	3
Şekil 3. Yüzeyle reseptör olarak F-BSA molekülü mikro-kontak basım tekniği ile yerleştirilmiştir. Folate reseptör antikoruna kaplanmış manyetik parçacıklar hedef molekülü yakalama ve ayırma işlemlerinden sonra yüzeye eklenerek sandiviç yapısı oluşturulmuştur. Lazer kırınım tabanlı ölçümler ile FR ün konsantrasyon değişimine göre manyetik parçacık yoğunluğundaki farklar tespit edilmiştir (Acharya et al. 2007).	4
Şekil 4. Biyosensörlerde manyetik parçacıkların kullanıldığı farklı işaret kuvvetlendirme teknikleri, solda hedef (target), biyomoleküller ile kaplı manyetik parçacık (coated MB) ve diğer biyomoleküller ile kaplı parçacıklar bulunmaktadır (Malhotra et al. 2012), ortada hedef moleküle bağlı manyetik parçacık ve altın nanoparçacıklar bulunmaktadır (Almeida et al. 2013), sağda hedef moleküle bağlanan ikincil molekül yardımıyla yüzey alanı artırılmış ve daha fazla manyetik parçacığın bağlanması sağlanmıştır (Lee et al. 2010).....	4
Şekil 5. Manyetik parçacıkların kullanıldığı kanser hücrelerinin ürettiği platelet-derived growth factor (PDGF) proteininin algılaması için geliştirilmiş biyosensör. Değişik konsantrasyonlar için manyetik parçacıkların yüzeye yapışma oranları dijital kameralar ve lazer kırınım ile ölçülmüştür. İşaret kuvvetlendirmek için biyolojik DNA artırımına dayalı bir teknik kullanılmıştır. Bu teknik hem uzun zaman almakta hem de maliyeti arttırmaktadır (Lee et al. 2010).....	5
Şekil 6: Dışardan uygulanan H manyetik alanı altında 2 manyetik parçacığın birbirine uyguladığı kuvvet ve tek bir parçacığın etrafında oluşan kuvvet alanının gösterimi.....	7
Şekil 7: Sinyal kuvvetlendirme deney düzeneği.....	7
Şekil 8: A: hedefi yakalamış manyetik parçacık (gri renkli) ile manyetik etkileşim ile diğer manyetik parçacıkların (turuncu renkli) çizgi şeklinde dizilmesi, topaklanması. B: manyetik platformun fotoğrafı 1: damlaların konulduğu cam parçası, 2: miknatıslar. C: Manyetik alanın miknatıs sayısına ve miknatıslar arasındaki mesafeye göre değişimi, Gauss metre ile ölçülmüştür	8
Şekil 9: A: Mikroakışkan deney düzeneği, B: Optik ışık mikroskobu ile görüntülerin kayıt edilmesi.....	9
Şekil 10: Normalize edilmiş manyetik parçacık hareket yörüngeleri, sabit parçacık merkezde olacak şekilde mavi renk 2 µm, yeşil renk 4 µm ve kırmızı renk 8 µm boyutlarındaki manyetik parçacıkların hareketlerini göstermektedir.	9
Şekil 11: Aynı boyutta, aynı firmanın ürettiği ferromanyetik ve paramanyetik parçacıkların sabit manyetik alan altında zaman göre topaklanması. A: Deneysel olarak ölçülen uzunluk-zaman değişimi. B: Zaman aralıklarıyla çekilen fotoğraflar.....	10
Şekil 12: Manyetik alan şiddetinin topaklanmaya olan etkisinin incelenmesi A: Deneysel olarak elde edilen topaklanma kuyruk uzunluğu-uygulanan manyetik alan şiddeti grafiği, B: Optik mikroskop görüntüleri.....	11

- Şekil 13: Manyetik parçacık boyutunun zincir uzunluğuna etkisinin incelenmesi A: Dene sonuçlarıyla elde edilen farklı boyuttaki manyetik parçacıkların karşılaştırılması B: Manyetik parçacıkların ve kuyruklarının optik mikroskop görüntüleri 12
- Şekil 14: Demir nano parçacık deneyleri. A: Manyetik alan altında demir nano parçacıkların manyetik parçacık etrafında topaklanmasını gösteren çizim B: kontrol deneyi, C,D,E: demir nano parçacıkların oluşturduğu topaklanmaların optik mikroskop ile elde edilen görüntüleri..... 12
- Şekil 15: Manyetik alan şiddeti artırılarak yaklaşık 9000 adet 60-80 nm boyutundaki demir parçacığın tek bir ferromanyetik parçacık etrafında topaklanması. 13
- Şekil 16: A: E. Coli bakterilerini yakalama için anti-E Coli antikoları ile kaplanmış manyetik parçacıkların ortama eklenmesi, E.Coli nin yakalanması ve ayrıştırılması. B: Manyetik alan uygulayarak oluşturulan işaret artırma yönteminin uygulanması. C kırmızı oklar E. Coli bakterisini göstermektedir (mor renge boyanmış), turuncu ok E. Coli spesifik manyetik boncukları, siyah ok ise manyetik dipol-dipol etkileşiminden kaynaklanarak topaklanan manyetik boncukları göstermektedir. D: spesifik olmayan bağlanmaları göstermektedir. E: sıvı içerisinde manyetik alan boyunca dizilmeyi göstermektedir. F: kurumuş bir örnekte hala manyetik etkiden manyetik boncuklar bir arada bulunmaktadır. 14
- Şekil 17: Altın Yüzeyler üzerinde gerçekleştirilmek istenen yapı 15
- Şekil 18: Altın yüzeylere mikro-kontakt basım tekniği ile BBSA yerleştirilmesi ve manyetik topaklanma deneylerini gösteren çizim..... 16
- Şekil 19 Üst: Kuvvetlendirme öncesi ve sonrasını gösteren optik mikroskop görüntüleri A: Altın yüzey üzerinde manyetik parçacıkların yer aldığı sandviç yapısının optik mikroskop ile çekilmiş görüntüsü B: Demir nano parçacıkların manyetik alan altında topaklanması. Kırmızı referans çizgi boyunca mavi-yeşil-kırmızı renk piksellerinin yoğunluk değişimi grafiği. Farklı manyetik parçacıkların neden olduğu renklerdeki yoğunluk değişimleri negatif tepelikler olarak görülmektedir. Alt: Kuvvetlendirme öncesi ve sonrasını gösteren optik mikroskop görüntüleri (yakınlaştırılmış hali). A: Kuvvetlendirme öncesi altın yüzeye biyomoleküllerin etkileşimi (streptavidin-biotin) ile bağlanmış manyetik parçacıklar (base beads) B: Kuvvetlendirme işlemi sonucu eklenen demir nano parçacıkların (added particles) manyetik etkileşim ile base beادلere bağlanması. 16
- Şekil 20: A: Nikon mikroskop 10X objektif ile elde edilen manyetik bağlanma ile birbirine bağlanmış parçacıkların görüntüsü B: Cep telefonu+lens ile kayıt edilen görüntü. 17

Özet

Bu projenin amacı öncelikle kameralar ile görüntü kayıt etme esasına dayalı veya lazer ile kırınım tabanlı ölçme sistemlerinde uygulanabilecek mikro/nano demir parçacıklar yardımıyla manyetik parçacıklardan elde edilecek sinyallerin kuvvetlendirilmesidir. Biyomoleküller ve mikro/nano parçacıklar kullanarak hedef molekülden elde edilecek işareti kuvvetlendirme çeşitli metotlarla gerçekleştirilmektedir. Halihazırdaki bu teknikler biyomoleküllerin etkileşimi esasına dayanmakta olup pahalı olma, sıcaklık ve pH değerlerine bağlı olma gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu projede amaç bahsedilen dezavantajlara sahip olmayan ferromanyetik/paramanyetik parçacıkları ve demir mikro/nano parçacıkları beraber kullanarak yeni bir işaret kuvvetlendirme tekniği geliştirmektir. Ferromanyetik/paramanyetik parçacıklar hedefi yakalama, ayrıştırma ve hareket ettirmek için kullanılacakken üzerlerine uygulanan manyetik alan nedeni ile manyetik hale gelirler. Ortama eklenecek demir parçacıkları ferromanyetik/paramanyetik parçacıklara manyetik olarak bağlanarak ve onlardan elde edilecek kütle ölçümü, görüntü kaydı gibi ölçüm metotlarında hedef molekülden elde edilen işareti kuvvetlendirerek hassasiyeti arttırmıştır. Yapılan ölçümler ile hedefi yakalamış tek bir manyetik parçacık için minimum 3 kat maksimum 60 kat işaret artırımının mümkün olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: manyetik parçacıklar, biyosensörler, işaret kuvvetlendirme, mikro-elektro-mekanik sistemler (MEMS)

Abstract

The purpose of this project is to develop a new technique that uses iron micro/nano particles and can be applied to enhance imaging signals recorded by cameras from magnetic particles or can be applied to laser diffraction based biosensors. There are various techniques to amplify the signals acquired from target molecules. The current methods depend on biomolecular interaction and have some drawbacks such as being costly, temperature and pH dependency. The goal of this project to develop a novel technique for signal enhancement by combining iron micro/nano particles together with ferromagnetic/paramagnetic beads that does not have the mentioned drawbacks. The duties of ferromagnetic/paramagnetic beads are 1) as usual to capture, separate and manipulate target molecules 2) to form a binding site for iron particles after magnetic field applied. The stack of ferromagnetic/paramagnetic beads and iron particles have a higher mass and a larger area in the image. It was shown that for a magnetic bead that captured a target molecule minimum 3 fold to maximum 60-fold amplification is possible with the developed technique.

Keywords: magnetic beads, biosensors, signal amplification, microelectromechanical systems (MEMS)

1. Giriş

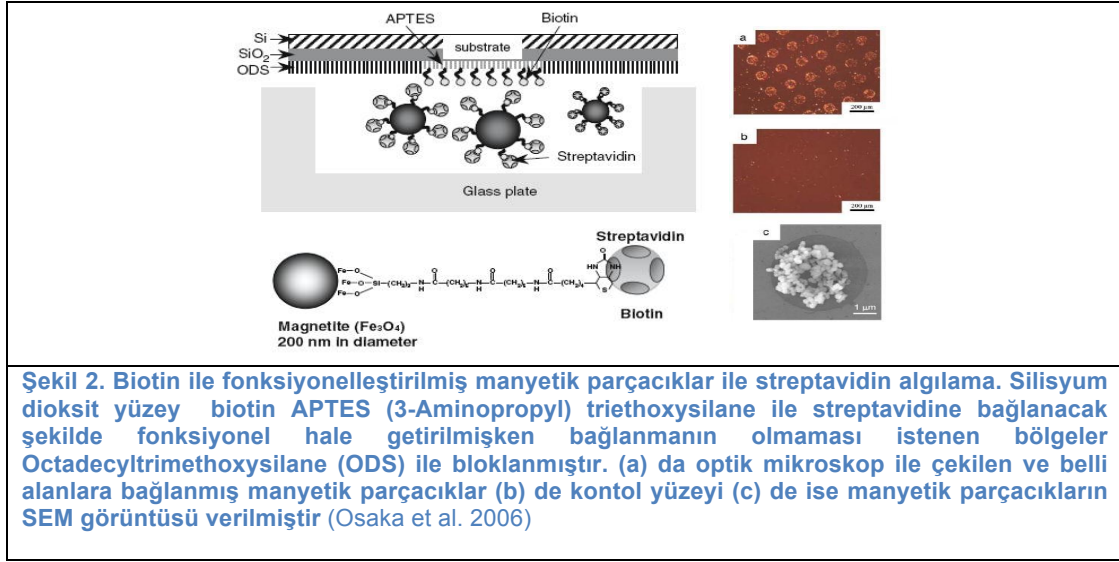
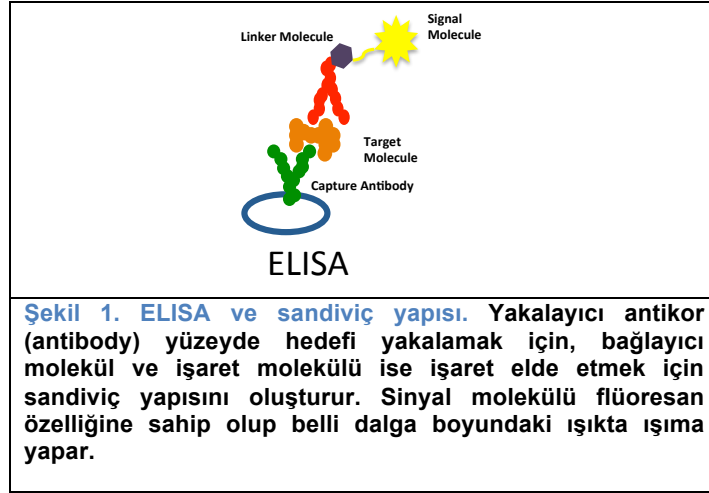
Manyetik mikro/nano parçacıklar hedef hücreleri yada molekülleri kan, idrar, serum vb. Gibi ortam sıvılarında yakalama ve ayırma işlemleri için kullanılmaktadır. Yakalama ve ayırma işlemi öncül olarak gerçekleştirilip daha sonra hedefi algılama, manipüle etme, ölçme işlemlerinin kolayca yapılmasına olanak sağlar. Bu faydalarından dolayı tercih edilen bu parçacıkları üretilen firmalar olduğu gibi araştırma gurupları tarafından laboratuvarlarda farklı özelliklerde sentezlenebilmektedir.

Manyetik mikro/nano parçacıklar biyosensörlerde işaret algılama ve kuvvetlendirme amacı ile de kullanılmaktadır. Bu proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile manyetik etkileşim sonucu parçacıkların birbirine bağlanması irdelenmiştir. Manyetik parçacıkların topaklanma dinamikleri deneysel olarak incelenmiş ve kontrol edilebilir olduğu gösterilmiştir. Topaklanan parçacıkların görüntüleri optik mikroskop ve cep telefonu + lens sistemleri ile kayıt edilerek analiz edilmiştir. Bu görüntülerde topaklanma alan artışı ve karşılık gelen piksel sayısının artması yada görüntülerdeki kontrast artışı şeklindeki değişimler algılanmıştır.

Geliştirilen işaret artırımı tekniği biyomoleküllerin etkileşimine bağlı olmadığı için çeşitli avantajları barındırmaktadır bu bilgiler ilerleyen bölümlerde detaylı olarak açıklanacaktır.

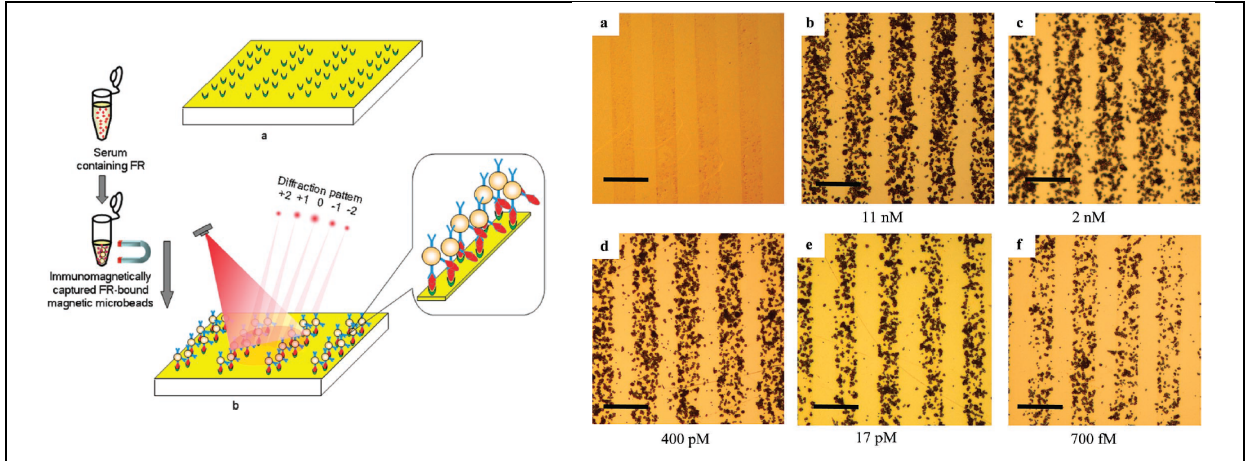
2. Literatür Özeti

Biyosensörlerde sandviç yapısı kullanarak işaret elde etme çok yaygın kullanılan bir metot olup şu an laboratuvar standardı olan ELISA gibi yöntemlerin temelini oluşturmaktadır (Mendoza et al. 1999). Şekil 1'de görülen bu yapıda amaç algılanmak istenen hedef biyomoleküle işaret elde edilebilecek başka moleküller bağlayarak hedefi tespit edilebilir hale getirmektir. Bu projede manyetik parçacıklar ve demir parçacıklar ile sandviç yapısı oluşturmak istenmektedir. Manyetik parçacıklar sahip oldukları önemli avantajlardan dolayı farklı biyomedikal ve biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır: manyetik ayırıştırma (Neuberger et al. 2005; Olsvik et al. 1994), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) (Gleich and Weizenecker 2005), gen iletimi (Plank et al. 2002). Manyetik parçacıkların tercih sebebi olmasında en önemli özellikler 1) Manyetik parçacıkların dışardan manyetik alan uygulanarak hareketleri kontrol edilebilir 2) Manyetik parçacıklar farklı biyomoleküller ile kaplanarak başka biyomoleküllere bağlanabilir ve biyo-uyumlu hale getirilebilir 3) Boyutları kontrol edilerek uygulamalara özel üretilmeleri mümkündür (Pankhurst et al. 2003). Bu avantajların gösterildiği bir uygulamada laminin kaplı 10 um çaplı manyetik parçacıklar tek bir kalp miyosit hücresine bağlanarak bu hücrenin kasılma gücü ölçülmüştür. Bu ölçüm için sabit bir manyetin uzaklığı değiştirilerek manyetik alanın şiddeti ayarlanmıştır (Yin et al. 2005). Biyo-algılayıcılarda manyetik parçacıklar kullanarak biyomoleküler algılamada hassasiyeti arttırmanın mümkün olduğu (Osaka et al. 2006) tarafından gösterilmiştir (Şekil 2). Bu çalışmada magnetite çekirdek fonksiyonel hale getirilerek biotin bağlanmıştır. Hedef molekül olarak streptavidin seçilmiş yüzeye sabitlenen biotin molekülleri ile sandviç yapısı oluşturulmuştur. Manyetik parçacıkların kullanıldığı gıda maddelerindeki zararlı kalıntıların tespitine örnek bir çalışmada (Zacco et al. 2006) atrazine (bitki öldürücü) maddesinin portakal suyundaki miktarını tespit etmiştir. Manyetik parçacıkların aynı zamanda mikroakışkan çiplerde (Suzuki, Ho, and Kasagi 2004) ve kanser hücrelerinin ürettiği proteinlerin algılanmasında (Lee et al. 2010) kullanıldığı örnekler bize bu parçacıkların biyo-algılayıcılardaki potansiyelini göstermektedir.



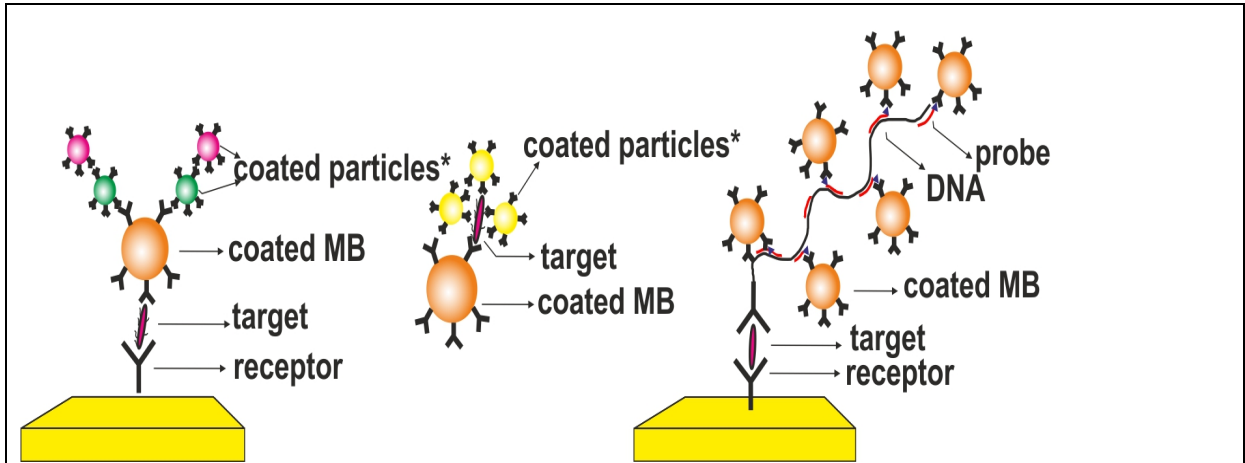
Manyetik parçacıkların kullanıldığı biyoçiplerde optik mikroskoplar, CCD kameralar (Osaka et al. 2006) lazer ile algılama (Lee et al. 2010) ve SPR (Teramura, Arima, and Iwata 2006) gibi teknikler kullanılmaktadır.

Literatürde manyetik parçacıkların kullanıldığı ve sandviç yapısının oluşturulduğu biyosensör uygulamaları mevcuttur. Bunun için algılayıcı reseptörler yüzeylere sabitlenir. Mikro-kontakt basım tekniği manyetik parçacıkların kullanıldığı basit ve hassas ölçümler elde etmeyi sağlayan bir teknik olarak kalp hastalıklarında belirteç olan S-adenosyl homosistine proteini ve kanser belirteci folate reseptörü (FR) gibi farklı hedef moleküllerin tespitinde kullanılmıştır (Acharya et al. 2007, 2008). Şekil 3'de gösterildiği üzere önce yüzeylere reseptörler mikro-kontakt basım tekniği ile düzgün aralıklı çizgiler şeklinde yerleştirilmiştir. Eş zamanlı olarak manyetik parçacıklar hedef molekülleri yakalama, ayırma ve yüzeye getirme işlemlerini gerçekleştirmiş yüzeyde sandviç yapısını oluşturmuştur.



Şekil 3. Yüzeyle reseptör olarak F-BSA molekülü mikro-kontak basım tekniği ile yerleştirilmiştir. Folat reseptör antikorları ile kaplanmış manyetik parçacıklar hedef molekülü yakalama ve ayırma işlemlerinden sonra yüze eklenerek sandviç yapısı oluşturulmuştur. Lazer kırınım tabanlı ölçümler ile FR ün konsantrasyon değişimine göre manyetik parçacık yoğunluğundaki farklar tespit edilmiştir (Acharya et al. 2007).

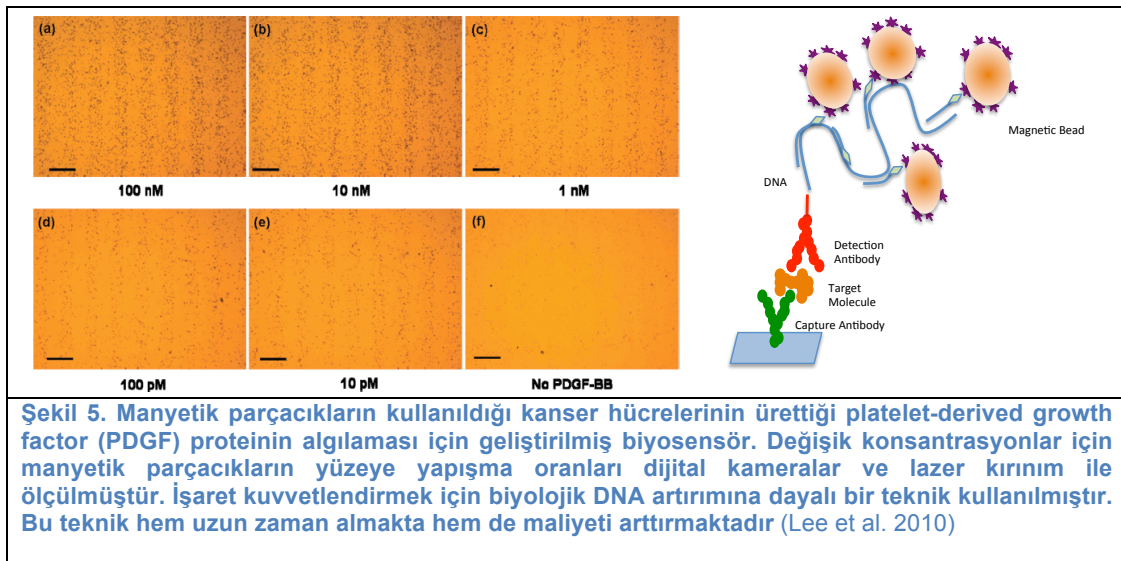
Manyetik parçacıkların kullanıldığı biyosensörlerde işaret artırımı için farklı metotlar geliştirilmiştir. Genellikle biyomoleküllerin etkileşerek birbirine bağlanması esasına dayanan bu metotlar için ortamın sıcaklığı, pH değeri kontrol edilmelidir. Hedef moleküle bağlanan etiket sayısını artırmak yada etikete bağlanan farklı etiketler kullanmak yada hedef üzerinde bağlanma yüzeylerini arttırmak gibi stratejiler elde edilen işareti arttırmak için kullanılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Biyosensörlerde manyetik parçacıkların kullanıldığı farklı işaret kuvvetlendirme teknikleri, solda hedef (target), biyomoleküller ile kaplı manyetik parçacık (coated MB) ve diğer biyomoleküller ile kaplı parçacıklar bulunmaktadır (Malhotra et al. 2012), ortada hedef moleküle bağlı manyetik parçacık ve altın nanoparçacıklar bulunmaktadır (Almeida et al. 2013), sağda hedef moleküle bağlanan ikincil molekül yardımıyla yüzey alanı artırılmış ve daha fazla manyetik parçacığın bağlanması sağlanmıştır (Lee et al. 2010).

Daha önceki çalışmamızda (Lee et al. 2010) platelet-derived growth factor (PDGF) proteinini tespit etmek için geliştirdiğimiz yöntemde Rolling circle amplification (RCA) yöntemi kullanarak biyolojik olarak işareti kuvvetlendirmeyi gerçekleştirdik (Şekil 5). Ortama eklenen

enzimler ve oligonükleitler sıcaklığın kontrol edildiği bir ortamda uzun DNA parçaları oluşturur ve manyetik parçacıklar için bağlanma yüzeyleri meydana getirir. Hedef molekülün –PDGF-konsantrasyonu değiştirilerek picomolar seviyesinde hassasiyetle tespiti mümkün olduğu görülmüştür. Bu hassasiyeti RCA olmadan sadece hedef moleküle bağlanacak manyetik parçacıklar ile elde etmenin mümkün olmadığı RCA kullanılmayan durum ile RCA kullanılan durum karşılaştırılarak gösterilmiştir. Bu metot için önce altın yüzey üzerine aptamerler yerleştirilmiş, daha sonra RCA gerçekleştirilmiş en son aşamada da mikroskoptan alınan kamera görüntüsü ve kırınım tabanlı lazer yansımaları ile işaret algılanmıştır. Kırınım tabanlı lazer yansıması altın yüzey ile manyetik parçacıklar arasındaki yükseklik farkının neden olduğu kırınımın oluşturduğu parlaklık farkının fotodiyotlar ile ölçülmesi esasına dayanır. Lazerin kullanılması hassas ölçümü sağlarken teçhizat maliyetini arttırmaktadır. Önerdiğimiz bu proje ile gerçekleştireceğimiz teknik lazere gereksinimi ortadan kaldırıp sadece kamera görüntüleri ile algılamayı mümkün kılabilir ki bu da daha önce bahsettiğimiz mobil teknolojilerin kullanıldığı son derece portatif, maliyeti düşük ve kolay bir algılama metodu olur. Projede ki ilk hedef önerdiğimiz işaret kuvvetlendirme tekniğini uygulamak, ikinci hedef ise bu tekniğin ucuz ve basit kameralar ile görüntü kayıt etme ve işleme sistemleri ile beraber çalıştığında hassasiyet azalması olmadan algılamanın mümkün olduğunu göstermektir. Benzer sistemlerde manyetik parçacıkların sayısının artırılması işareti kuvvetlendirmek için başvurulan ilk metot olmakla beraber gerçekleştirilmesi biyokimyasal reaksiyonlara gereksinim duyulduğundan her durumda mümkün olmamaktadır. Ayrıca bu biyokimyasal reaksiyonlar için ekstra biyomoleküllere ihtiyaç olup (Teramura et al. 2006) bu durum maliyeti arttırmakta ve gene manyetik parçalar kullanıldığı için algılama limitinin tespitini zorlaştırmaktadır. Bu projede geliştirilecek yöntem bu dezavantajları ortadan kaldıracak potansiyelindedir.



3. Gereç ve Yöntem

Manyetik parçacıkların kullanıldığı biyosensörlerde işaret artırımı için manyetik etkileşim tabanlı yeni bir metot geliştirmek amacıyla başladığımız çalışmalarda biyomoleküllerin etkileşimine dayanan bağlanmaları en aza indirgeyerek maliyeti düşürmek, kısa sürede uygulanabilen ve sıcaklık, pH gibi ortam koşullarından etkilenmeyen kuvvetlendirme yöntemi geliştirmiştir. Manyetik etkileşim ile manyetik parçacıkların topaklanması ve bu topaklanma ile artan hacim/alan/kütlenin/kontrastın işaret artırımına neden olabileceğini göstermek ve analiz etmektir. Manyetik topaklanmanın mekanizmasını daha iyi anlayabilmek için ilk olarak teorik analiz yapılmıştır.

Teorik Analiz:

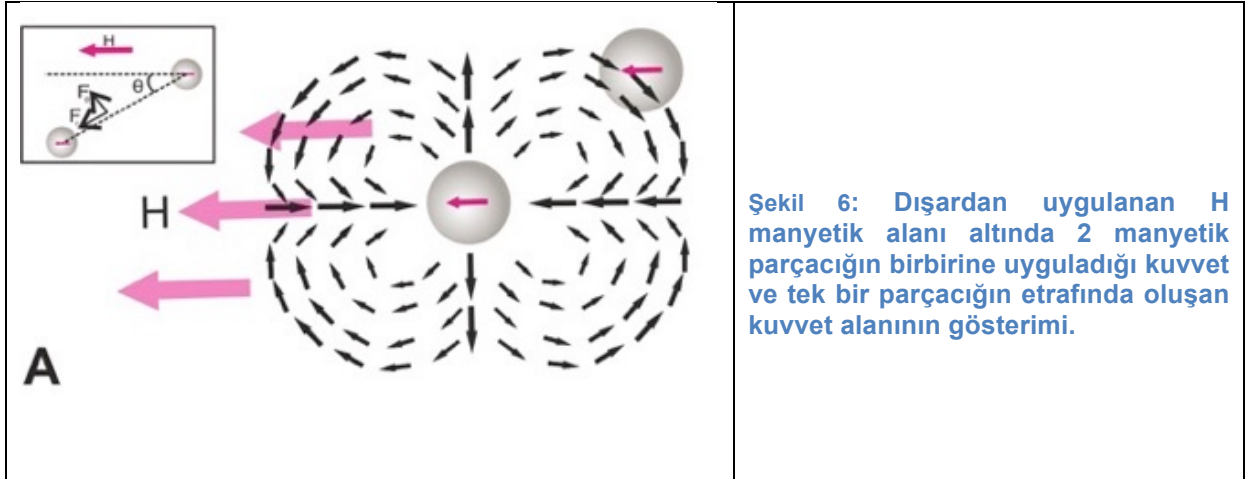
Manyetik alana maruz bırakılan manyetik parçacıklar üzerinde manyetik dipoller oluşur. Bu dipol-dipol etkileşimi ile parçacıklar birbirine kuvvet uygular. Bu kuvvetler literatürde manyetik filtreleme ve ayırma çalışmalarında incelenmiş olup eşitlik (1) ve (2) de verilmiştir (van Kleef et al. 1983; Lu, Pugh, and Forssberg 2005).

$$F_r \approx -\frac{2\pi\chi^2 B^2 a^3 b^3}{3\mu_0 R^4} (1 + 3\cos 2\theta) \quad (1)$$

$$F_\theta \approx -\frac{4\pi\chi^2 B^2 a^3 b^3}{3\mu_0 R^4} \sin 2\theta \quad (2)$$

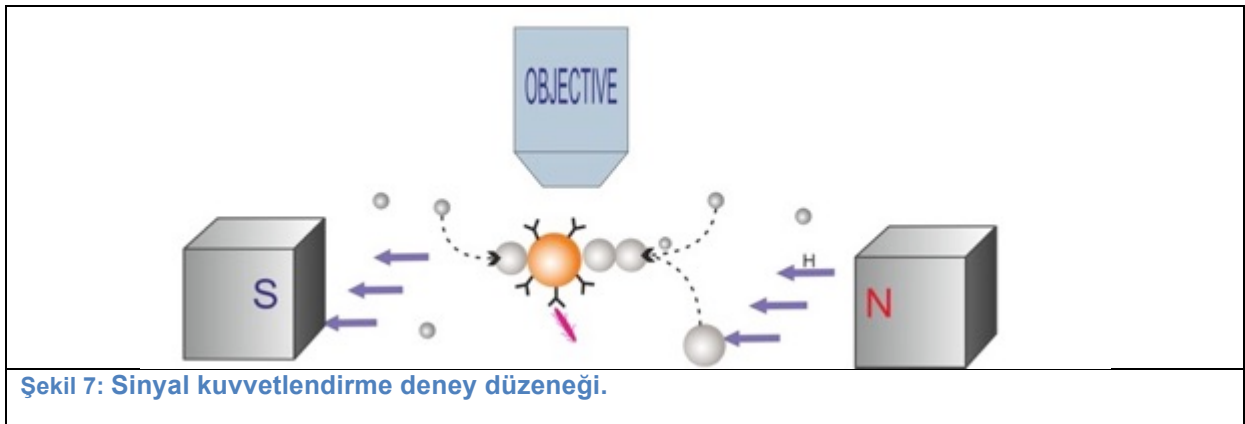
Her bir manyetik parçacık, manyetik alan etkisinde bulunduğu etrafında bir kuvvet alanı oluşturmaktadır. Bu kuvvet alanını eşitlik 1 ve 2 de belirtilen F_r ve F_θ kuvvetleri oluşturmaktadır.

Tek bir parçacığın diğer parçacığa uyguladığı kuvvet küresel koordinat sisteminde iki parçacık arasındaki mesafe ve açığa bağlı bileşenlerden oluşmaktadır ve şekil 6'da temsili olarak gösterilmiştir. Eşitlik 1 ve 2 incelendiğinde iki parçacık arasındaki manyetik kuvvetin, manyetik alana (B), parçacık yarıçaplarına (a, b), aradaki mesafeye (R), parçacık malzemesinin manyetik alan duyarlılığına (χ), parçacıklar arasındaki açığa (θ) bağlı olduğu görülmektedir.



Şekil 6: Dışardan uygulanan H manyetik alanı altında 2 manyetik parçacığın birbirine uyguladığı kuvvet ve tek bir parçacığın etrafında oluşan kuvvet alanının gösterimi.

Eşitlik 1 ve 2 manyetik topaklanma dinamikleri hakkında teorik olarak bilgi verirken, deneysel olarak sağlaması yapılmalıdır. Hem teoriğin pratikle ne kadar uyumlu olduğunu belirlemek hem de ayırıştırma ve filtreleme için kullanılan formüllerin benzer ama biraz farklı bir uygulamada nasıl sonuç vereceğini irdellemek için deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için tasarlanan deney düzeneği şekil 7’de gösterilmiştir. Bu deney düzeneğinde sabit mıknatıslar ile oluşturulan manyetik alan içerisinde manyetik parçacıkların topaklanma dinamikleri optik mikroskop yardımıyla kayıt edilen görüntüler ve videolar yardımıyla incelenebilmektedir.



Şekil 7: Sinyal kuvvetlendirme deney düzeneği.

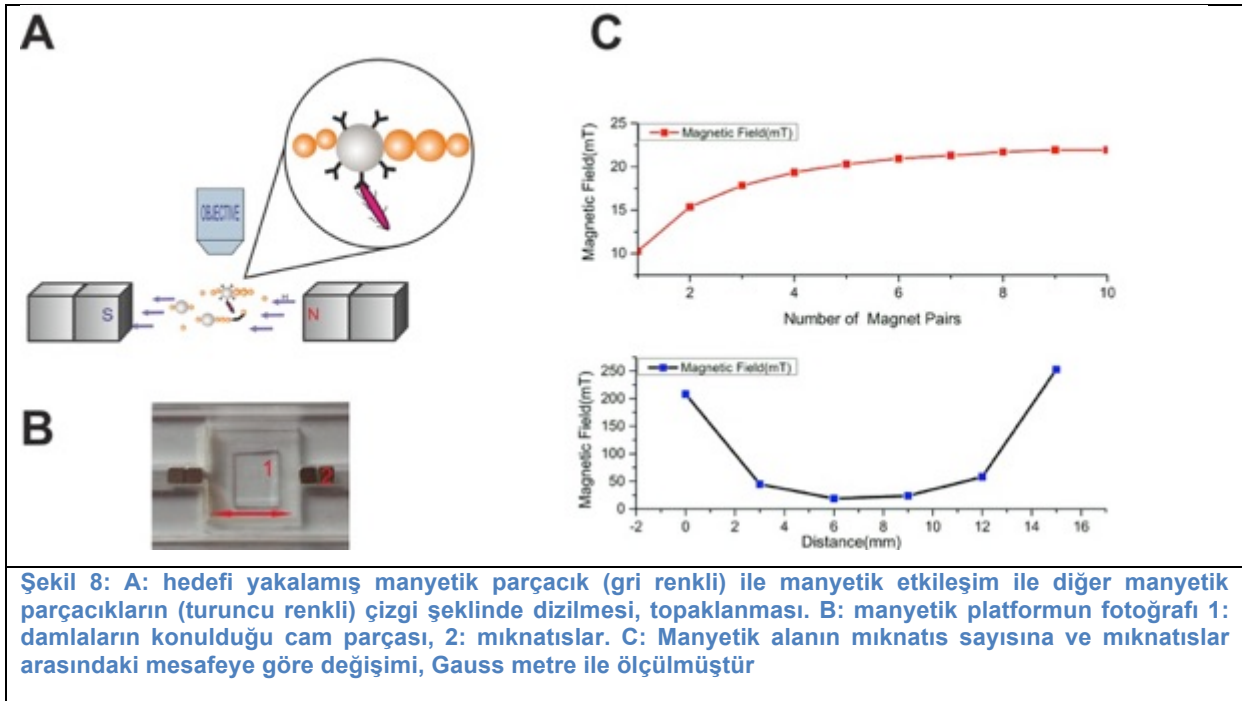
Şekil 7’de görülen turuncu renkli manyetik parçacık biyomoleküller ile kaplı olup pembe renkli hedef molekülü doğal ortamında yakalamak ve ayırmak görevini yerine getirmektedir. Gri renkli manyetik parçacıklar ise herhangi bir biyomolekül ile kaplı olmayıp manyetik etkileşim neticesinde turuncu manyetik parçacık etrafında topaklanmakta ve kayıt edilen görüntüde tek bir turuncu manyetik parçacık yerine topaklanmış bir kütle oluşmasını sağlamaktadır (renkler temsili verilmiştir). Böylece hedef molekülden alınan görüntü işaretinde topaklanma nedeni ile hacim/alan artması meydana gelmektedir.

Deneysel olarak kullanılan konsantrasyonlar ve miktarları belirlemek için bir çok öncül deney sonucu değerlendirilmiş ve parametreler optimize edilmiştir. Ferromanyetik ve paramanyetik

parçacıklar için 0.244 mg/mL konsantrasyon, superparamanyetik parçacıklar için 0.067 mg/mL konsantrasyon ve miktar olarak 2 μ L damlalar deney düzeneğine eklenmiştir. Sonuçları verilen deneyler optimize edildikten sonra 6 kere platformun orta noktası etrafında 4 bölgeden alınan görüntülerin işlenmesi yöntemiyle verilerin toplanması gerçekleştirilmiştir. İstatiksel analiz olarak T-test ve ANOVA testleri kullanılmıştır.

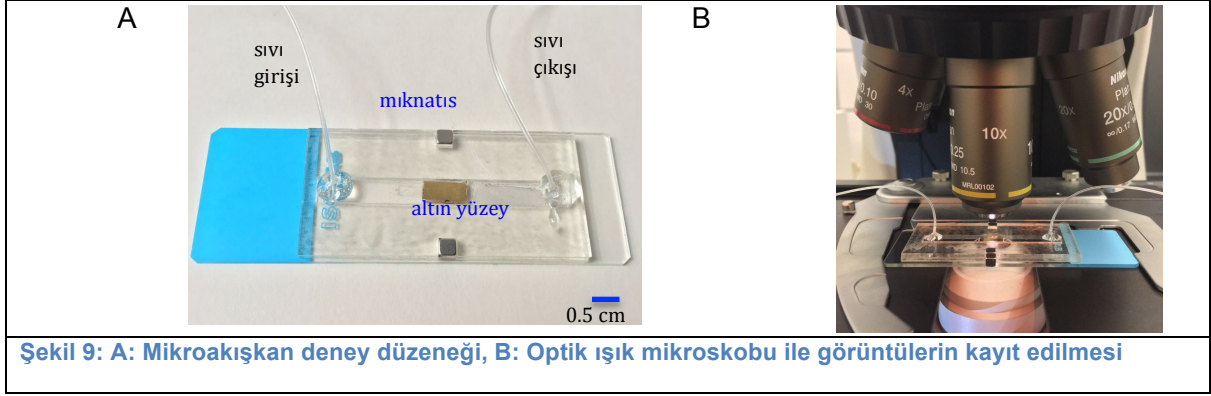
3.1 Deney platformunun karakterize edilmesi

Deneyler için hazırlanan platformun içinde mıknatıslar ile oluşturulan manyetik alanın karakterize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle poly methyl methacrylate (PMMA) malzeme kullanılarak oluşturulan platform içine mıknatıslar yerleştirilmiş ve aralarındaki manyetik alan Gauss metre ile ölçülmüştür (Şekil 8).



Bu deney düzeneğinde manyetik alanı arttırmak için yeni mıknatıslar eklenebilir yada mıknatısların arasındaki mesafe kısaltılabilir. Şekil 8B'de gösterilen platform için kırmızı ok 1.5 cm uzunluğu göstermektedir, manyetik alan iki mıknatısın arasında orta noktada azalmakla beraber daha standart bir değere ulaşmaktadır. Bu yüzden olabildiğince orta noktada deneyler yapılmıştır.

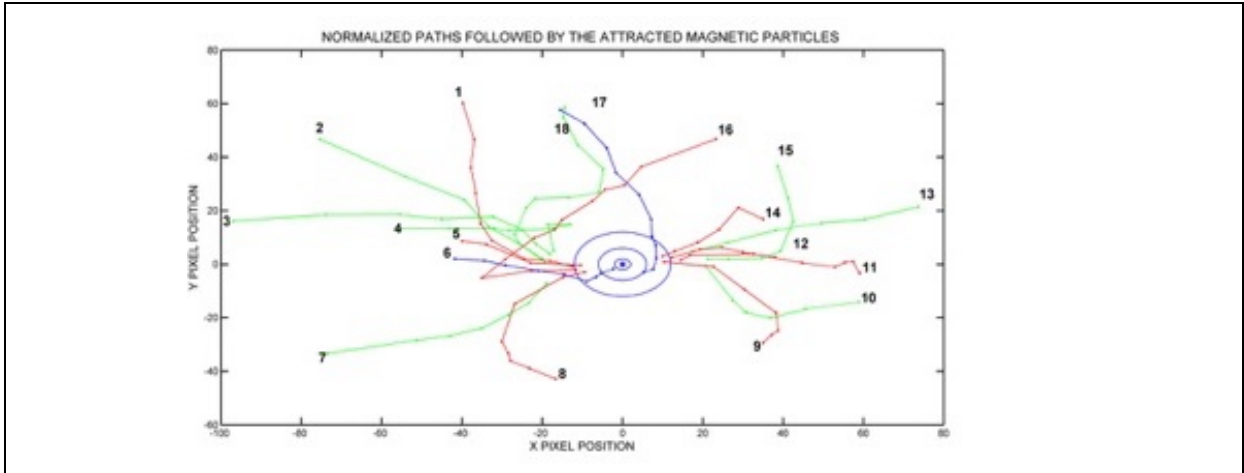
Ayrıca altın yüzeylere sabitlenmiş yüzey reseptörlerine bağlanma ve işaret kuvvetlendirme deneyleri için farklı manyetik platformlar yapılmıştır. Standart mikroskop lamı üzerinde akrilik malzemedeki katman-katman oluşturulan kapalı yapılara mikro akışkan tüpler bağlanarak sıvı girişi ve çıkışı kontrol edilmiştir. Böylece sıvı akışı sağlanarak altın yüzeyin üzerinde toplanma düzeyleri mikroskop yardımıyla kayıt edilen görüntülerden ölçülmüştür.



4. Bulgular

4.1 Parçacıklar arasındaki açı (θ)'nın etkisinin incelenmesi

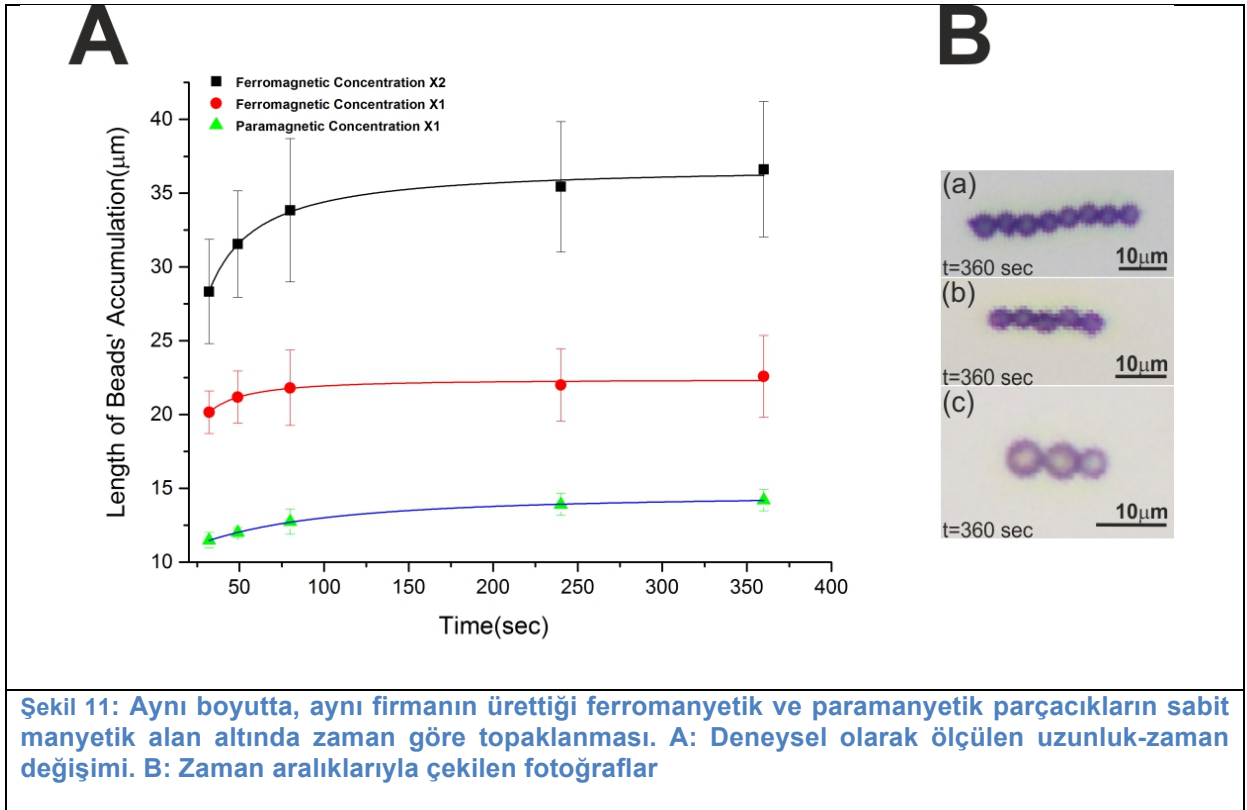
Eşitlik 1 ve 2 parçacıklar arasındaki açıya θ 'ya bağlı olup $\theta=90$ ve 270 derece olduğu zaman itme kuvveti, diğer durumlarda ise çekme kuvveti şeklinde etki etmektedir ve şekil 10'daki kuvvet alan çizgilerinin yönünü θ açısı belirlemektedir. Deneysel olarak θ 'nın incelenmesi için farklı boyuttaki ferromanyetik parçacıklar manyetik platformdaki cam parçasının üzerine konmuş daha sonra da aynı boyuttaki manyetik parçacıklar ilave edilirken parçacıkların manyetik alan varken ki etkileşimli hareketleri video kaydına alınmıştır. Bu kayıtlar daha sonra görüntü analiz programı ile incelenerek parçacık çiftlerinin hareket yörüngeleri çıkarılmıştır (Şekil 10). Aynı boyutta parçacık çiftlerinin hareketinin incelenmesi ile görülmüştür ki parçacıklar birbirine $\theta=0$ veya 180 derece olan manyetik alan çizgisine paralel noktalarda bağlanmaktadır. 4 ve 18 no'lu yörüngelerde görüldüğü üzere $\theta=90$ olarak yaklaşan manyetik parçacık itilmekte daha sonra $\theta=0$ veya 180 derece olan yerlere yönelmektedir



Şekil 10: Normalize edilmiş manyetik parçacık hareket yörüngeleri, sabit parçacık merkezde olacak şekilde mavi renk $2 \mu\text{m}$, yeşil renk $4 \mu\text{m}$ ve kırmızı renk $8 \mu\text{m}$ boyutlarındaki manyetik parçacıkların hareketlerini göstermektedir.

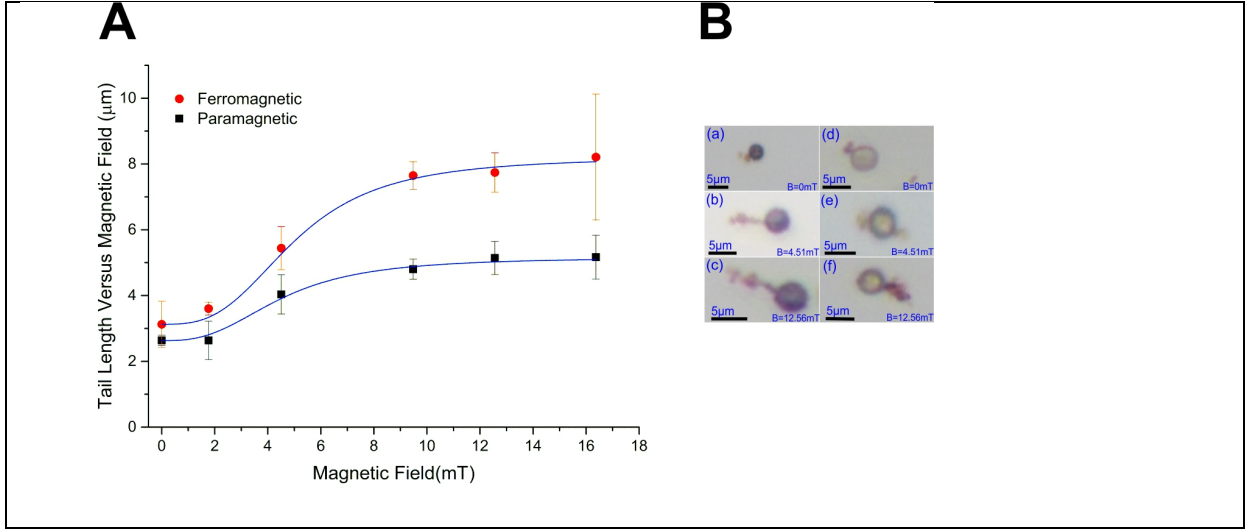
4.2 Parçacık malzemesinin manyetik alan duyarlılığının (χ) topaklanmaya etkisinin incelenmesi

Yapılış malzemesine göre ferromanyetik yada paramanyetik özellik gösteren manyetik parçacıkların manyetik alan etkisinde topaklanma dinamiklerinin zamana göre karşılaştırılarak incelenmesi için aynı üreticiden, aynı boyutta temin edilen ferromanyetik ve paramanyetik parçacıklar manyetik platforma yerleştirildi. Uygulanan sabit manyetik alan altında zaman göre topaklanma bu durumda zincir oluşturma özellikleri incelendi (şekil 11). Ferromanyetik parçacıkların sahip oldukları yüksek manyetik duyarlılıktan dolayı paramanyetik parçacıklara göre daha uzun zincirler meydana getirdiği yapılan ölçümler sonucunda gözlenmiştir.



4.3 Manyetik Alan Şiddetinin Topaklanmaya Etkisi

Ferromanyetik / Paramanyetik boncukların manyetik alan etkisinde topaklanma dinamiklerinin manyetik alana göre karşılaştırılması için aynı boyutta paramanyetik yada ferromanyetik parçacıkların olduğu ortama 1 µm boyutlu superparamanyetik parçacıklar eklenmiştir. Superparamanyetik parçacıkların oluşturduğu topaklanma uzunlukları ölçülerek karşılaştırılmıştır (Şekil 12).

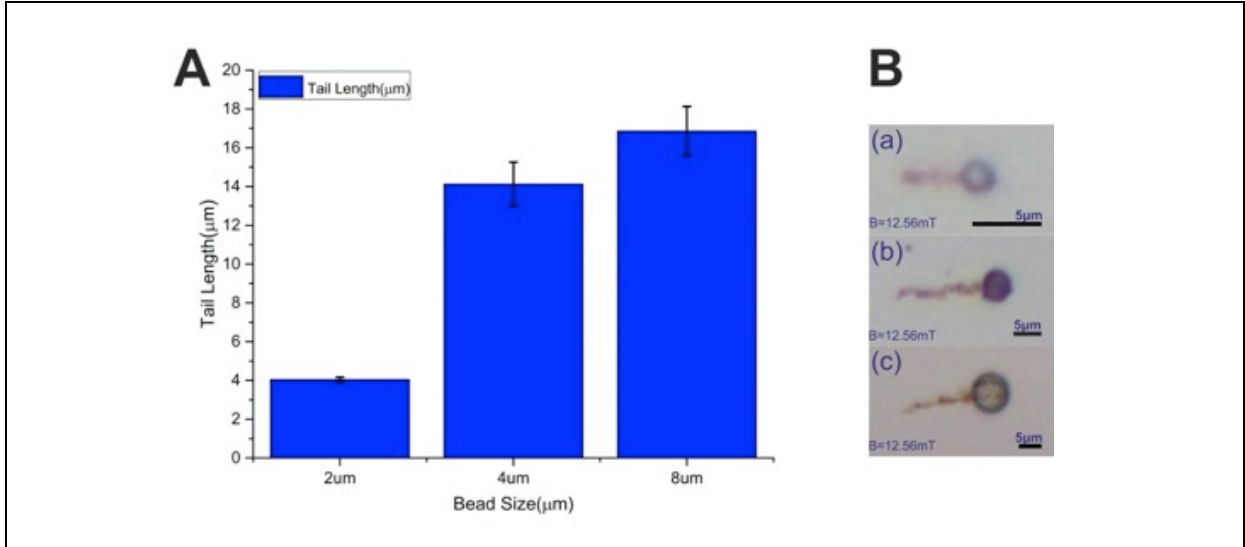


Şekil 12: Manyetik alan şiddetinin topaklanmaya olan etkisinin incelenmesi A: Deneysel olarak elde edilen topaklanma kuyruk uzunluğu-uygulanan manyetik alan şiddeti grafiği, B: Optik mikroskop görüntüleri

Bu amaçla manyetik platformdaki mıknatıs çiftlerin sayısı artırılarak yada aralarındaki mesafe değiştirilerek (farklı platformlar üretilerek) manyetik alanın şiddeti değiştirilmiştir. Aynı konsantrasyonlar, boyutlar için ferromanyetik ve paramanyetik parçacıklar etrafında topaklanan superparamanyetik parçacıkların uzunlukları yaklaşık 8 mT' dan sonra doyuma ulaşmakta 18 mT' dan sonra da parçacıklar manyetik alanın etkisinde mıknatıslara doğru hareket etmektedirler. Bu yüzden bu değerden yüksek değerlerde sağlıklı ölçüm yapmak mümkün olamamaktadır. Görüldüğü üzere manyetik alanın artırılması ile topaklanma uzunluğu artmaktadır ve kontrolü mümkündür. Ferromanyetik parçacıklar aynı manyetik alan altında daha yüksek topaklanmalara sahip olabilmektedir.

4.4 Manyetik parçacık boyutunun topaklanmaya olan etkisinin incelenmesi

Eşitlik 1 ve 2 de görüldüğü üzere teorik olarak manyetik etkileşim altındaki manyetik parçacıkların boyutları birbirlerine uyguladıkları kuvvetlere 3 dereceden etki etmektedir. Bu durumun incelenmesi için yapılan deneylerde aynı üreticiden aynı malzemeler ile yapılmış farklı boyuttaki manyetik parçacıklar manyetik platforma yerleştirilmiş, sabit manyetik alan altında eklenen 1 μm boyutlu superparamanyetik parçacıkların oluşturduğu zincirlerin uzunlukları ölçülmüştür (Şekil 13).

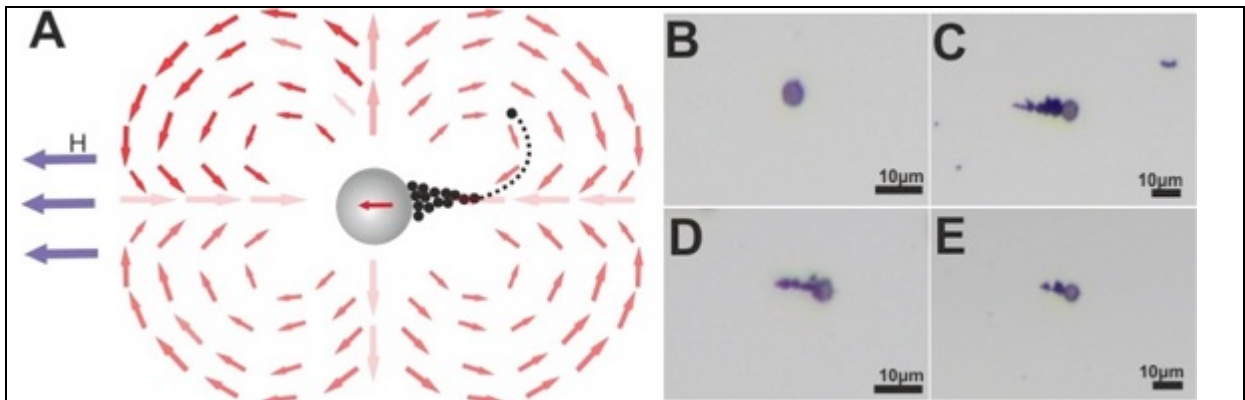


Şekil 13: Manyetik parçacık boyutunun zincir uzunluğuna etkisinin incelenmesi A: Deney sonuçlarıyla elde edilen farklı boyuttaki manyetik parçacıkların karşılaştırılması B: Manyetik parçacıkların ve kuyruklarının optik mikroskop görüntüleri

Teorik olarak daha yüksek kuvvet uygulanması 3 dereceden fark olması beklenirken deneysel olarak bu kadar fark çıkmamıştır. Bu durumun da manyetik parçacıkların ideal olmayan yapılarından, ortamda etki eden yerçekimi kuvveti, sıvı ortamda yüzey sürtünmeleri, manyetik parçacıkların ortam içerisinde her yerde aynı dağılmaması gibi nedenlerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında beklendiği gibi büyük parçacıkların daha uzun kuyruklara sahip olduğu deneyler sonucunda gözlemlenmiştir.

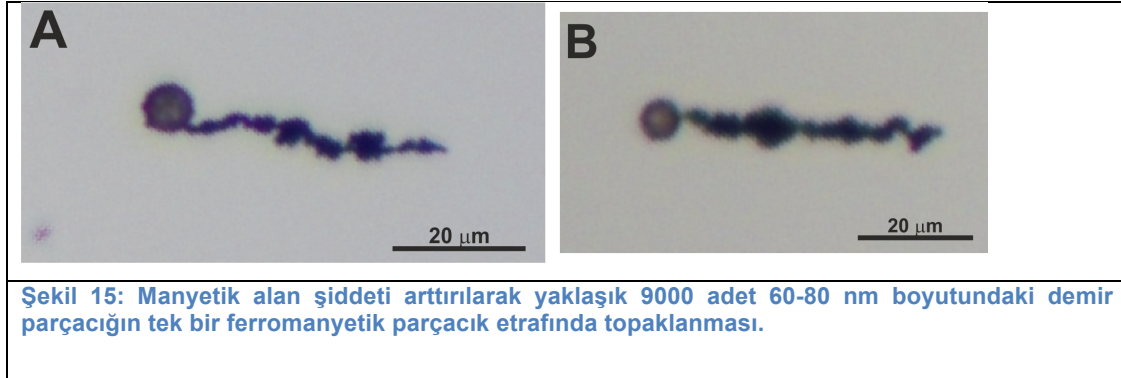
4.5 Demir Nano Parçacık Deneyleri

Demir parçacıklar süperparamanyetik olarak piyasada bulunan parçacıklara göre çok daha ucuza satılmaktadır. Hem fiyat avantajından hem de 60-80 nm boyutlarındaki parçacıkların topaklanmasını incelemek için demir nano parçacıklar ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Manyetik alan altındaki ferromanyetik parçacıkların bulunduğu manyetik platforma demir nano parçacıklar eklenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14: Demir nano parçacık deneyleri. A: Manyetik alan altında demir nano parçacıkların manyetik parçacık etrafında topaklanmasını gösteren çizim B: kontrol deneyi, C,D,E: demir nano parçacıkların oluşturduğu topaklanmaların optik mikroskop ile elde edilen görüntüleri.

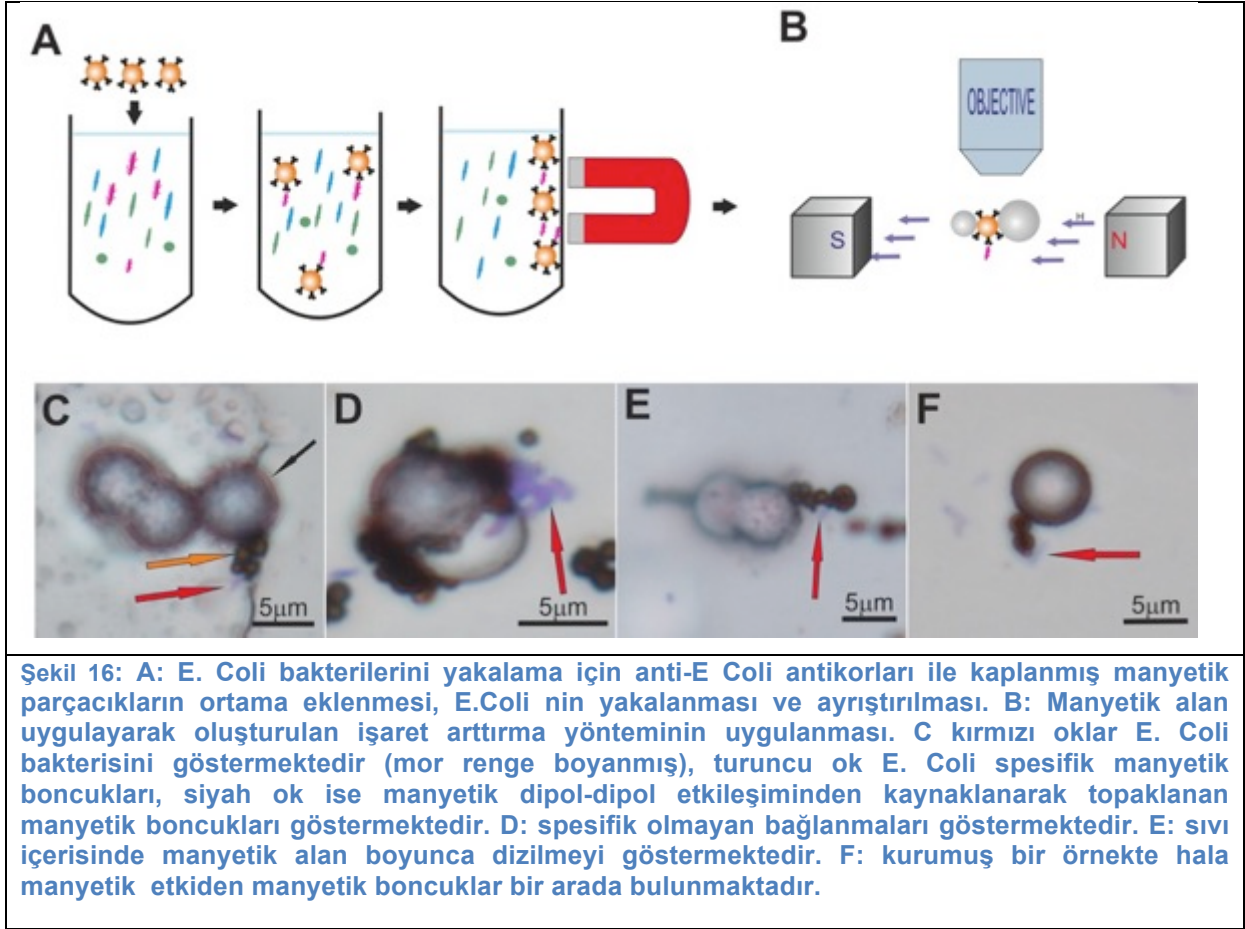
Kontrol deneyinde manyetik alan altında hiç demir parçacık yokken ki durum gözlenmiştir. Eklenen demir parçacıkların topaklanması sadece uzunluk ölçülerek değil görüntülerdeki alanlar ölçülerek hesaplanmıştır. Topaklanmadan kaynaklı piksellere karşılık gelen alan artışı 2-3 kat olarak tespit edilmiştir. Üreticinin boyut bilgisi temel alındığında ortalama 7000 adet 60-80 nm boyutundaki demir parçacığın tek bir ferromanyetik parçacık etrafında topaklandığı deneysel olarak gösterilmiştir. Topaklanmayı kontrol etmek için manyetik alan şiddeti artırılmış ve daha fazla parçacığın birbirine bağlandığı ölçülerek gözlenmiştir (Şekil 15).



Nano parçacıkların adedinin belirlenmesinde görüntülerden alan ölçümleri gerçekleştirilmiş, parçacıkların boyutu ortalama 70 nm kabul edilerek tek bir düzlem üzerinde oldukları varsayılmıştır. Gerçekte ise daha fazla taneciğin topaklandığı kabul edilebilir, bu durum ise geliştirilen metot açısından daha fazla parçacık topaklanması hedefi ile çelişmemektedir.

4.6 Bakteri üzerine gerçekleştirilen deneyler

Sinyal kuvvetlendirme metodunun potansiyelini göstermek için araştırma planında yer alan 4. iş paketinde bahsedilen tasarlanan yeni deneyler kapsamında gerçekleştirilen E. Coli bakterisini yakalamak, ayırmak ve işaret artırımı için yapılan deneyler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneyler şekil 16'da gösterilmiştir. Burada amaç standart gıda analiz laboratuvarlarında kullanılan manyetik parçacıklar ile ayırma işlemine bu projede önerilen işaret artırma yönteminin uygulanabileceğini göstermektir. Bu amaçla ilk olarak E. Coli bakterileri içeren ortama anti-E.Coli antikorları kaplı manyetik parçacıklar eklenmiştir. Uygun karıştırma ve bekleme sürelerinden sonra dışardan uygulanan manyetik alan ile yakalanmış bakteriler ortamdaki ayrıştırılmıştır. Bu aşamalar ISO tarafından belirlenmiş standart adımlardır ve gıda analiz laboratuvarlarında sıklıkla yerine getirilmektedir. Bakteriler optik mikroskop altında kolaylıkla görüntülenemeyecek olmalarından dolayı mor renkli boya ile standart dışı boyanmıştır. Boyanan bakterileri yakalamış anti-E.Coli parçacıklar projede geliştirdiğimiz yöntem uygun olarak manyetik alan altında manyetik parçacıkların eklenmesi ile topaklanma gerçekleştirmiştir.



Bakteri deneylerinde ulaşılan kuvvetlendirmenin özeti tablo 1 de gösterilmektedir.

Tablo 1: Bakteri deneyleri sonucunda ölçülen piksel alanları ve hesaplanan normalize kuvvetlendirme oranları

	Ortalama Piksel alanları	Normalize kuvvetlendirme oranları
E. Coli	1911	1
Anti E. Coli Parçacık	7335	3.8
Kaplanmamış manyetik parçacık	81510	42.6

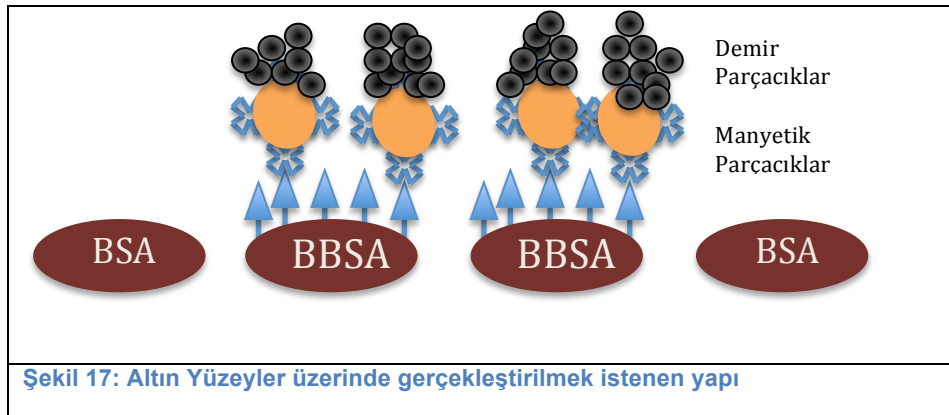
Görüldüğü üzere 40 kat alan artışı toplanma sayesinde elde edilebilmektedir. E. Coli deneyleri standart algılama deneyleri olmayıp sadece yöntemin uygulanabilir olduğunu ve potansiyeli göstermek için gerçekleştirilmiştir, standart hale getirilmesi işi başka bir projenin konusu olabilecek kapsamdadır.

Gerçekleştirilen deneyler ve teorik analiz göstermiştir ki manyetik toplanma temelli işaret artırımı gerçekleştirmek mümkündür ve bilgimize göre daha önce yapılmamıştır.

Topaklanmaya etki eden parametreler deneysel olarak irdelenmiş uygulamalar için gerekli bilgi alt yapısı oluşturulmuştur. Kullanılan manyetik parçacıkların boyutu ve miktarına göre farklı kuvvetlendirme oranlarına ulaşmak mümkündür. Daha önce gerçekleştirdiğimiz RCA kuvvetlendirme yöntemi 4-5 kat kuvvetlendirme elde etmek için fazladan 5 biyomolekül kullanması 37 °C ve 95 °C sıcaklık kontrolünün gerçekleştirilmek zorunda olması gibi nedenlerden dolayı bu projede geliştirdiğimiz metot ile kıyaslandığında manyetik topaklanma temelli işaret kuvvetlendirmenin sıcaklık kontrolü gerektirmediği, pahalı biyomoleküllere gereksinim duymaması ve kısa sürede uygulanabilir olması nedeniyle çok daha avantajlı olduğu görülmektedir (Lee et al. 2010).

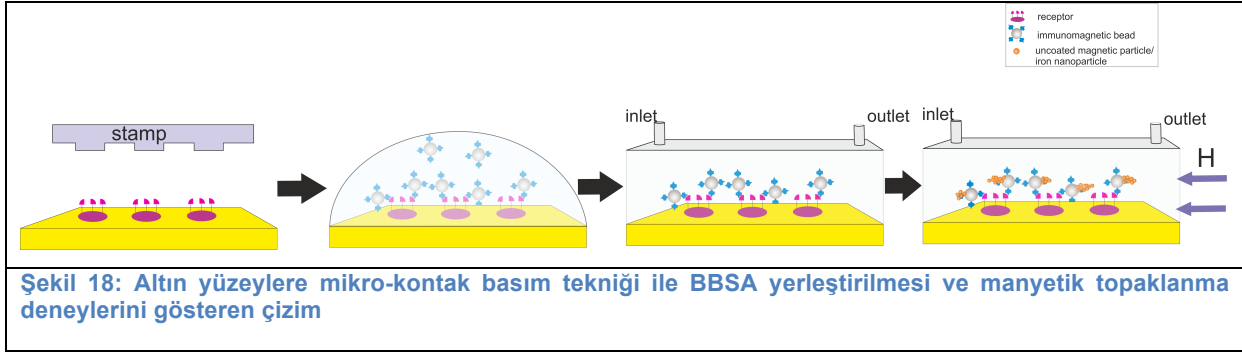
4.7 Altın Yüzeylerde Gerçekleştirilen Deneyler

Altın yüzeylerde gerçekleştirilmek istenen yapı şekil 17’de görülmektedir. Demir parçacıklar manyetik alan altında manyetik parçacıklar ile dipol-dipol etkileşimi gösterecek ve manyetik olarak bağlanacaktır. Topaklanma kayıt edilen görüntülerde alan artışı, kontrast değişimi gibi ölçülebilir parametreler yardımıyla algılanabilecektir.

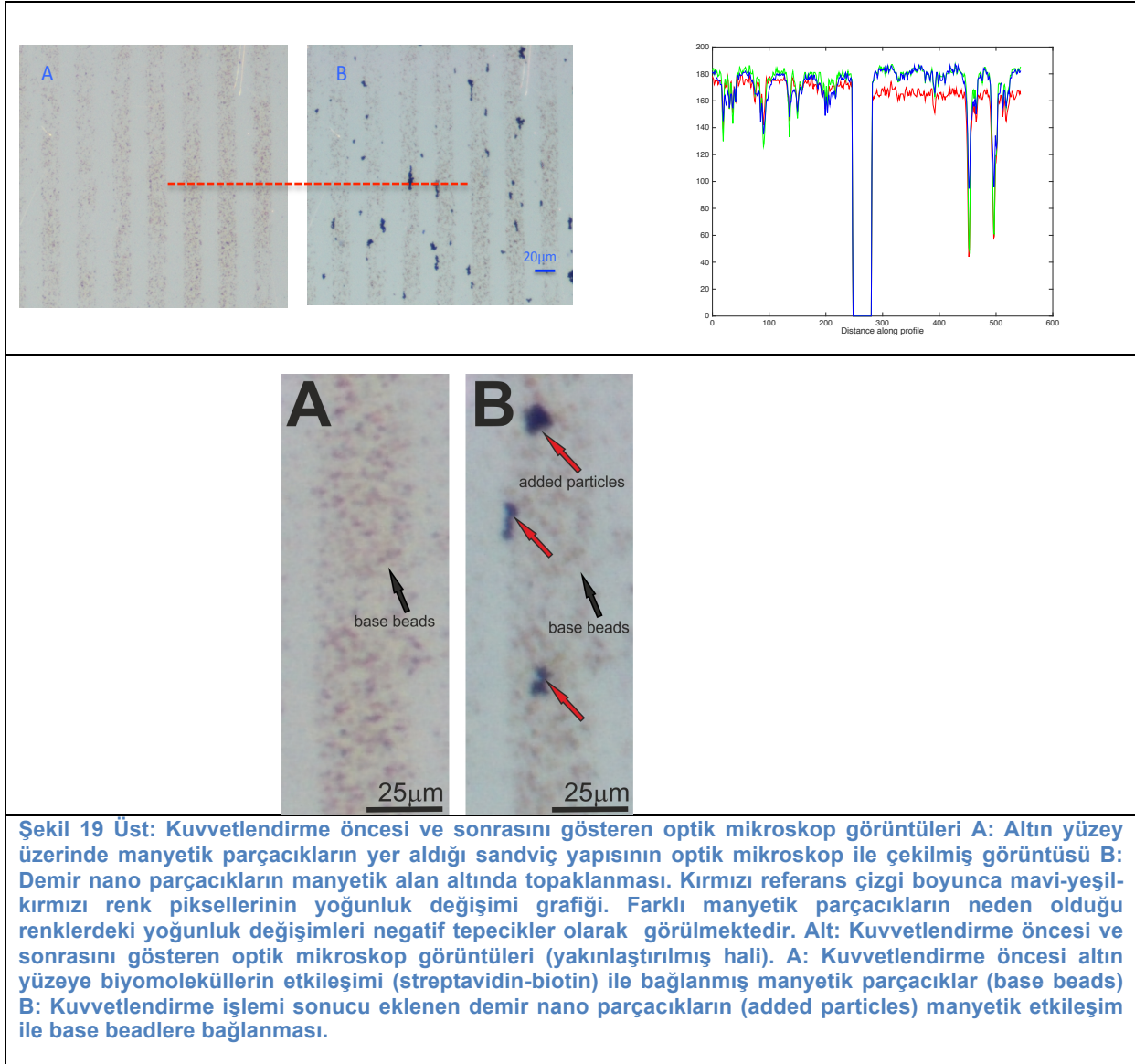


Algılayıcı reseptörleri yüzeylere sabitlemenin farklı yolları mevcuttur. Kolay uygulanabilir olması ve reseptörleri kararlı şekilde yüzeye sabitleyebilmesinden dolayı mikro-kontak basım tekniği tercih edilmiştir. Bu teknikte mikro-üretim teknikleri ile şekillendirilen polydimethylsiloxane (PDMS) damga (stamp) olarak kullanılmıştır. Mikro-kontak basım tekniği ile altın yüzeylere Biotinli Bovine Serum Albumin (BBSA) reseptör olarak sabitlenmiştir (Şekil 18). Kontrol yüzeyleri ise Bovine Serum Albumin (BSA) ile pasifize edilmiştir. Daha sonra streptavidin kaplı manyetik parçacıklar yüzeye eklenerek spesifik olarak BBSA kaplı kısımlara bağlanmaları gözlenmiştir. Mikroakışkan chip içerisine yerleştirilen altın yüzeylere şırınga pompaları yardımıyla demir nano parçacıklar sıvı içerisinde eklenmiştir. Sıvı akışı ile

bağlanmayan hücreler ortamdan uzaklaştırılırken manyetik etkileşim yüzeye tutunmuş manyetik parçacıklara bağlanan nano parçacıklar toplanmaya neden olmaktadır.



Kuvvetlendirme öncesinde ve sonrasında kayıt edilen görüntüler Matlab programı yardımıyla incelenmiştir. Kuvvetlendirme %32 alan artışına sebep olurken en fazla değişim görünen yeşil renk yoğunluk değişimi 2-3 kattır (Şekil 19).



4.8 Mobil Cihazlar ile Yapılan Ölçümler

Cep telefonlarının tüm dünyada yaygınlaşması sonucunda, bu cihazların iletişimin yanı sıra tıbbi uygulamalar için algılama sistemi olarak kullanılması fikri doğmuştur ve cep telefonlarını mikroskoplara çeviren çeşitli tasarımlar geliştirilmiştir (Bishara et al. 2010; Greenbaum et al. 2013). Bu sistemler optik mikroskoplara göre portatif ve düşük maliyetli olmalarından dolayı yeni nesil biyosensörler için alternatif bir ölçüm metodu oluşturmaktadır.

Geliştirdiğimiz kuvvetlendirme metodu manyetik parçacıkların topaklanmasını sağladığı için cep telefonu-mikroskop sistemleri ile beraber kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Bu durumu test etmek için cep telefonlarına lens takılmış ve topaklanmış parçacıkların görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 20). Elde edilen görüntüler laboratuvarında bulunan Nikon marka optik mikroskop ile kayıt edilen görüntüler ile karşılaştırılmıştır.



Cep telefonu + lens sistemi tek bir parçacığı algılamak sahip olduğu yüksek gürültüden dolayı istenen sonuçlara ulaşamazken, manyetik alan ile birbirine bağlı parçacıkların oluşturduğu zincirler gürültüye rağmen ölçülebilmektedir. Bu deneyler göstermiştir ki algılama sistemi gürültülü olmasına rağmen işaret kuvvetlendirme yöntemi sayesinde ölçülebilen işaretlere ulaşmak mümkündür. Bu yöntemin geliştirilerek tam ve gerçek algılama uygulamasında kullanılması gelecek araştırma hedeflerimiz arasındadır.

5. Tartışma/Sonuç

Tamamlanan bu proje ile manyetik parçacıkların topaklanması esasına dayalı işaret artırma konusu irdelenmiştir. Manyetik ayırma işlemi için kullanılan formüllerin temel alınarak manyetik dipol-dipol etkileşiminin sinyal kuvvetlendirme amacı için kullanılabileceği deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir.

Daha önce geliştirilmiş işaret kuvvetlendirme metotları direkt hedef moleküle yada hedef moleküle bağlanmış 1. derece etiketlere anitkor-antijen, DNA hibridizasyonu gibi biyomoleküllerin etkileşimi esasına dayanan bağlanmalar ile gerçekleştirilmiştir. Biyomoleküllerin etkileşimi esasına dayanan bu yöntemlerin çeşitli dezavantajları mevcuttur: 1) Biyomoleküllerin kullanılması fiyatları arttırmaktadır, 2) Bağlanma için uygun ortam sıcaklıkları ve pH değerleri sağlanmalıdır, sıcaklık ve pH kontrol edilmelidir 3) Birkaç basamaktan oluşan işlemler uzun süre alabilmektedir.

Bu proje de geliştirilen yöntem ise biyomoleküllerin etkileşi yerine manyetik etkileşim esasına dayandığından geleneksel işaret kuvvetlendirme metotlarının dezavantajlarına sahip değildir. Eşitlik 1 ve 2'de yer alan parametreler deneyler ile incelendiğinde manyetik kuvvete ve dolayısıyla manyetik topaklanmaya olan etkileri ortaya çıkmaktadır. Manyetik parçacıkların boyutları, içerdikleri malzemenin manyetik özellikleri, parçacıkların birbirlerine göre konumları, ve uygulanan manyetik alan şiddeti değiştirilerek farklı topaklanma miktarları elde edilebilmektedir.

Manyetik parçacıklar hedef moleküle bağlanarak hedefi bulunduğu ortamdan (kan, serum, gıda maddeleri vb gibi) ayırma işlemi için standart laboratuvar tekniği olarak halihazırda kullanılmaktadır. Birçok firma tarafından farklı biyomoleküller ile kaplanarak satılan immunomanyetik parçacıkları temin etmek nispeten kolaydır. Geliştirdiğimiz yöntem immunomanyetik parçacıkların kullanıldığı ayırma işlemine kolaylıkla entegre edilebilir, ayrıştırma işleminden sonra uygulanabilir. Bu potansiyeli göstermek için E.Coli deneyleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde henüz seçicilik bulunmamaktadır ve ileriki hedeflerimiz arasındadır, fakat E. Coli ye bağlanan immunomanyetik parçacıkların etrafında manyetik etkileşim ile topaklanan parçacıklar algılanan yüzey alanını arttırarak işareti kuvvetlendirmiştir.

Seçiciliği de sağlamak için altın kaplı yüzeylere algılayıcı reseptörler tutturularak sıvı akışı ile bağlanmayan parçacıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra ortama eklenen manyetik parçacıklar yüzeylere bağlanmış immunomanyetik parçacıkların etrafında topaklanmıştır. Elde edilen görüntülerin incelenmesi ile eklenen parçacıkların görüntülerde kontrast farklığına yol açtığı bu sayede işaret kuvvetlendirmenin kontrast farklığı şeklinde ölçülmesinin mümkün olduğu gözlenmiştir.

Cep telefonuna lens takılarak oluşturulan görüntüleme sisteminin geliştirilen işaret kuvvetlendirme yöntemi ile kullanılabileceğini göstermek için çeşitli deneyler gerçekleştirilmiştir. Hala devam etmekte olan bu çalışmalar bize sahada algılama için taşınabilir düşük maliyetli entegre bir sistemin geliştirilme potansiyelini olduğunu göstermiştir. Deneyler için kullanılan manyetik parçacıklar üretici firmalardan temin edilmiş ancak piyasada satılmakta olanlar kullanılabilmiştir, kuvvetlendirme işleminde kullanılabilmesi için irdelenen parametreler ışığında optimize edilmeleri gerekmektedir. Manyetik parçacık sentezi yapan araştırmacılar ile işbirliği yapılarak farklı uygulamalara uygun istenen özelliklerde parçacık üretilmesi gerçekleştirilebilir. Bu konunun da gelecek araştırma aktivitelerimiz arasında yer alması planlanmaktadır.

Proje kapsamında 1 adet SCI'da taranan makale, 1 adet konferansta poster sunumu, 1 adet konferansta sözlü sunum gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yeni bir makale hazırlıkları da devam etmektedir.

Projede 1 bursiyer (yüksek lisans öğrenci) uzun zamanlı, 2 bursiyer (yüksek lisans ve lisans öğrencileri) kısa süreli görev almıştır.

Proje bütçesi çoğunlukla sarf malzeme alımı ve öğrenci bursları için kullanılmıştır ve bu olanağın sağlanmasında katkısı bulunanlara teşekkür ederiz. Ülkemiz de Tübitak'ın sağladığı destekler olmasa bilimsel çalışmaları gerçekleştirmek mümkün olamaz, bu yüzden Tübitak desteklerine teşekkür etmekle beraber hızlı yanıt verme ve akademisyene olabildiğince esneklik tanınması konusunda isteklerimizi belirtmek isteriz.

Kaynaklar

- Acharya, Ghanashyam et al. 2007. "Immunomagnetic Diffractometry for Detection of Diagnostic Serum Markers." *Journal of the American Chemical Society* 129(51):15824–29.
- Acharya, Ghanashyam, Chun L. Chang, David P. Holland, David H. Thompson, and Cagri A. Savran. 2008. "Rapid Detection of S-Adenosyl Homocysteine Using Self-Assembled Optical Diffraction Gratings." *Angewandte Chemie - International Edition* 47(6):1051–53.
- Almeida, C. et al. 2013. "Detection of Escherichia Coli O157 by Peptide Nucleic Acid Fluorescence in Situ Hybridization (PNA-FISH) and Comparison to a Standard Culture Method." *Applied and environmental microbiology* 79(20):6293–6300. Retrieved September 11, 2015 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3811206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Bishara, Waheb, Ting-Wei Su, Ahmet F. Coskun, and Aydogan Ozcan. 2010. "Lensfree on-Chip Microscopy over a Wide Field-of-View Using Pixel Super-Resolution." *Optics express* 18(11):11181–91.
- Gleich, Bernhard and Jürgen Weizenecker. 2005. "Tomographic Imaging Using the Nonlinear Response of Magnetic Particles." *Nature* 435(7046):1214–17. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988521>).
- Greenbaum, a, a Feizi, N. Akbari, and a Ozcan. 2013. "Wide-Field Computational Color Imaging Using Pixel Super-Resolved on-Chip Microscopy." *Optics Express* 21(10):12469–83. Retrieved (http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medl&AN=23736466%5Cnhttp://sfx.bibl.ulaval.ca:9003/sfx_local?sid=OVID:medline&id=pmid:23736466&id=doi:10.1364/OE.21.012469&issn=1094-4087&isbn=&volume=21&issue=10&spage=12469&pages=12469-8).
- van Kleef, R. et al. 1983. "Limits of Magnetic Flocculation in Colloidal Dispersions." *IEEE Transactions on Magnetics* 19(5):2118–20. Retrieved September 9, 2015 (<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=1062708>).
- Lee, Joonhyung, Kutay Icoz, Ana Roberts, Andrew D. Ellington, and Cagri a Savran. 2010. "Diffractometric Detection of Proteins Using Microbead-Based Rolling Circle Amplification." *Analytical chemistry* 82(1):197–202.
- Lu, Shouci, Robert J. Pugh, and Eric Forssberg. 2005. *Interfacial Separation of Particles*.
- Malhotra, Ruchika et al. 2012. "Ultrasensitive Detection of Cancer Biomarkers in the Clinic by Use of a Nanostructured Microfluidic Array." *Analytical chemistry* 84(14):6249–55. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1021/ac301392g>).

- Mendoza, L. G. et al. 1999. "High-Throughput Microarray-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)." *BioTechniques* 27:778–88.
- Neuberger, T., B. Schopf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. Vonrechenberg. 2005. "Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: Possibilities and Limitations of a New Drug Delivery System." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1):483–96. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885305001137>).
- Olsvik, Ørjan et al. 1994. "Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology." *Clinical Microbiology Reviews* 7(1):43–54.
- Osaka, Tetsuya et al. 2006. "Synthesis of Magnetic Nanoparticles and Their Application to Bioassays." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384(3):593–600.
- Pankhurst, Q. a, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson. 2003. "Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine." *Journal of Physics D: Applied Physics* 36(13):R167–81. Retrieved (<http://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=201%5Cnhttp://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=201?key=crossref.3e466fa3dbc8e71868fa521781326623>).
- Plank, C., F. Scherer, U. Schillinger, M. Anton, and C. Bergemann. 2002. "Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery by Magnetic Force." Pp. 79–80 in *European Cells and Materials*, vol. 3.
- Suzuki, Hiroaki, Chih Ming Ho, and Nobuhide Kasagi. 2004. "A Chaotic Mixer for Magnetic Bead-Based Micro Cell Sorter." *Journal of Microelectromechanical Systems* 13(5):779–90.
- Teramura, Yuji, Yusuke Arima, and Hiroo Iwata. 2006. "Surface Plasmon Resonance-Based Highly Sensitive Immunosensing for Brain Natriuretic Peptide Using Nanobeads for Signal Amplification." *Analytical Biochemistry* 357(2):208–15.
- Yin, Shizhuo et al. 2005. "Measuring Single Cardiac Myocyte Contractile Force via Moving a Magnetic Bead." *Biophysical journal* 88(2):1489–95. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.048157>).
- Zacco, E., M. I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, and M. P. Marco. 2006. "Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues." *Analytical Chemistry* 78(6):1780–88.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. KUTAY İÇÖZ
Proje No:	114E886
Proje Başlığı:	Manyetik Parçacıkların Kullanıldığı Biyosensörlerde Mikro/Nano Demir Parçacıklar Kullanarak İşaret Arttırma Ve Hassasiyeti Geliştirme
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	16
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ABDULLAH GÜL Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/02/2015 - 01/06/2016
Onaylanan Bütçe:	73000.0
Harcanan Bütçe:	56874.17
Öz:	<p>Bu projenin amacı öncelikle kameralar ile görüntü kayıt etme esasına dayalı veya lazer ile kırınım tabanlı ölçme sistemlerinde uygulanabilecek mikro/nano demir parçacıklar yardımıyla manyetik parçacıklardan elde edilecek sinyallerin kuvvetlendirilmesidir. Biyomoleküller ve mikro/nano parçacıklar kullanarak hedef molekülden elde edilecek işareti kuvvetlendirme çeşitli metotlarla gerçekleştirilmektedir. Halihazırdaki bu teknikler biyomoleküllerin etkileşimi esasına dayanmakta olup pahalı olma, sıcaklık ve pH değerlerine bağlı olma gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu projede amaç bahsedilen dezavantajlara sahip olmayan ferromanyetik/paramanyetik parçacıkları ve demir mikro/nano parçacıkları beraber kullanarak yeni bir işaret kuvvetlendirme tekniği geliştirmektir. Ferromanyetik/paramanyetik parçacıklar hedefi yakalama, ayırıştırma ve hareket ettirmek için kullanılacakken üzerlerine uygulanan manyetik alan nedeni ile manyetik hale gelirler. Ortama eklenecek demir parçacıkları ferromanyetik/paramanyetik parçacıklara manyetik olarak bağlanarak ve onlardan elde edilecek kütle ölçümü, görüntü kaydı gibi ölçüm metotlarında hedef molekülden elde edilen işareti kuvvetlendirerek hassasiyeti arttırmıştır. Yapılan ölçümler ile hedefi yakalamış tek bir manyetik parçacık için minimum 3 kat maksimum 60 kat işaret artırımının mümkün olduğu gösterilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	manyetik parçacıklar, biyosensörler, işaret kuvvetlendirme, MEMS, manyetik dipol-dipol etkileşimi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır