

Nanobiyosensörler: Hastalık Teşhisi İçin Gelecek Vaat Ediyor mu?

Ilgın Göktürk ve Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

Nanobiyosensörler genellikle sinyal çevirici yüzeyine immobilize edilmiş biyolojik tanıyıcı molekül içerir. Analit ile biyotanyıcı molekül arasındaki tepkime heterojendir. Nanobiyosensör performansında biyotanıma arayüzey tasarımı önemlidir. Nanobiyosensörler hastalıkların teşhisinde biyobelirteçlerin moleküler tanısında sıklıkla kullanılır. Yüzey alanı fazla olan nanomalzemelerin kullanımı ile nanobiyosensörlerin duyarlılığı artırılmış ve cevap verme süreleri kısalmıştır. Bu derleme, moleküler biyobelirteçlerin analiziyle (protein, hormon, nükleik asit gibi) hastalıkların teşhisindeki gelişmeler özetlenmiştir.

Nanomalzeme temelli biyosensörlerin hastalık teşhisinde kullanımı

Biyosensör, belirli bir DNA dizisi ya da protein gibi biyokimyasal molekülleri tanıması ve ölçmesi için tasarlanmış cihazlardır. Birçok biyosensör afinite bazlıdır. Yani analite seçici olarak bağlanan immobilize bir prob kullanılır. Böylece çözeltideki hedef molekülü tanıyarak yüzeydeki değişimi algılar. Bu değişim farklı birçok yöntemle ölçülebilir. Bunlar yüzey plazmon rezonans (SPR), Kuartz kristal mikroterazi (QCM) ya da manyetik partiküller olabilir. Kullanılan teknikler arasında elektriksel yöntemler "etiketsiz" biyosensörler olarak tasarlanıp yaygın

olarak kullanılır. Elektriksel biyosensörler bağlanmayı belirlemek için yalnızca akım ve/veya gerilim ölçümüne (voltaj) dayanır [1-3]. Düşük maliyet, az enerji, küçük ölçekte çalışma kolaylığı sayesinde elektriksel biyosensörler yerinde teşhis gibi uygulamalarda umut vericidir.

Nanoboyutlu biyosensörler, birçok dezavantajlarına rağmen, çok sayıda zorluğun üstesinden gelerek afinite biyosensörlerde yaygın olarak kullanılır. Afnite biyosensörler, antibadi ya da DNA gibi biyotanyıcı molekül sayesinde özgül olarak karmaşık örneklerdeki düşük derişimlerdeki analitleri bile analiz eder. Bir sinyal dönüştürücü, bağlanma reaksiyonunun kapsamını belirler ve bu bilgiyi son kullanıcıya verir. Bu gibi cihazlara ilgi büyüktür, çünkü hastalık teşhisinde analitlerin büyük çoğunluğu bir afinite reaksiyonuyla tespit edilebilir. Karmaşık örneklerde bile, düşük yoğunluklu analitlerin analizleri, antibadilerin özgüllük ve yüksek afinitesi sayesinde mümkündür.

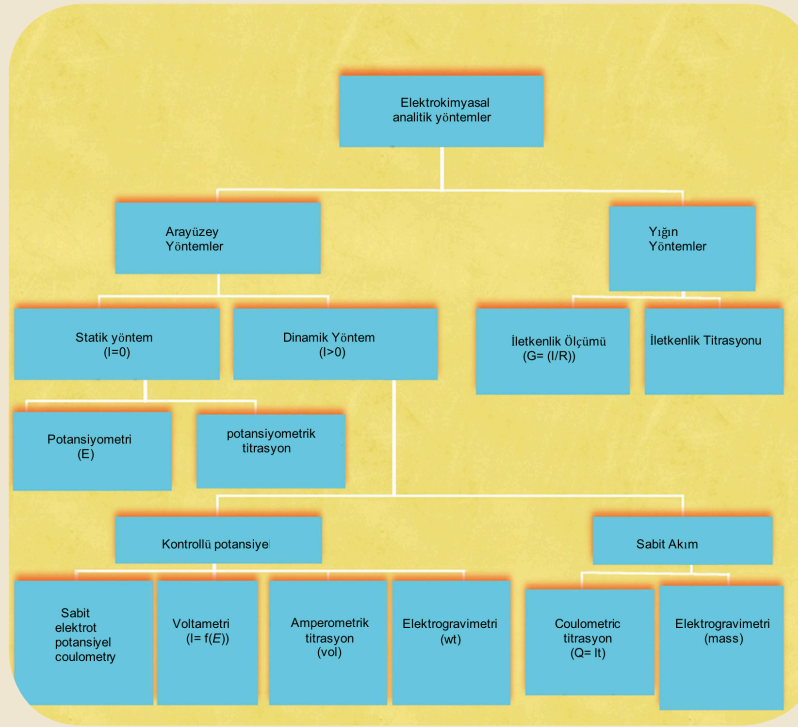
Nanoboyutlu afinite biyosensörlerin tasarlanmasında iki temel parametre vardır. Birincisi, tayin limitinin düşürülmesi; ikincisi aynı örnekte birden çok analitin belirlenmesidir. Bu durum çoğullama olarak isimlendirilir. Çoğullama önemlidir, çünkü hastalığın güvenilir tanısı

genellikle bir dizi moleküler belirteç seviyesinin tanımlanmasını gerektirir [4]. Tayin limitinin düşürülmesindeki zorluk afinite reaksiyonunun termodinamiği ile ilgilidir. Genellikle, antibadi-antijen reaksiyonlarının ayrışma sabiti (Kd) 10^8 – 10^{12} M aralığındadır. Bilinen en güçlü bioafinite reaksiyonu biotin ve streptavidin arasındadır. Kd değeri 10^{15} M'dır [5]. Geleneksel teknikler ile tayin limiti 10^9 – 10^{14} M aralığındadır.

Nanobiyosensörlerde, nanopartikül, nanotüp, nanotel, nanomembran ya da nanoyapılı yüzeyler kullanılarak düşük tayin limitlerine inilebilir [6]. Amplifikasyon tekniklerinin dezavantajı, tipik olarak, eş zamanlı analizi engelleyen etiketleme ve örnek manipülasyon adımlarını gerektirmesidir. Biyotanıma reaksiyonlarının oldukça duyarlı, etiketsiz transdüksiyonuna kantilever [7] ve alan etkili transistörler [8,9] ile ulaşılmıştır.

Nanobiyosensör tanımı

Nanobiyosensörler, kompakt bir prob ile herhangi bir elektronik, optik veya manyetik teknoloji kullanarak biyokimyasal veya biyolojik bir olayı ölçen cihazlardır [6-9]. Nanoteknolojideki güncel ilerlemeler ve elektronikteki ileri üretim teknolojileri ile nanobiyosensörler tasarlanmakta ve hastalık teşhisinde biyonanoteknolojik analizlerde yeni bir dönem başlamaktadır.



Şekil 1. Genel elektroanalitik yöntemlerin özeti

Not: Birimler parantez içinde verilmiştir. (I, akım; E, potansiyel; R, direnç; G, iletkenlik; Q, yük miktarı; t, zaman; vol, standart çözelti hacmi; wt).

Hastalık teşhisinde gerçek-zamanlı ölçümlere ihtiyaç vardır

Hastalık durumlarının ve sağlık bozukluklarının erken tespiti için insan sağlığının izlenmesi, sağlıklı bir yaşam sürdürmek için hayati öneme sahiptir. Biyobelirteç olarak adlandırılan birçok biyomolekül, hastalığın fizyolojik durumunun belirlenmesine yardımcı olur [10-12]. Bununla birlikte, pestisit ve nehir suyu kirleticileri gibi zararlı biyomoleküllerin bulunduğu gıda ve çevre analizleri de önemli hale gelmiştir. Biyomoleküllerin tespiti için doğru, hızlı ve sürekli analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. "Gerçek-zamanlı" biyosensörler, etkili veri üretme ve veri işleme için anında karar verir [13,14]. Benimsenen standart yaklaşımlardan birisi hibrid biyokimyasal analiz sistemlerini geliştirmektedir. Biyosensörler çok yönlüdür, çünkü çok düşük derişimlerde çok çeşitli ortamlardan özgül analitleri izleyebilir. Mikroakışkan nanomalzemelerin bir kombinasyonunu oluştururlar. Bu yaklaşım, entegre devrelerde yarı iletken endüstrisinin izlediği yaklaşıma benzer. Mikroakışkanlar, çeşitli sıvı manipülasyonu, tanısı ve ayırma tekniklerinin çalışmasını sağlar. Çoğu zaman bu farklı bileşenler, eksiksiz

bir "çipte" analiz sistemi geliştirmek için temel elektroniklerle entegre edilmiştir. Mikroişleme, enjeksiyon ve kopya kalıplama, yumuşak litografi, ıslak aşındırma ve fotolitografi gibi üretim teknikleri yarı iletken endüstrisinden uyarlanı. Bu teknikler, akışkan taşıma sistemlerinin, standart bir klinik laboratuvar tahlili ile bağlantılı sayısız teşhis ve analizini gerçekleştirebilen avuç içi "mikro-toplam analiz sistemleri" veya "çip üzerinde laboratuvar" cihazlarına minyatürlenmesini sağlar. Dolayısıyla, bu alandaki mevcut araştırmaların birçoğu, çok işlevli nanobiyosensörler için bu karmaşık gereksinimlerin gerçek-zamanlı ölçümlerle çip üzerinde algılama yeteneklerine odaklanmaktadır [15]. Birsonrakî bölüm nanobiyosensörlerin temel kavramlarını açıklamaktadır. Bu parametrelerden birinde veya daha fazlasında varyasyon analizi, biyobelirteçlerin varlığını veya yokluğunu nicelleştirir. Nanobiyosensörlerdeki nanoyapılar, biyolojik ajanlar ile fizikokimyasal dedektör bileşenleri arasında bir ara tabaka görevi görür, bir biyosensör oluşturmak için dönüştürücü ile nanomalzemeler birleştirilir [16].

Nanobiyosensörlerin temel kavramları

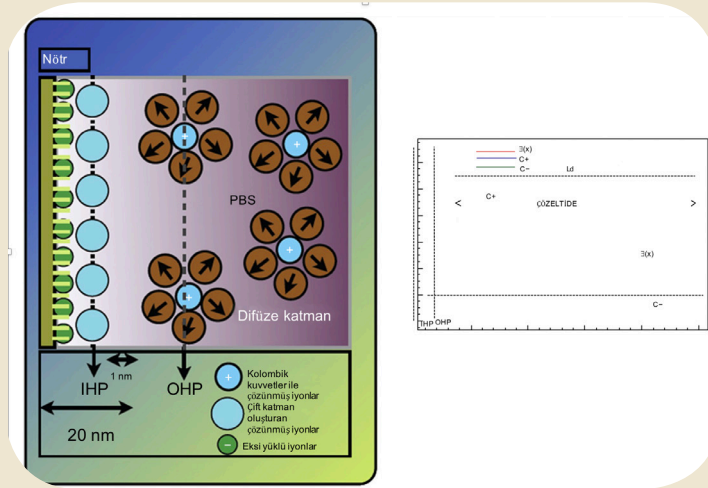
Nanobiyosensör antibadi, nükleik asit, patojen ve metabolit gibi biyolojik ajanları saptar. Çalışma prensibi, ilgilenilen biyoanalitlerin bioreseptörlere bağlanması ve ilişkili fizikokimyasal sinyalin modüle edilmesidir. Daha sonra bir dönüştürücü fizyokimyasal sinyali yakalar ve bir elektrik sinyaline dönüştürür. Elektromanyetik radyasyonun elektrik potansiyeli, akımı, iletkenliği, empedansı, yoğunluğu ve fazı, kütle, sıcaklık ve viskozite gibi sinyaldeki değişim izlenir.

Biyomolekül dönüştürücü sistemleri

Biyomolekül iletimi iki sınıfa ayrılabilir; etiket bazlı algılama ve etiketsiz algılama.

Etiket bazlı algılama

Etiket bazlı teknolojilerinin çoğu, antijen-antibadi tepkimelerine dayanan bağışıklık testleriyle yapılır. Kanda bulunan protein miktarını saptamak için enzim bağımlı immünosorbent testleri (ELISA) kullanılır. ELISA, örnekteki bir antibadinin veya antijenin varlığını saptamak için kullanılan biyokimyasal bir tekniktir. ELISA, son 30 yılda standart tanı aracı olmuştur. Düşük tayin limitleri için duyarlı bir yöntemdir. Fakat birkaç dezavantajı vardır. ELISA,



Şekil 2. Bir biyosensörün katı/sıvı arayüzey boyunca yük dağılımı.

Notlar: Arayüzeydeki potansiyel düşüş grafiği gösterilmiştir. C₁ ve C₂ ve (x) arayüzeydeki kapasitans değişikliklerini ve arayüzeydeki yük dağılımına bağlı olarak oluşan potansiyeli gösterir. Biyomoleküllerin bağlanmasını tespit etmek için kapasitans ve voltajdaki değişiklikler kullanılabilir.

tanı için fluorofor etiketli bağlayıcı moleküller kullanır; ancak bu fluoroforlar proteinleri denatüre edebilir. Floresans tanı yöntemleri özgül dalga boyunda ışığı yayan floresans belirteçlere bağlıdır ve floresans rezonans enerji transferi gibi optik sinyal oluşumu bağlanma reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğine bağlıdır [17]. ELISA testleri gerçekleştirmek için eğitimli profesyonel teknisyenlere ihtiyaç duyan laboratuvar bazlı bir tekniktir ve hızlı, tek molekül-algılama uygulamaları için uygun değildir.

Etiketsiz tanı yöntemleri

Mikrofabrikasyon ve nanoteknoloji alanındaki gelişmelerin ışığı altında hızlı yerinde analiz sistemleri gelişmeye başlamıştır. Nanobiyosensörler tasarlanırken kullanılan etiketsiz tanı yöntemleri Şekil 1'de özetlenmiştir.

Elektrokimyasal ve elektriksel tayin

Elektriksel biyosensörler yerinde analiz veya ayakta tedavi gibi maliyeti düşüren uygulamalar için kullanım kolaylığı sağlar. Bu biyolojik sensörler, öncelikle, bağlanma olayının akım ve/veya voltaj değişimindeki ölçümü temel alır. Elektrokimyasal yöntemleri kullanan biyosensörler, voltametrik, amperometrik ve empedans ölçümlerini içeren elektrik ölçümünün nasıl yapıldığına göre de sınıflandırılabilir [18]. Elektrik biyosensörleri, kimya alanında

geliştirilen elektroanalitik tekniklerle çok yakından sınırlanır. Şekil 2, biyolojik sensörün yüzeyinde meydana gelen ve elektriksel ölçümleri mümkün kılan yük dağılımını göstermektedir. Elektrokimyasal yöntemleri kullanan biyosensörler, voltametrik, amperometrik ve empedans ölçümlerine göre sınıflandırılabilir [18]. Elektrik biyosensörleri, kimya alanında geliştirilen elektroanalitik tekniklerle çok yakından ilişkilidir. Şekil 2, biyolojik sensörün yüzeyinde meydana gelen ve elektriksel ölçümleri mümkün kılan yük dağılımını göstermektedir.

Optik teşhis

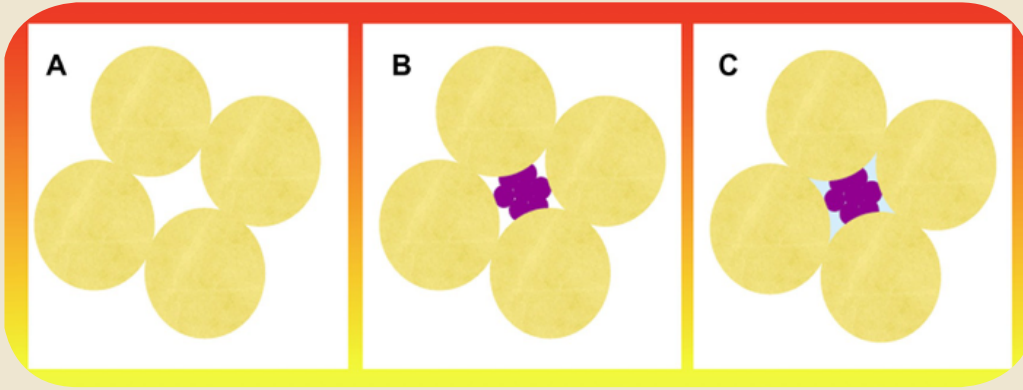
Kemilüminesans, bir kimyasal reaksiyon gerçekleştiğinde ışık formundaki enerjinin üretilmesidir. Sentetik bileşiklerde, böyle bir kimyasal parlaklık, peroksit gibi aşırı oksitlenmiş bir kimyasal reaksiyon sırasında enerji yayarsa gerçekleşir. Bazı sentetik bileşikler bir konjugat oluşturmak üzere bir biyomoleküle eklendiğinde, ışık formunda enerji açığa çıkar ve bir teşhis tekniği olarak kullanılabilir. Biyoluminesans, sentetik bileşik olarak ateşböceği lüsiferaz/lüsiferin kullanıldığı bir tekniktir [19]. SPR yüzey aktivitesini ölçer. Bu teknikte, belirli bir yük yoğunluğundaki dalga, metal yüzeyi ve dielektrik arayüzey arasında yayılır [20]. Işığın altın ve gümüş gibi malzemelere karşı oluşan toplam yansımından dolayı,

yüzeyde oluşan sönük dalga veya alan, yoğun ortam olan arayüzeye (metal) nüfuz eder. Bu ışık yüzeyde plazmon olarak bilinen serbest elektronlarla çiftleşebilir ve kaydedilen bir rezonans dalgası oluşur. Bu nedenle, metal yüzeyinde bulunan herhangi bir biyomolekül tabakası varsa, bir SPR adsorpsiyon profili elde edilir ve biyomoleküllerin özelliklerinden dolayı her SPR spektrumu farklıdır. SPR'nin açısı, her molekül ile değişir.

İnce filmlerin yerine metal nanopartiküllerin kullanılması, SPR sinyalinin amplifikasyonunu sağlar ve böylece çok hassas algılama elde edilir. SPR halihazırda ticarileştirilmiştir; ancak bu tekniği kullanan biyosensörler için biraz daha beklemek gerekiyor. SPR bazlı biyolojik algılama sistemleri ile ilgili temel avantaj özgülük ve çok düşük sinyal-gürültü oranıdır.

Kütle bazlı tanı

Biyokimyasal oluşumlar için mekanik tanı mikroölçekli kantilever sensörler kullanılarak gerçekleştirilir. Kantilever mekanik olarak rezonansa girmek için uyanılır ve ardından rezonans frekansı kantilever yüzeyine bağlı biyomoleküllerle karşılaştırılır. Rezonans frekansındaki kayma yüzeydeki kütle değişimini belirler. Kantilever sensörlerini kullanmanın avantajı, etiketleri biyomoleküllere



Şekil 3. Moleküler yoğunlaşma teorisinin gösterimi.

Notlar: Moleküler birikim, bazı araştırmacılar tarafından, moleküllerin hareketini önlemedeki en temel özelliği nedeniyle "dışlanan hacim etkisi" olarak belirlenmiştir. Başka bir deyişle, mevcut olan hacim sıfır olmuştur, yani toplam hacim eksi dışlanan hacim etkili bir şekilde sıfır olmuştur (A). Bu alanlar daha küçük parçacıklarla doldurulabilir ve su molekülleri (B ve C) gibi daha küçük parçacıklar ile doldurulabilen daha küçük boşluklar bırakır.

bağlamadan etkileşen bileşikler tespit etmesidir. En büyük dezavantaj cihazın karmaşıklığıdır. Bu sorunlar, sıcaklık ve ortam koşullarına yüksek hassasiyet ile birleştiğinde ölçüm tekniğinin taşınabilir cihazlar için uygunluğunu olumsuz etkiler.

Biyoalgılama için nanomalzemeler

Bir biyosensörde, analite tepki veren algılama elementi biyolojik kaynaklıdır. Görsel olarak gözlenebilir bir sinyal kaydedilebilecek şekilde bir çeşit dönüştürücüye bağlanmalıdır. Günümüzde, sensörlere dahil edilebilen dönüştürücüler nanomalzemelerdir. Nanomalzemelerin boyut ve yapısı yeni algılama sistemleri tasarlamak ve biyosensörün performansını arttırmak için mükemmel fırsatlar sunar [21,22].

Nanopartiküller

Konvansiyonel (optik) sandviç biyoafinite testlerinin olumsuzluğu, her bağlanma için az sayıda etiket yakalamasıdır. Nanopartiküller özel biyolojik testler için üretilebilir ve küçük boyutlarından dolayı hedef biyomoleküllerin güçlü bir şekilde bağlanması sağlar [23]. Nanopartiküllerin kullanılması, testlerdeki sinyali önemli derecede artırır. Optik biyolojik testlerdeki nanopartikül-kantitatif etiketlerin kullanımının önemi organik fluoroforların sınırlı kullanımına dayanmaktadır. Mirkin'in grubu, DNA

hibridizasyonu ile indüklenen altın nanopartiküllerin biraraya toplanarak dikkat çekici, optik özellikli malzemeler oluşturduğunu gösterdi [24]. Yarı iletken kuantum noktalarının yüksek floresans özellikleri hassas biyolojik testlerde kullanılabilir. Hahn ve arkadaşları, streptavidinle konjuge edilen CdSe/AnS çekirdek kabuğu kuantum noktalarını kullanarak tek bakteri patojeni *Escherichia coli* 0157'in hassas şekilde tespit edildiğini bildirmiştir [25].

Nanoteller

Nanoteller, biyolojik olaylar için sağlam, hassas ve seçici olan elektrik dedektörleri oluşturmada başarı vaat ediyor. Herhangi bir tek boyutlu sistemdeki akım küçük dalgalanmalara karşı oldukça duyarlıdır. Nanotellerde akım, yüzeyin son derece yakınından geçer [26,27]. Biyolojik makromoleküller, bu nanotellerin çapıyla aynı boyuttadır. Yarıiletken nanoteller, ayarlanabilir iletkenlik özelliklerinin birleşimi ve yüzeylerindeki analitleri bağlama yeteneği ile etiketsiz, doğrudan bir elektriksel sinyal üretir [28]. Bu sensörler, iyon seçici alan bazlı transistör prensibiyle çalışır.

Karbon nanotüpler

Karbon nanotüpler, elektronik ve mekanik özelliklerinden dolayı önemli ölçüde ilgi çeken tek boyutlu nanomalzemelerdir. Yüksek yüzey/hacim oranı ve yeni

elektron taşıma özellikleri nedeniyle, bu nanoyapılardaki elektronik iletkenlik, makro moleküllerin bağlanmasıyla ilişkili olan küçük yüzey bozulmaları tarafından büyük oranda etkilenir. Bu tür tek boyutlu materyaller, hızlı (gerçek-zamanlı) hassas, etiketsiz biyoelektronik algılama sağlar [29].

Nanomembranlar

Farklı gözenek boyutuna, uzunluğuna, morfolojisine ve yoğunluğa sahip zarlar, boyut dışlama temelli ayırma için farklı malzemelerden sentezlenmiştir [30,31]. Özgül biyoaktif immobilizasyon ve tanı birçok biyoanalitik analiz için büyük bir teknik zorluktur. Bunu aşmak için kontrol edilebilir gözenek çapı, uzunluğu ve yüzey kimyasına sahip malzemeler gereklidir. Membranlar, analiz edilen sıvı ile artmış yüzey etkileşimleri nedeniyle çok uygundur. Bir sensörün minyatürleştirilmesi, sinyal iletimi için doğal bir avantaj olan sinyal-gürültü oranını artırır. Duyarlılığın belirlenmesinde analitik çözeltinin sensör yüzeyinden kütle transferinin önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [32]. Whitman'ın grubu, Washington DC'deki Donanma Araştırma Laboratuvarı'nda biyolojik testler için femtomolar tespit limitlerine inebilmektedir [32]. Sensöre gelen toplam akış, sensör geometrisinin ve hacimsel akışın bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. Geleneksel taşıma

yöntemleri ile yüksekliğin azaltılmasıyla hacimsel akış oranının düşürülmesi sayesinde sensörün toplam akısı azalmıştır. Diğer yandan, analiti doğrudan sensöre enjekte etmek kütle transferinin etkisini arttırmış ve bu da sensörün toplam akısını arttırmıştır. Nanogözenekli membran kullanılarak sensörün akışının artabileceği bulunmuştur. Böylece, sensörlerin duyarlılığı, mikroakışkan bazlı biyosensörlere nanogözenekli zarlar eklenerek artırılabilir.

Nanobiyosensörler için biyomimetik doğa

Bir hücredeki ortam kalabalıktır; burada, sitoplazma tipik olarak proteinlerin in vitro çalışmalarda kullanılan seyreltik çözeltilerden farklıdır ve bunun protein davranışını önemli ölçüde etkileyeceği düşünülmektedir. Hücredeki proteinlerin, nükleik asitlerin ve kompleks şekerlerin yüksek derişimi küçük moleküller için çeşitli enerji ve boyut kısıtlamalarına neden olur. Bu büyük yapıların etkisi "makromoleküler yoğunlaşma" olarak bilinir [33,34]. Makromoleküllerin derişimi 400 g/L'ye kadar, yani toplam hacmin %5-%40'ı fiziksel olarak bu moleküller tarafından işgal edilir [35]. Şekil 3'te gösterildiği gibi, toplam hacmin daha büyük bir bölümü benzer boyuttaki moleküller için mevcut değildir.

Tasarruf ne kadar önemli?

Kendi kendine oluşumlar (self-assembly) için bağlanma afiniteleri ve hızları değişebilir. Bu nedenle in vitro bir çalışma yaparken yoğunlaşma çok önemli bir etkidir. Hücre ve mekanizmaları in vivo çalışırken kriyoelektron tomografi ve floresans işaretler kullanılır. Makromoleküllerin sitoplazmadaki tepkime oranları, moleküler yoğunlaşma teorisi tarafından öngörülen tepkime oranlarına çok benzer olduğuna dair kanıtlar vardır. Kısaca, bunun anlamı, bir test tüpünde gerçekleşecek olan biyokimyasal tepkimenin vücutta meydana gelen tepkime ile aynı olmadığıdır. Bu nedenle, fizyolojik sıvıdaki proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin derişimini doğru ölçen bir cihaz kullanmak zorunludur [35,36].

Belirli boşluklarda protein katlanması ve bağlanması

Kapalı yerlerde proteinlerin katlanması ve bağlanmasının özünü incelemek ve anlamak için çeşitli gruplar tarafından sunulan basit teorik modeller de cihazın tasarımı sırasında dikkate alınmıştır [37-40]. Protein katlama, bir polipeptitin amino asit diziliminde bulunan lineer bilginin fonksiyonel proteinin iyi tanımlanmış üç boyutlu konformasyonuna neden olduğu süreçtir. Katlanmamış proteinler in vitro ortamda kendiliğinden doğal durumlarına dönebildiği için, in vivo olarak yeni sentezlenen polipeptitlerin katlanması (dördüncül yapının oluşumu) ve kendiliğinden oluşumu (protein oligomerlerinin oluşumu) katalizlenmeden ve metabolik enerji girişi olmadan gerçekleşir. Bu fikir, hücredeki birçok proteinin doğru şekilde katlanmasını sağlayan moleküler şaperonların keşfinden sonra, son zamanlarda güncellenmiştir [41]. Yoğunlaşma, in vitro çalışmalarda birikim olarak karakterize edilen kısmen katlanmış polipeptit zincirlerinin kendi kendine oluşumunu engeller [42]. Tutuklama, proteinleri dengede tutar ve katlanmalarını önemli derecede hızlandırır [43]. Protein yapılarının denatürasyonuna ve işlevsellik kaybına neden olur [35-37]. Aslında, proteinlerin tespit edilebileceği çok küçük bir kapalı alan sağlamak yararlı olabilir. Bu amacı başarmak için, hastalık yapıcı biyolojik belirteçlerini saptamak amacıyla, ölçüm elektrotlarının yüzeyine gömülü nanomalzeme içeren nanobiyosensörler tasarlanmıştır [1-3].

Nanobiyosensör performansını gösteren parametreler

Seçicilik, nanobiyosensörün sadece hedef moleküle olan cevabı ile ilgilidir. Okuma yönteminin özgül ve özgül olmayan etkileşimleri ayırt edebilmesi son derece zordur. Gerçek kan örneklerinde, hedef biyomoleküller, özgül olmayan biyomoleküllerinkinden daha düşük derişimlerde bulunur. Biyosensör alanındaki zorluk, karmaşık gerçek örnekler test edilirken seçicilik gereksinimlerini karşılamaktır. özgül olmayan bağlanma, bunu daha da zorlaştırmaktadır. Bu, dönüştürücü probda

bulunan biyolojik problemlere bağlanan özgül olmayan, hedeflenmemiş biyomolekülleri ifade eder. Bu özgül olmayan moleküller, ilgili hedef biyomoleküllerin bağlama yerlerinin sayısını azaltır; sadece bağlama olayını önlemekle kalmaz, aynı zamanda yanlış pozitif bir sinyal olasılığı oluşturur. Bu sorunun üstesinden gelmek için, özgül olarak adsorbe olan sığır serum albumin gibi bloke edici moleküller tutturulmuş biyomolekülün yüzeyine yeniden tutunur ve bu gerçek örneklerle maruz kalma sırasında diğer özgül olmayan bağlanma tepkimelerini engeller [44].

Tayin limiti, nanobiyosensör tarafından güvenilir şekilde tespit edilebilen, en küçük veya en düşük hedef biyomolekül derişimidir. Sensörün avantajı budur. "Nanobiyosensörün duyarlılığı" aynı parametreye atıfta bulunmak için kullanılabilir. Doz-cevap eğrisi, nanobiyosensör kullanılarak ölçülebilen tayin limitinin ve derişim aralığının çizildiği grafiklerdir. Doz-cevap eğrisi aynı zamanda kalibrasyon eğrisi olarak da bilinir. Tekrarlanabilirlik, bir grafikte hata çubuklarından görülebilen cihazla ilişkili bir başka önemli parametredir. Dinamik aralık, ölçülebilen en büyük hedef derişiminin ve tayin limitinin oranıdır. Nanobiyosensörün çözünürlüğü, hedef biyomolekül derişimindeki tespit edilebilir en küçük değişikliklerdir. Dinamik aralık ve tayin limiti birbiriyle ilişkilidir. Çoklu tayin, tek bir biyolojik örnekten çok sayıda hedef biyomolekülün tespitini ifade eder. Bu bir nanobiyosensörün en önemli şartlarından biridir ve nanobiyosensörün farklı bölgelerindeki farklı biyolojik problemlerin lokalizasyonu ile başarılabilir. Çoklu tayin ile ilgili en büyük sorun çapraz reaktivite problemidir. Belirli bir biyolojik prob, hedef moleküllerin birden fazlasıyla reaksiyon gösterebilir veya belirli hedef moleküller, problemleri bozabilir. Yaratıcı tasarım teknikleri ve yüksek oranda özgül problemler kullanılarak, bu reaksiyonlar azaltılabilir. İmmobilizasyon kimyasının daha iyi anlaşılması ve özgül olmayan bağlanma sorunlarının asgariye indirilmesi ile biyolojik problemler kullanılarak tespit sınırları daha da geliştirilebilir.

Nanoteknolojinin biyoçip test formatlarına entegrasyonu

Çip üzerindeki nanoteknoloji, hastalık tanısı için yeni bir paradigmadır [25]. Kimyasal ve biyolojik bilgilerin hızlı ve nispeten ucuz bir şekilde analitik olarak ölçülmesi önemlidir. Nanoteknoloji bazlı biyoçipler ve mikrodiziler içeren bazı cihazlar nanoakışkan diziler ve protein nanobiyosensörlerdir. Bu cihazlar yerinde teşhis için uyarlanabilir. Nanoakışkan cihazların daha umut verici kullanımlarından biri, DNA ve protein algılama gibi, teşhis ile ilgili olan bireysel biyomoleküllerin izolasyonu ve analizidir. Bir dizi kronik hastalık için yeni teşhis yöntemleri oluşturulabilir. Nanoakışkan teknolojilerin sistem biyolojisi, bireysel tıp, patojenlerin tayini, ilaç geliştirme ve klinik araştırmalarında geniş uygulamaları olması beklenmektedir.

Protein mikrodizileri, diziler üzerinde nokta proteinleri üretmenin zorluklarından dolayı tercih edilmemektedir. Protein mikrodizileri tamamlayıcı DNA'ları cam slaytlara bastırarak ve daha sonra hedef proteinleri memeli retikulosit lizati ile çevirerek üretilebilir [45]. Proteinlere yapışmış epitop etiketleri, in situ olarak immobilize olmalarını sağlar. Bu yöntem, proteinlerin saflaştırılması gerekliliğini ortadan kaldırır. Saklama sırasında protein kararlılık sorunlarını önler ve fonksiyonel çalışmalar için yeterli proteini yakalar.

Hastalık teşhisi için nanobiyosensörlerin uygulanmasına yönelik yol haritası

Önümüzdeki on yıl içinde, nanoteknolojiye dayalı tanı cihazları kullanıma sunulacak ve binlerce ölçüm çok hızlı ve ucuz bir şekilde gerçekleştirilecektir. Teşhis ile ilgili gelecekteki eğilimler, biyoçip teknolojisini nanometre aralığına taşınmaya devam edecektir. Kan proteinlerinin analizi en yaygın klinik tanı uygulaması olacaktır. Sistemik dolaşımdaki kan, çoğu organın sağlıklı ya da hastalıklı olduğunu belli eder. Bu nedenle, kan moleküler parmak izlerinin saptanması sağlığın ve hastalığın değerlendirilmesini sağlayacaktır.

Moleküler elektronik ve nanoölçekli kimyasal sensörler, bir sıvıdaki kimyasal

maddeleri algılayabilen mikroskopik sensörlerdir. Kandan çok sayıda bilgi sağlayan bu tür cihazlar, makroskopik doku hacminde küçük kimyasalların özelliklerini tahmin eder. Cihaz lokalize yaralanma veya enfeksiyona yanıt olarak dokuların kana verdiği özgül kimyasalları değerlendirmek için kullanılır [46]. Bu gözlemler, cihazların zaman ve uzayda yüksek çözünürlüklü algılama sağlayarak tek hücreli kimyasal kaynağın in vivo olarak kolayca ayırt edilebileceğini göstermektedir.

Yeniliken temel yapıtaşlarından başlayarak teşhis cihazlarını aşağıdan yukarıya inşa etmek olacaktır. Hastalığın teşhisinde nanobiyosensörlerin uzun vadeli kullanımı umut vericidir. Nanobiyosensör uygulamalarını destekleyen minyatürleşme, sinyal yoğunluğunu düşürdüğü için floresan etiketlemeyi tercih etmez; ancak floresan etiketleme yöntemlerini nanopartiküllerle canlı hale getiren bazı iyileştirmeler yapılmıştır. Nanobiyosensörler aynı zamanda polimeraz zincir reaksiyonu içermeyen teşhis teknolojilerinin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır. Ayrıca nanoteknoloji potansiyel olarak genetik teşhis amacıyla tek bir hücrenin analizi için kullanılabilir. Yakın gelecekte, nanodiagnostikler, test bekleme sürelerini azaltabilir. Örnek olarak, bulaşıcı hastalıkları olan hastalar hastaneye gelir gelmez idrar sonuçları çıkar ve hekimlerine ulaşır. Hastalara anında bir reçete verilebilir, böylece hastanın sonuç beklemesi gereken süre kısalmış, endişe azaltılır ve tüm sürecin maliyeti düşer.

Önümüzdeki on yılda, nanobiyoteknolojiye dayalı biyosensörler sadece tanıda değil aynı zamanda teşhisin kişiselleştirilmiş tıbbın tedavisi ve gelişimiyle bağlantılandırılmasında da önemli bir rol oynayacaktır. Nanodiagnostikte yer alan çeşitli teknolojilerin entegrasyonu ve birbirleriyle olan ilişkileri nedeniyle, bu testleri yapan kişiler karar vermede daha aktif bir rol oynayacaktır.

Bir diğer önemli uygulama alanı kanser teşhisi olacaktır. Genetik profil içeren kanserin moleküler teşhisi için yöntemler

şu anda piyasada mevcuttur. Ancak, bir kanser mevcut yöntemlerle tespit edildiğinde tedavi için genellikle çok geçtir. Nanobiyosensörler, ileride kanserin erken teşhisi ve tedavisi için uygulanabilecek biyolojik belirteçlerin saptanmasında hassasiyet sağlayabilir. Bu amaç için nanocihazlar fizibilite aşamasındadır. Bir nanocihaz, herhangi bir belirgin kanseri olmayan hastalarda profilaktik bir önlem olarak uygulanabilir ve kanser gözetimi uzaktan izlenebilir. Bu izleme, kanseri en erken safhalarda tespit edebilir ve uygun terapötik müdahale yapılabilir. Bu izleme cihazları güvenli implantasyon için biyolojik olarak bozunur olmalıdır. Böyle bir gözetim sistemi kişiselleştirilmiş kanser önlemi sağlayacaktır. Erken teşhis tedavi şansını artıracaktır. Böyle bir cihaz, vücut sıvılarından biyolojik belirteçlerin saptanmasına göre daha fazla avantajlara sahiptir [46].

Sonuç olarak, nanoteknolojiler mevcut moleküler tanıların sınırlarını genişletmeyi ve yerinde teşhis yöntemlerinin terapötik maddeler ile entegrasyonunu ve kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesini sağlar. nanoteknolojinin en önemli klinik uygulamaları, biyolojik belirteçlerin keşfedilmesi, kanser teşhisi ve bulaşıcı mikroorganizmaların tayinidir. Nanotıp, teşhis ve terapötiklerin gelişiminde önemli bir rol oynayacaktır.

Nanobiyosensörler, etkin izleme ve hastalığın etkili tedavisi için biyobelirteç derişim düzeylerini sürekli izler. Aynı zamanda, tespit açısından doğru bir yerinde teşhis cihazı olması gerekir. Mümkün olan en iyi çözüm, örneği bir algılama cihazına damlatmak ve örnekte bulunan biyolojik belirteçlerin derişimini sürekli olarak izlemektir.

Referanslar

- [1] Zheng G, Patolsky F, Cui Y, Wang WU, Lieber CM. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. Nat Biotechnol. 2005;23:1294–1301.
- [2] Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. Nat Rev Cancer. 2005;5:161–171.

- [3] Bayer EA, Wilchek M. Biotin-binding proteins, overview and prospects. *Methods Enzymol.* 1990;184:49–51.
- [4] Nam JM, Stoeva SI, Mirkin CA. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J Am Chem Soc.* 2004;126:5932–5933.
- [5] Oh BK, Nam JM, Lee SW, Mirkin CA. A fluorophore-based bio-barcode amplification assay for proteins. *Small.* 2006;1:103–108.
- [6] Di Giusto DA, Wlassoff WA, Gooding JJ, Messerle BA, King GC. Proximity extension of circular DNA aptamers with real-time protein detection. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:e64.
- [7] Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol.* 2002;20: 473–477.
- [8] Gullberg M, Gústafsdóttir SM, Schallmeiner E, et al. Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:8420–8424.
- [9] Fritz J, Baller MH, Lang HP, et al. Biosensor-based label-free assays of amyloid growth. *Science.* 2000;288:316–318.
- [10] Wu G, Datar RH, Hansen KM, Thundat T, Cote RJ, Majumdar A. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nat Biotechnol.* 2001;19:856–860.
- [11] Chen RJ, Bangsaruntip S, Drouvalakis KA, et al. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4984–4989.
- [12] Prime KL, Whitesides GM. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *J Am Chem Soc.* 1993;115:10714–10721.
- [13] Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.* New York, NY, USA: Wiley Interscience; 2000.
- [14] Yogeswaran U, Chen SM. A Review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material. *Sensors.* 2008;8(1):290–313.
- [15] Reddy RK. Nanomonitors: electrical immunoassay for clinical diagnostics implementation of a microfabricated biosensor for the detection of proteins. MSc thesis. Portland, OR, USA: Portland State University; 2007.
- [16] Adamson A, Gast A. *Physical Chemistry of Surfaces.* 6th ed. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 1997.
- [17] Bard A. *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1988.
- [18] Bard A, Parsons R, Jordan J, editors. *Standard Potentials in Aqueous Solution.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1985.
- [19] Hibbert DB. *Introduction to Electrochemistry.* London, UK: Macmillan; 1993.
- [20] Bondar VS, Puzyr AA. Nanodiamonds for biological investigations. *Physics of the Solid State.* 2004;46:761–763.
- [21] Guedon P, Livache T, Martin F, et al. Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem.* 2000;72:6003–6009.
- [22] Homola J, Yee S, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens Actuators B Chem.* 1999;54:3–15.
- [23] van den Berg B, Wain R, Dobson CM, Ellis RJ. Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for protein folding inside the cell. *EMBO J.* 2000;19:3870–3875.
- [24] Goluch ED, Stoeva SI, Lee JS, Shaikh KA, Mirkin CA, Liu C. A microfluidic detection system based upon a surface immobilized biobarcode assay. *Biosens Bioelectron.* 2009;24:2397–2403.
- [25] Hahn MA, Tabb JS, Krauss TD. Detection of single bacterial pathogens with semiconductor quantum dots. *Anal Chem.* 2005;77:4861–4869.
- [26] Gooding JJ. Nanoscale biosensors: significant advantages over larger devices? *Small.* 2006;2:313–315.
- [27] Ramanathan K, Bangar MA, Yun M, Chen W, Myung NV, Mulchandani A. Bioaffinity sensing using biologically functionalized conducting-polymer nanowire. *J Am Chem Soc.* 2005;127:496–497.
- [28] Cui Y, Lieber CM. Functional nanoscale electronic devices assembled using silicon nanowire building blocks. *Science.* 2001;291:851–853.
- [29] Desai T, Hansford D, Ferrari M. Characterization of micromachined silicon membranes for immunisolation and bioseparation applications. *J Memb Sci.* 1999;159:221–231.
- [30] Desai TA, Hansford DJ, Ferrari M. Micromachined interfaces: new approaches in cell immunisolation and biomolecular separation. *Biomol Eng.* 2000;17:23–36.
- [31] Desai T, Hansford D, Kulinsky L, et al. Nanopore technology for biomedical applications. *Biomed Microdevices.* 1999;2:11–40.
- [32] Sheehan PE, Whitman LJ. Detection limits for nanoscale biosensors. *Nano Lett.* 2005;5:803–807.
- [33] Zimmerman SB, Minton AP. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1993;22:27–65.
- [34] Zimmerman SB, Trach SO. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli.* *J Mol Biol.* 1991;222:599–620.
- [35] Ellis RJ. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:597–604.
- [36] Dobson CM. Chemical space and biology. *Nature.* 2004;432: 824–828.
- [37] Minton AP. Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophys J.* 2005;88: 971–985.
- [38] Ellis RJ. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:395–401.
- [39] Ellis RJ, Minton AP. Cell biology: join the crowd. *Nature.* 2003;425: 27–28.
- [40] Ellis RJ, Pinheiro TJ. Medicine: Danger-misfolding proteins. *Nature.* 2002;416:483–484.
- [41] Hall D, Minton AP. Macromolecular crowding: qualitative and semi-quantitative successes, quantitative challenges. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1649:127–139.
- [42] Minton AP. Macromolecular crowding. *Curr Biol.* 2006;16: R269–R271.
- [43] van den Berg B, Ellis RJ, Dobson CM. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* 1999;18: 6927–6933.
- [44] Baszkin A, Norde W. *Physical Chemistry of Biological Interfaces.* New York, NY, USA: MarcelDekker; 2000.
- [45] Jain KK. Role of nanodiagnostics in personalized cancer therapy. *Clin Lab Med.* 2012;32:15–31.
- [46] Jain KK. Synthetic biology and personalized medicine. *Med Princ Pract.* 2013;22:209–219.