

ÖZET**MANYETİK LEVİTASYON DÜZENEGİ İÇİNDE MERCEKSİZ HOLOGRAFİK
MİKROSKOBİ GÖRÜNTÜLEME TEKNİĞİNİ KULLANILARAK PROTEİN TESPİTİ**

10 Buluş, manyetik levitasyon platformuna entegre edilen merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği ile biyomolekül tespit edilmesi ile ilgilidir.

1. Biyomolekül tespit eden manyetik levitasyon platformu olup özelliği;

- 10 • Aynı kutuplar birbirine bakacak şekilde düzenlenmiş üst mıknatıs (5) ve alt mıknatıs (7) olmak üzere iki adet mıknatıs ve bahsedilen mıknatısların (5,7) arasında yerleştirilen ve analiz edilecek numunenin aktarıldığı bir kapiler kanal (6) içeren manyetik levitasyon düzeneği (2),
- 15 • Manyetik levitasyon düzeneğine (2) entegre edilen en az bir noktasal ışık kaynağı (8) ve üzerinde herhangi bir optik eleman bulunmayan en az bir görüntü sensörü (4) içeren merceksiz holografik mikroskop sistemi (3) içermesidir.

2. İstem 1 'e uygun biyomolekül tespit eden manyetik levitasyon platformu olup özelliği; bahsi geçen noktasal ışık kaynağının LED, lazere eşlenmiş fiber optik kablo ve/veya iğne deliği olmasıdır.

3. İstem 1 'e uygun biyomolekül tespit eden manyetik levitasyon platformu olup özelliği; Kapiler kanalın (6) görüntü sensörünün (4) üzerine 1mm'den daha az bir mesafe kalacak şekilde yerleştirilmesidir.

4. İstem 1 'e uygun biyomolekül tespit eden manyetik levitasyon platformu olup özelliği; bahsi geçen görüntü sensörünün (4) CMOS veya CCD görüntü sensörü olmasıdır.

5. Biyomolekül tespit cihazı olup özelliği; İstem 1'e uygun manyetik levitasyon platformunu içermesidir.

6. Merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği entegre edilen manyetik levitasyon platformu ile biyomolekül tespit yöntemi olup özelliği;

- 30 • Noktasal ışık kaynağı (8) önüne yerleştirilen bir iğne deliği ile ışığın uzamsal filtrelenmesi,
- Görüntü sensörü (4) önünde iki mıknatıs (5,7) arasında konumlandırılmış kapileri kanal (6) içerisindeki analiz edilecek numunenin aydınlatılması,
- 35 • Numuneden kıran ışığın arka planda bulunan referans ışık ile girişimi sonucu oluşan hologramların elde edilmesi ve kaydedilmesi,

- 5
- Kaydedilen hologramlar sensör düzleminden numunenin olduğu sensöre dik ekseninde (z-ekseni) dijital olarak taranarak nesnelerin odakta olduğu düzlemin bulunması
 - Manyetik duyarlılık değişiminden kaynaklanan levitasyon yüksekliğindeki değişimin ölçülerek biyomolekül tespitinin gerçekleşmesi

10 işlem adımları içermesidir.

7. İstem 6' ya uygun biyomolekül tespit yöntemi **olup özelliği**; protein tespitinde polimerik ve paramanyetik küreciklerin kullanılması

8. İstem 7' ye uygun biyomolekül tespit yöntemi **olup özelliği**; polimerik ve paramanyetik küreciklerin tespit edilmek istenen proteini algılayacak moleküller ile kaplanması

15

20

25

30

MANYETİK LEVİTASYON DÜZENİĞİ İÇİNDE MERCEKSİZ HOLOGRAFİK MİKROSKOBİ GÖRÜNTÜLEME TEKNİĞİNİ KULLANILARAK PROTEİN TESPİTİ

10 Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Buluş, klinik ve araştırma laboratuvarları ile günlük hayatta hasta başı testlerde (POC) kullanılabilecek biyomedikal bir cihaz ile ilgilidir.

Buluş, medikal sektöründe birçok farklı hastalığın teşhis ve takibinde kullanılabilecek testlere yönelik özelleşebilecek niteliktedir.

15 Buluşla İlgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)

Manyetik levitasyon prensibi ile protein saptanması için geleneksel bir mikroskop sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Platform mikroskop tablasına yerleştirilerek platform üzerinde bulunan aynalar yardımıyla mikroskobun ışık kaynağından gelen ışık huzmesi mikrokapileri kanaldan geçirilerek objektifte toplanması sağlanıp görüntü elde edilmektedir. Bu nedenle platform ancak bu cihazların bulunduğu ve kullanma beceri ve eğitimine sahip teknik personelin olduğu laboratuvarlarda işlevsel olmaktadır.

Geleneksel mikroskoplarda görüntü elde etmek için kullanılan en düşük büyütme gücündeki objektif (örn. 5x) dahi mikrokapileri kanaldan ancak belli bir bölümünün görüntülenmesine izin vererek özellikle akış altında yapılan testlerde saptama hassasiyet ve spesifitesinin düşmesine sebep olmaktadır.

Benzer şekilde, önceki teknikte mikroskoba yerleştirilen manyetik levitasyon platformunda mikroparçacıkların konumlarının doğru hesaplanabilmesi için mikhatıf ve mikrokapileri kanal kenarlarının ayrı ayrı ile odaklanılarak belirlenmesi ve bu koordinatlar referans alınarak kanal içerisindeki mikroparçacıkların yüksekliklerinin saptanması ile özkütleleri hesaplanabilmektedir. Fakat, platformun farklı kesitlerine her işlemde tekrar odaklanılarak kalibre edilmesi hem iş yüküne hem de insan hatasına ve ölçümler arasında tutarsızlıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

Tekniğin bilinen durumunda manyetik levitasyon sistemi protein-ligand bağlanması incelenmesinde kullanılmaktadır. Bu bağlamda protein-ligand bağlanmasına bağlı olarak mikroparçacıkların levitasyon yüksekliğindeki değişimi incelenmektedir. Levitasyon yüksekliği-

5 yoğunluk korelasyonundan, levitasyon yüksekliği deneysel olarak belirlenen parçacıkların, üzerlerine bağlanan protein miktarını hesaplanabilmektedir.

WO 2018/089760 A1 numaralı patent dokümanında manyetik levitasyon ile en az bir antikor kaplı kürecik ile en az bir antijenin kompleks oluşturarak manyetik alan varlığında manyetik levitasyon yüksekliği değişikliği ile antijen tespit yöntemi ile ilgilidir. Hedef antijenin 10 bağlanması sonucu değişen mikroparacık özkütlesi üzerinden tayin yapılmaktadır.

Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

Buluşun öncelikli amacı manyetik levitasyon platformuna entegre edilen merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği ile protein tespitinin gerçekleşmesidir.

15 Buluşta manyetik levitasyon yüksekliğinin değişerek protein tespitinin gerçekleşmesi mikroparacıklara bağlanan proteinden kaynaklı özkütle değişiminden değil, mikroparacıklara bağlı hedef proteine özgül olarak bağlanan paramanyetik özellikteki nano-parçacıklar nedeniyle meydana gelen manyetik duyarlılığ değişiminden kaynaklanmaktadır.

Buluş ile, manyetik levitasyon platformuna entegre edilen merceksiz holografik mikroskop 20 sistemi, görüntüleme için geleneksel mikroskop sistemlerine olan ihtiyaç ortadan kaldırılmıştır. Böylelikle, elde taşınabilecek kadar kompakt ve portatif olmasından dolayı sadece geleneksel mikroskop sistemlerinin olduğu araştırmaya ya da klinik laboratuvarlara olan bağımın ortadan kaldırılmıştır.

Buluş merceksiz holografik mikroskop sisteminde herhangi bir hassas ve pahalı optik eleman 25 (mercek, ayna, filtre vb.) kullanılmadığı için hem çok daha portatif, hafif ve ucuz bir tasarım elde edilmekte ve hem de çevresel faktörlere karşı geleneksel mikroskop sistemlerine göre çok daha dayanıklıdır. Böylelikle laboratuvarlar dışında günlük hayatta rahatlıkla kullanılabilmektedir.

Buluşta mercek kullanılmadan mikrokapileri kanal, görüntü sensörü üzerine yerleştirilerek 30 kanal içerisindeki mikroparçacıkların hologramları kaydedilip dijital olarak işlenerek görüntüler elde edildiği için görüntüleme süreci büyük ölçüde platformun fiziksel koşullardan ve kullanan kişinin bilgi ve tecrübesinden bağmsız olarak otonom olarak sürdürülebilmektedir. Kaydedilen hologramlar dijital olarak sensör düzleminden görüntülenen mikroparçacıkların olduğu düzleme doğru tarandığı için bu aralıkta bulunan miktarda ve kapileri kanala herhangi 35 bir elle odaklama işlemi gerektirmeksizin otomatik olarak odaklanıp, koordinatları saptanabilmekte ve konumları saptanan mikroparçacıkların bu koordinatlara göre pozisyonları otomatik olarak hesaplanabilmektedir.

- 5 Geleneksel mikroskop sistemlerine göre çok daha büyük (40x mikroskop objektiflerine göre 50 kattan fazla) bir kapileri alan görüntülenebildiği için daha hassas ölçümler mümkün olabilmektedir. Özellikle akış gerektiren ölçümlerde mikroparçacıkların konumları daha uzun bir kapileri mesafesi boyunca dengelenmesi gözlemlenerek daha hassas bir şekilde özkütlelerin hesaplanabilmesi mümkün olabilmektedir. Daha geniş bir alan görüntülediği için aynı zamanda birden fazla farklı biyofiziksel özellikte mikroparçacıklar da aynı anda hassas ve spesifik bir şekilde görüntülenmesini mümkün klabilmektedir.

Buluşu Açıklayan Şekillerin Tanımları

- 15 Bu buluşla geliştirilen, manyetik levitasyon platformuna entegre edilen merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği ile protein tespiti için daha iyi anlaşılabilmesi için hazırlanan şekiller aşağıda açıklanmaktadır.

Şekil 1: (a) Merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği entegre edilen manyetik levitasyon platformunun gösterimi. (b) Platformun kesit görüntüsü.

- 20 **Şekil 2:** Manyetik levitasyon ilkesi kullanarak protein tahlil yönteminin şematik gösterimi. g ve B, sırasıyla yerçekimi ve manyetik akı yoğunluğunu göstermektedir.

- Şekil 3:** Manyetik levitasyon platformundaki mikroküreciklerin 30 dakika sonraki denge görüntüleri gösterilmektedir. (a) Merceksiz holografik mikroskop sistemi (MHMS) ve (b) Zeiss Axio Vert A1 çevrik ışık mikroskobu ile 5X objektif altında alınan mikrokürecik görüntüleri. MHMS'deki kesikli dikdörtgen, ışık mikroskobundaki görüş alanını göstermektedir. Ölçek çubukları 200 µm.

- Şekil 4:** Kaydedilen hologramlar ve bunlara karşı gelen sırasıyla (a) proteinsiz test (0 ng/mL biyotinlenmiş serum albumini (b-SSA)), (b) 1 ng/mL b-SSA ve (c) 10 ng/mL b-SSA testlerinin yeniden yapılandırılmış görüntüleri. Ölçek çubukları 200 µm.

- Şekil 5:** Proteinsiz test, 1 ng/mL ve 10 ng/mL b-SSA testleri için kapileri içindeki s-PMK'lerin levitasyonunun yüksekliği (s-PMK'lerin alt miktardan uzaklığı). Veriler, Tukey'in post hoc analiziyle kombine edilen tek yönlü ANOVA kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiş ve her test grubunun ortalama levitasyon yüksekliğinin anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

5 **Buluşu Oluşturan Unsurlar/Kısımlar/Parçalar/Tanımlar**

Bu buluşla geliştirilen merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği entegre edilen manyetik levitasyon platformunun daha iyi açıklanabilmesi için örnek olarak verilen süreç için hazırlanan şekillerde yer alan parçalar/kısımlar/unsurlar ayrı ayrı numaralandırılmış olup her bir numaranın açıklaması aşağıda verilmektedir.

10

1. Gövde
2. Manyetik Levitasyon Düzeneği
3. Merceksiz Holografik Mikroskop Sistemi
4. Görüntü Sensörü

15

5. Üst mıknatıs
6. Kapiler Kanal
7. Alt mıknatıs
8. Noktasal ışık kaynağı

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

20 Buluş merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği entegre edilen ve biyomolekül tespit eden tercihen protein tespit eden manyetik levitasyon platformu, Şekil 1’de gösterildiği üzere temel olarak 3 boyutlu yazılı olan bir bütün olarak çıkarılan ve düzenek elemanlarının üzerinde taşıyan gövde (1), manyetik levitasyon düzeneği (2) ve merceksiz holografik mikroskop sistemi (3) ’ni içermektedir.

25 Buluş merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği entegre edilen manyetik levitasyon platformu, biyomolekül tercihen protein tespit cihazına entegre edilebilmektedir.

Manyetik levitasyon düzeneği (2) ise aynı kutupları birbirine bakacak şekilde düzenlenmiş üst mıknatıs (5) ve alt mıknatıs (7) olmak üzere iki adet neodümyum (NdFeB) mıknatıs bahsedilen mıknatısların (5,7) arasında yerleştirilen ve analiz edilecek numunenin aktarıldığı

30 birkapiler kanal (6) içermektedir. Kapiler kanal (6) görüntü sensörünün (4) üzerine 1mm’den daha az bir mesafe kalacak şekilde yerleştirilmektedir.

Merceksiz holografik mikroskop sistemi (3) en az bir noktasal ışık kaynağı (8) tercihen noktasal ışık kaynağı ve üzerinde herhangi bir optik eleman bulunmayan en az bir görüntü

5 sensörü (4) içermektedir.

Buluş manyetik levitasyon platformuna entegre edilen merceksiz holografik mikroskop sisteminde (3) bir noktasal ışık kaynağı (8) olan LED önüne yerleştirilen bir iğne deliği ile ışık filtrelenerek görüntü sensörü (4) önünde iki miktarda (5,7) arasında konumlandırılmış kapileri cam kanal içerisindeki mikroparçacıklar aydınlatmakta ve bu süreç sonunda hologramlar kaydedilerek gerçek görüntüler elde edilmektedir.

Kapiler kanalda rastgele dağılan parçacıklar, yerçekimine paralel olan manyetik alan altında bir denge yüksekliğine doğru hareket etmektedirler. Bir parçacığın manyetik levitasyon platformundaki denge yüksekliği, parçacık üzerine etkiyen manyetik kuvvet (F_{mag}) ve kaldırma kuvveti (F_b) arasındaki dengeye bağlıdır. Aynı paramanyetik sıvıya yerleştirilen cisimler, manyetik levitasyon altında manyetik duyarlılık ya da yoğunluklarındaki farklarına bağlı olarak farklı karakteristik denge yüksekliğine ulaşmaktadırlar (Denklem 1).

$$F_{mag} - F_b = 0$$

$$\frac{\Delta\chi}{\mu_0} \left(B_x \frac{\partial B_z}{\partial x} + B_y \frac{\partial B_z}{\partial y} + B_z \frac{\partial B_z}{\partial z} \right) - \Delta\rho g = 0 \quad (\text{Denklem 1})$$

20 ($\Delta\chi$: parçacık ile paramanyetik ortam arasındaki manyetik duyarlılık farkı, μ_0 : boş alan geçirgenliği ($1.2566 \times 10^{-6} \text{ kg} \cdot \text{m} \cdot \text{A}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$), B : manyetik indüksiyon, g : z yönündeki yerçekimi ivmesi (9.8 ms^{-2}), $\Delta\rho$: parçacık ile paramanyetik ortam arasındaki özkütle farkı)

Buluş manyetik levitasyon platformuna entegre edilen merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği ile protein tespitinde; polimerik (6 mikrometre boyutlarında) ve paramanyetik (50 nanometre boyutlarında) olmak üzere iki tip kürecik kullanılmaktadır. Paramanyetik Gd^{+3} iyonları içeren solüsyon içerisinde polimerik (polistiren) kürecikler diamanyetik özelliklerinden dolayı levitasyon platformunda manyetik gücün minimum olduğu lokasyona hareket edip denge yüksekliğine ulaşırken paramanyetik özellikteki nano-boyutlu kürecikler manyetik gücün maksimum olduğu noktaya hareket etme eğilimindedir.

30 Hedef protein molekülü algılamak için polimerik ve paramanyetik kürecikler tespit edilmek istenen proteini algılayacak moleküllerle tercihen antikorlar ile kaplanmaktadır.

Buluşun bir uygulamasında; hedef biyotinlenmiş sığır serum albumini (b-SSA) molekülünü algılamak için streptavidin molekülü ile kaplı mikro-boyutlu polimerik kürecikler (s-PMK) ve streptavidin kaplı manyetik nanokürecikler (s-MNK) kullanılmıştır. Bu doğrultuda s-PMK, streptavidin-biotin etkileşimi yoluyla b-SSA'ları yüzeyine özgül olarak yakalamaktadır. s-MNK ise polimer kürecik-albumin kompleksine (s-PMK+b-SSA) özgül olarak bağlanarak kompleksin

5 manyetik duyarlılığı arttırmakta ve böylece mikhatısa daha yakın bir noktada denge yüksekliğine ulaşmasını sebep olmaktadır (Şekil 2).

s-PMK'ler miktar tayini yapılacak farklı konsantrasyonlardaki (0 ng/mL, 1 ng/mL ve 10 ng/mL) b-SSA'lar ile 30 dakika boyunca inkübe edilerek hedef biyo-molekülün kompleks üzerine bağlanması sağlanmaktadır. Ardından test solüsyonu 5 dakika boyunca 13500 rpm
10 de santrifüjlenmekte ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Daha sonra s-PMK'lerin süspansiyon edildiği test ortamına s-MNK'ler eklenerek 15 dakika boyunca s-PMK+ b-SSA kompleksine bağlanması hedeflenmektedir. Son olarak mikrokürecikler paramanyetik solüsyon ile karıştırılarak kapiler kanala yüklenmektedir.

s-MNK'lerin bağlanması ile manyetik duyarlılığı değişen s-PMK'lerin denge levitasyon
15 yüksekliğinde protein içermeyen duruma göre gözlemlenebilir bir değişim meydana gelmekte ve bu değişim düzenek üzerindeki merceksiz holografik mikroskop sistemi (MHMS) ile elde edilen görüntüler ile belirlenebilmektedir (Şekil 3 ve 4). Şekil 4 'te soldaki sütunda kaydedilen hologramlar, sağdaki sütunda ise kaydedilen hologramlara karşılık gelen sırasıyla (a) proteinsiz test (0 ng/mL biyotinlenmiş sığır serum albumini (b-SSA)), (b) 1 ng/mL b-SSA ve
20 (c) 10 ng/mL b-SSA testlerinin yeniden yapılandırılmış görüntüleri gösterilmektedir. Levitasyon yüksekliğindeki değişim miktarı analiz edilerek, polimerik küreciğe bağlanan hedef biyo-molekülün miktarı belirlenebilmektedir.

Buluş merceksiz holografik mikroskopi sistemindeki noktasal ışık kaynağı(8); LED veya lazere eşlenmiş fiber optik kablo ve/veya iğne deliği olabilmektedir.

25 Buluşun bir uygulamasında merceksiz holografik mikroskopi sistemindeki görüntü sensörü; CMOS veya CCD olmaktadır

Buluş merceksiz holografik mikroskop görüntüleme tekniği entegre edilen manyetik levitasyon platformu ile biyomolekül tespit yöntemi,

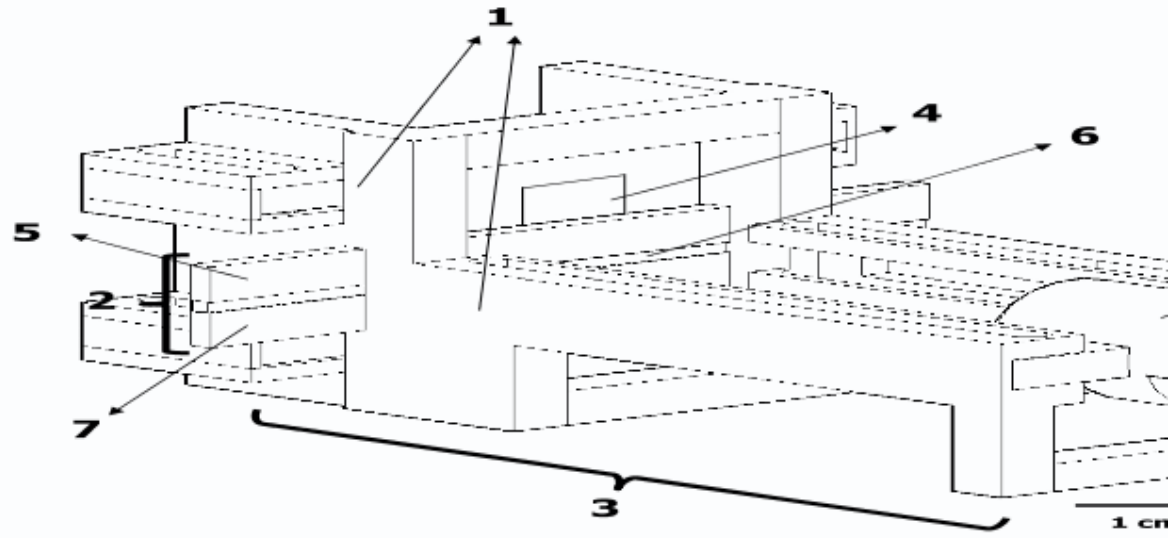
- Noktasal ışık kaynağı(8) önüne yerleştirilen bir iğne deliği ile ışığın uzamsal
30 filtrelenmesi,
- Görüntü sensörü (4) önünde iki mikhatı(5,7) arasında konumlandırılmış kapileri kanal (6) içerisindeki analiz edilecek numunenin aydınlatılması,
- Numuneden geçen ışığın arka planda bulunan referans ışık ile girişimi sonucu oluşan hologramların elde edilmesi ve kaydedilmesi,
- Kaydedilen hologramların sensör düzleminden numunenin olduğu sensöre dik
35 ekseninde (z-ekseni) dijital olarak taranarak nesnelerin odakta olduğu düzlemin bulunması

- 5
- Manyetik duyarlılık değişiminden kaynaklanan levitasyon yüksekliğindeki değişimin ölçülerek biyomolekül tespitinin gerçekleşmesi

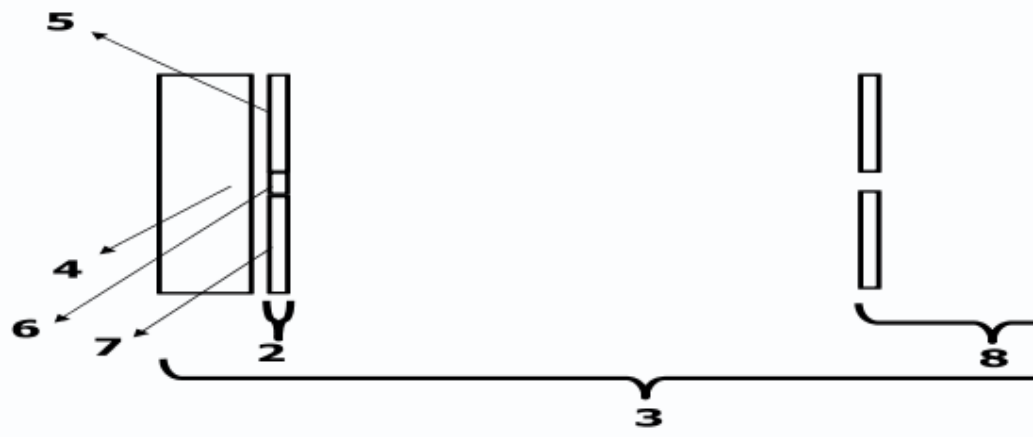
İşlem adımları aşağıda gösterilmektedir.

- Numune görüntü sensörüne (4) çok yakın olduğu için mikroparçacıklardan oluşan ışık herhangi bir girişimde bulunmayan referans ışık ile sensör düzleminde bir girişim deseni (hologram) oluşturarak dijital olarak kaydedilmektedir. Daha sonra kaydedilen hologram, Açık Spektrum ya da Fresnel Kırınım yöntemleri ile sensör düzleminde mikroparçacıkların olduğu sensöre dik ekseninde (z-ekseni) dijital olarak taranarak nesnelerin odakta olduğu düzlem bulunmaktadır. Bu işlem her farklı değeri için görüntüde bulunan nesnelerin kenarlarından (piksellerin belli bir yöndeki gradyanından) netliğini hesaplayan otomatik odaklama algoritması ile yapılmaktadır. Bu süreçte sensör düzlemine göre farklı yüksekliklerde bulunan nesnelerin (mikhatlar ve mikrokapileri kanal gibi) yapılandırılan hologramlardan konumları otomatik olarak hesaplanarak kanal içinde bulunan odaklanmış mikroparçacıkların alt mikhatlara göre uzaklığı yani levitasyon yüksekliği, dolayısıyla özkütleleri ve manyetik duyarlılıkları otomatik olarak hesaplanabilmektedir.
- 20 Farklı merkezi dalgaboyu ve bant genişliğinde kullanılan ışık kaynağı ile görüntülenen numunenin optik geçirgenlik özelliklerine göre ışığın belirli kısmı soğrulabilmekte ya da saçılabilmekte ve sensör düzleminde kaydedilen hologramlar daha sonra işlenerek elde edilen farklı kanallardaki görüntülerden (gerçek, sanal, genlik ya da faz) nesnenin 3 boyutlu geometrik bilgileri ve iç yapısı hakkında bilgi elde edilebilmektedir. Benzer şekilde, ışık kaynağının numuneye olan farklı uzaklıkları için elde edilen uzaysal çözünürlük değerleri değişebilmektedir. Önerilen platformda bu mesafe 5 cm düzeyindedir.

- Ayrıca yukarıda bahsedilen yapılar dışında sadece görüntü sensörü, mikhatlar ve numunenin yükleneceği mikrokapileri kanaldan oluşan bir platformda harici bir ışık kaynağı kullanılabilmektedir. Örneğin görüntü sensörü üzerine tekabül eden mikrokapileri kanalın üstündeki bir açıklığa yerleştirilecek herhangi bir ticari cep telefonunun arka kamerasına entegre ışık kaynağı ile bu platformda görüntüleme yapılabilir. Bu durumda mikrokapileri kanal üstünde bulunan açıklığa daha tutarlı bir ışık kaynağı elde ederek yüksek çözünürlükte veri elde edebilmek için bir alçak geçiren özellikte bir filtre eklenerek ışık istenilen bant genişliğine yakın bir değerde elde edilebilmektedir.



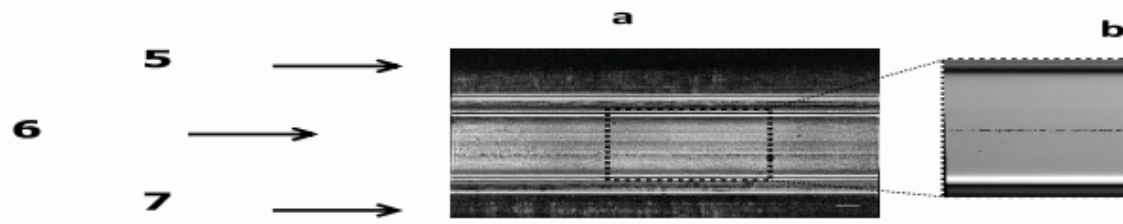
Şekil 1a



Şekil 1b

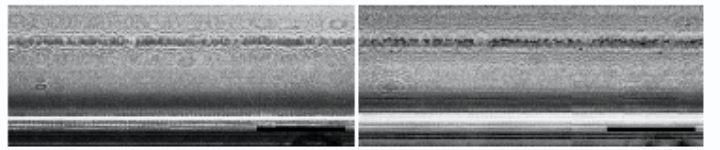


Şekil 2

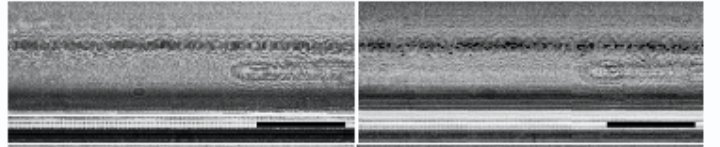


Şekil 3

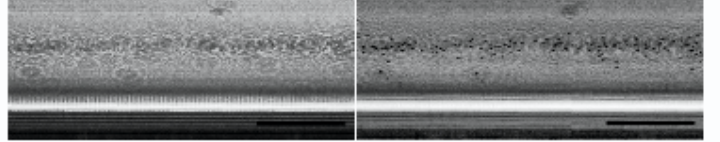
a



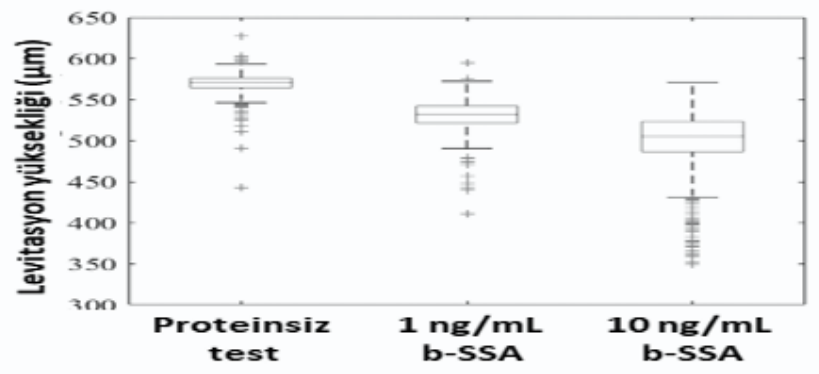
b



c



Şekil 4



Şekil 5