BİYOMÜHENDİSLİK LABORATUVARI I

Deney 7

Moleküler Floresans Spektroskopisi ve BSA'nın Miktar Tayini

Aralık 2020, Istanbul

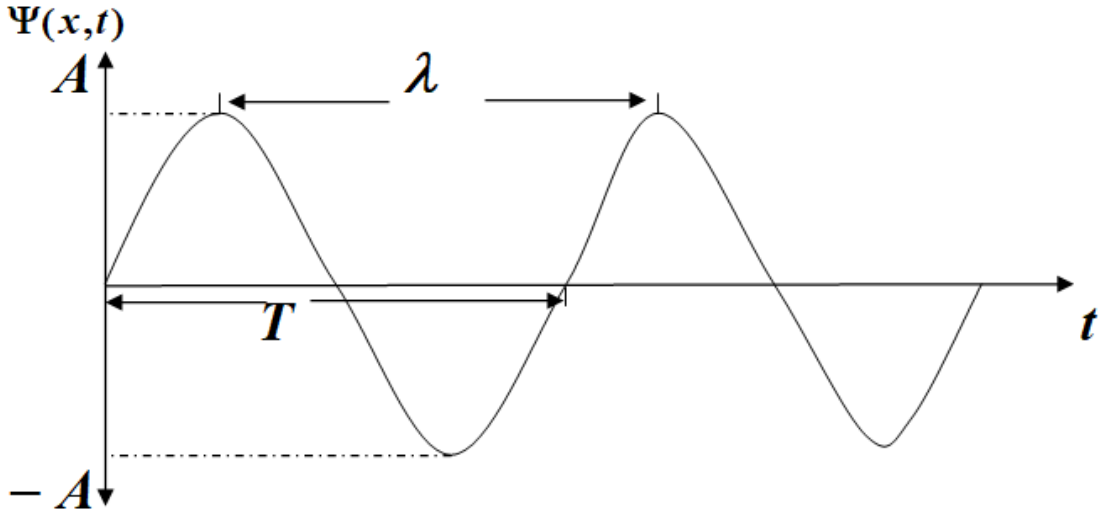
Spektroskopi

- Maddelerin ışıkla olan etkileşimlerini çalışan, maddelerin soğurduğu ve yaydığı ışığı veya daha genel bir ifadeyle elektromanyetik dalgaları tespit ederek maddenin yapısı hakkında bilgi edinilmesini sağlayan tekniklerdir.
- atomların elektronik yapılarını tayin etmede kullanılan deneysel tekniklerin en önemlisidir.

Spektroskopi Yöntemleri

- UV-Görünür Bölge Spektroskopisi
- Atomik Absorbans Spektroskopisi
- IR (infrared) spektroskopisi
- Kütle Spektroskopisi
- NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) Spektroskopisi
- **Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi**

IŞIN (ELEKTROMAGNETİK DALGA)

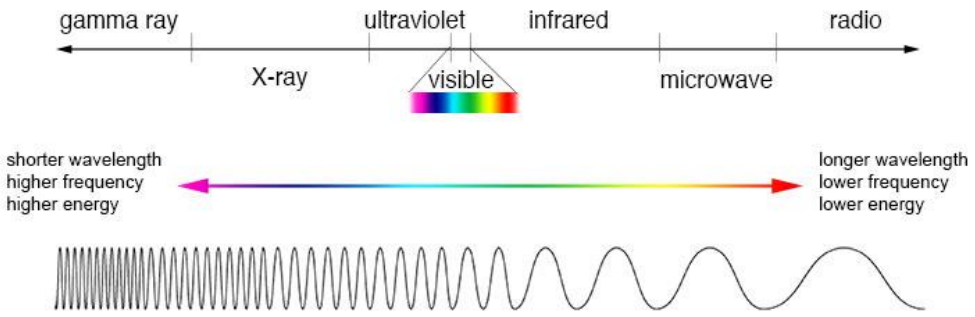


$$f = \frac{v}{\lambda}.$$

- DALGA BOYU:(λ) Işının dalga hareketindeki ard arda gelen iki maksimumu (veya iki minimum) arasındaki mesafedir.
- PERİYOD: (T) Işının dalga hareketinin tekrarlanması için gereken zamandır.
- GENLİK: (A) Işının dalga hareketinin maksimum noktasının yatay eksene olan uzaklığıdır.
- FREKANS: (ν) Bir noktadan birim zamanda geçen dalga sayısıdır.

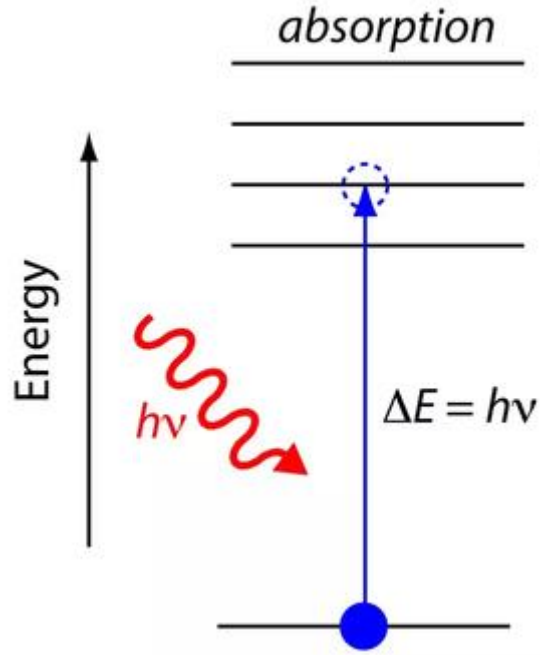
Işık – Madde Etkileşimi

- Maddenin yüzeyleri arasına giren ışının, ortamda bulunan atom ve moleküllerle etkileşerek maddenin özelliklerine göre geçer, tutulur veya saçılır.
- Elektromanyetik ışın ortamdan çok büyük hızlarda geçen bir enerji tipidir, geniş bir dalga boyu (enerji) aralığını kapsar. **Frekanslarına bağlı olarak madde ile etkileşimleri farklı olur.**



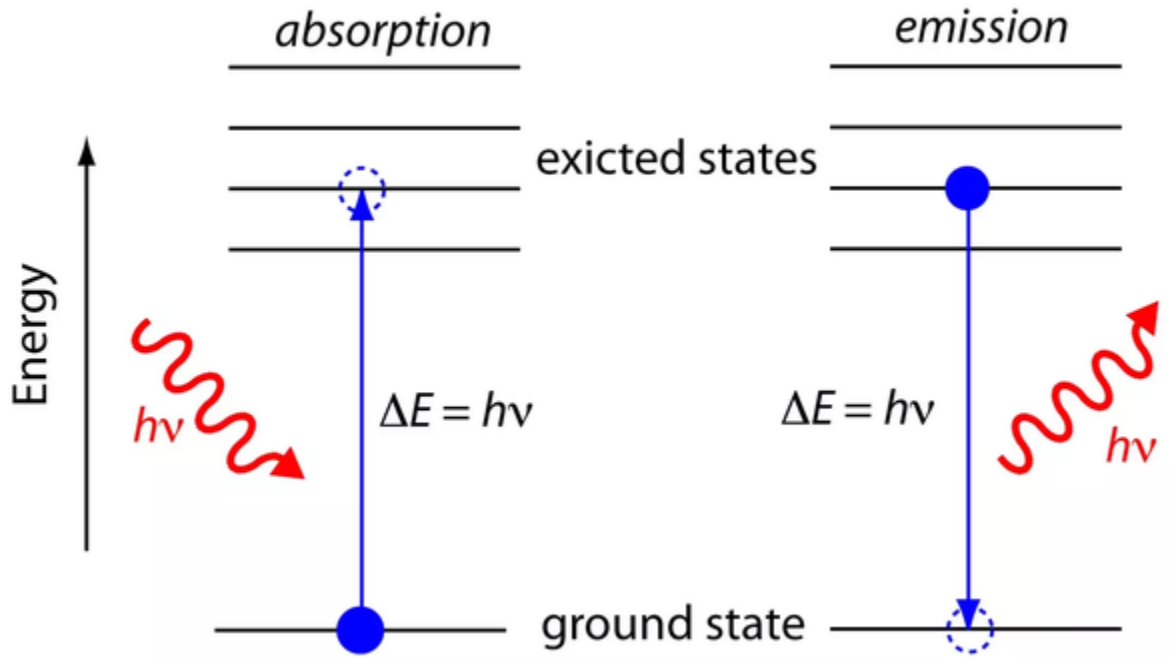
Işık – Madde Etkileşimi: Absorbsiyon

- Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolması **absorbsiyon** olarak tanımlanır.
- Absorpsiyonla, ışın enerjisi maddenin iyon, atom veya moleküllerine aktarılır.
- Böylece, ışın enerjisini absorplamış **olan iyon, atom veya moleküller** uyarılmış hale geçerler.

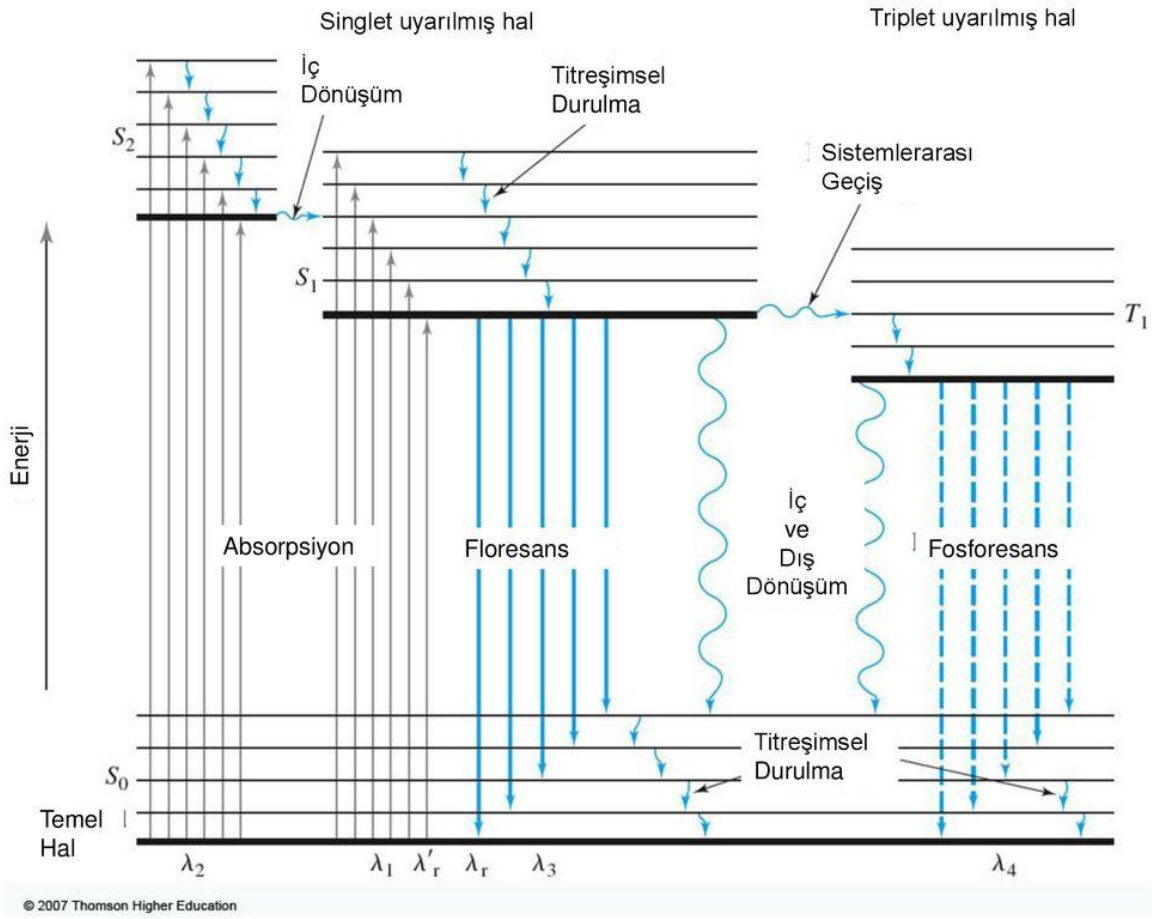


Işık – Madde Etkileşimi: Emisyon

- Bir molekülün yüksek enerji düzeyinden daha düşük enerji düzeyine geçiş yaparken, sahip olduğu fazla enerjiyi foton olarak yaymasına **emisyon** denir.



Uyarılmış → Temel Hal geçişleri

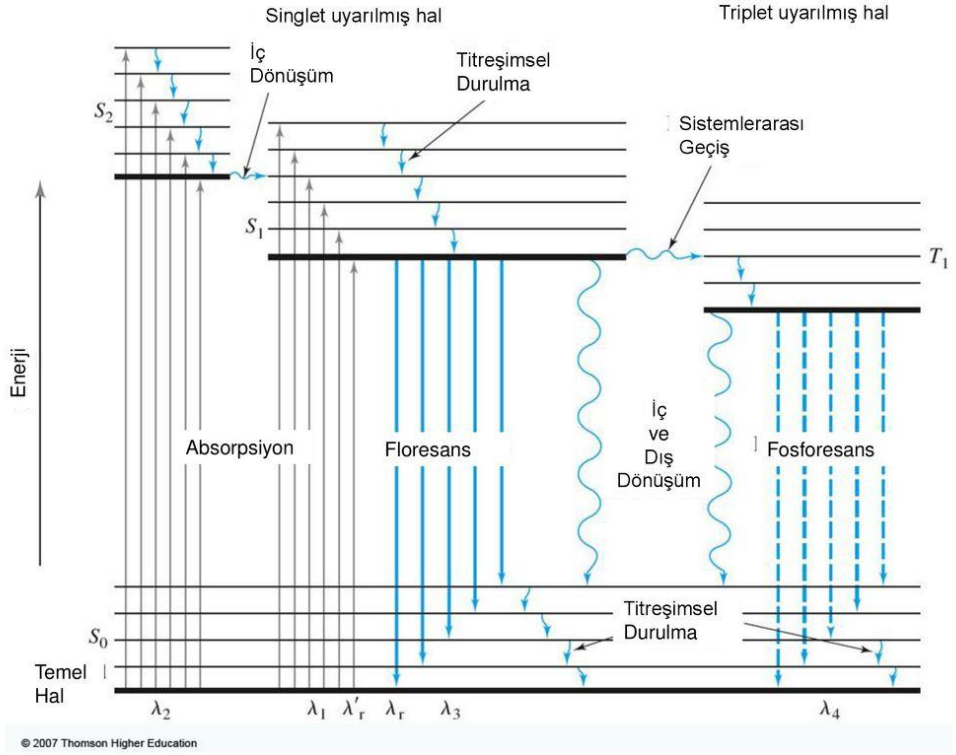


jablonski diagram

Uyarılmış → Temel Hal geçişleri

Işımasız Temel Hale dönüş:

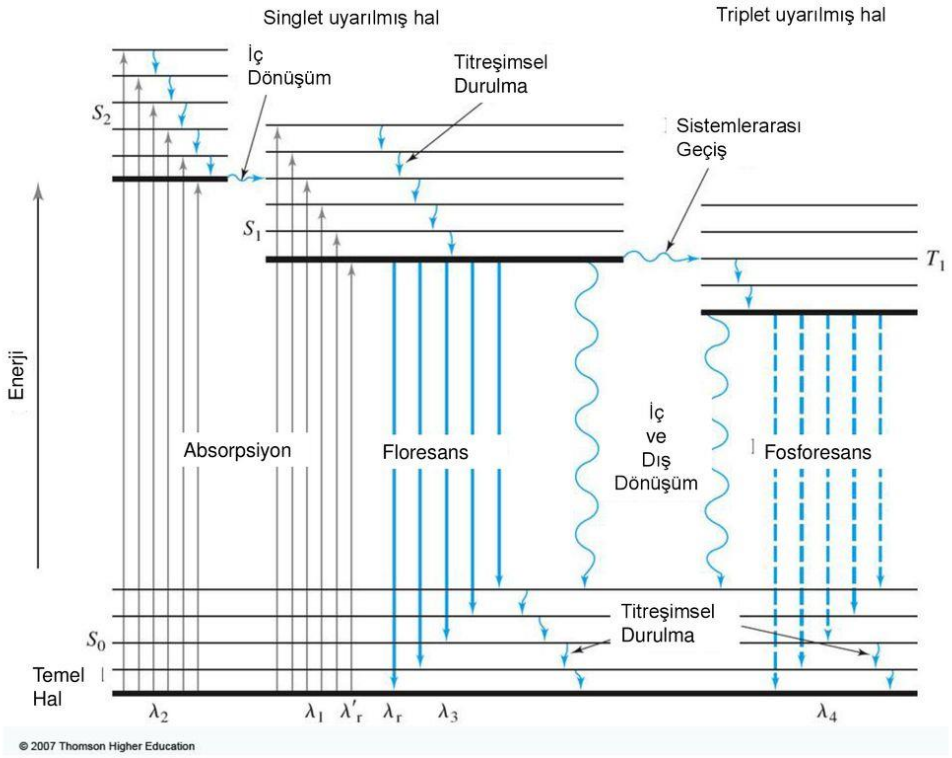
- *Titreşimsel Durulma:* Titreşimsel olarak uyarılmış moleküllerin aşırı enerjisinin çözücü moleküllerine aktarmasıdır.
- *İç Dönüşüm (Geçiş):* Uyarılmış bir molekülün, yüksek elektronik düzeyinin en alt titreşim düzeyinden daha düşük enerjideki başka bir elektronik düzeyin üst titreşim düzeyine geçmesidir.



Uyarılmış → Temel Hal geçişleri

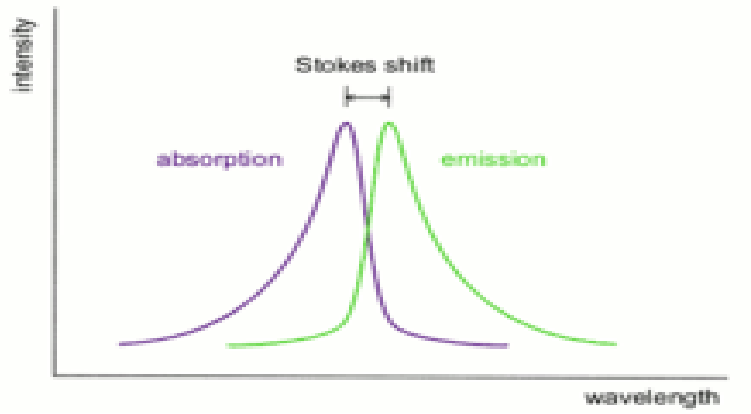
Işımalı Temel Hale Dönüş (lüminesans):

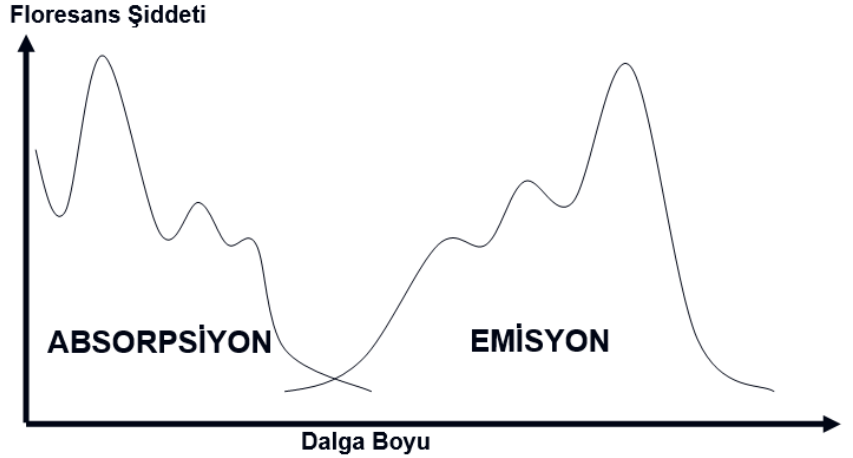
- *Floresans*: Fosforesansdan çok daha hızlı oluşur ve uyarılma anından sonra 10-5 saniye veya daha kısa bir süre içinde tamamlanır
- *Fosforesans:* Işın absorbsiyonundan sonra 10-5 saniyeden büyük periyotlarda başlar, dakikalarca hatta saatlerce devam edebilir.
- *Rezonans Floresansı:* Floresans dalga boyu, uyarma ışığınınki ile aynı olduğu duruma denir.



Absorbsiyon ve Emisyon

- Madde, bir foton soğurduğunda enerji kazanarak uyarılmış duruma geçer. Ancak kararlı hale geçmek için foton yayarak **yani emisyon(ışıma, foton yayma) yaparak enerjisini verir. Yayılan bu fotonun enerjisi soğrulan fotonun enerjisinden daha az bir enerjiye sahiptir. Bu enerji farkı Stokes Kayması (Stokes Shift) olarak adlandırılır.**



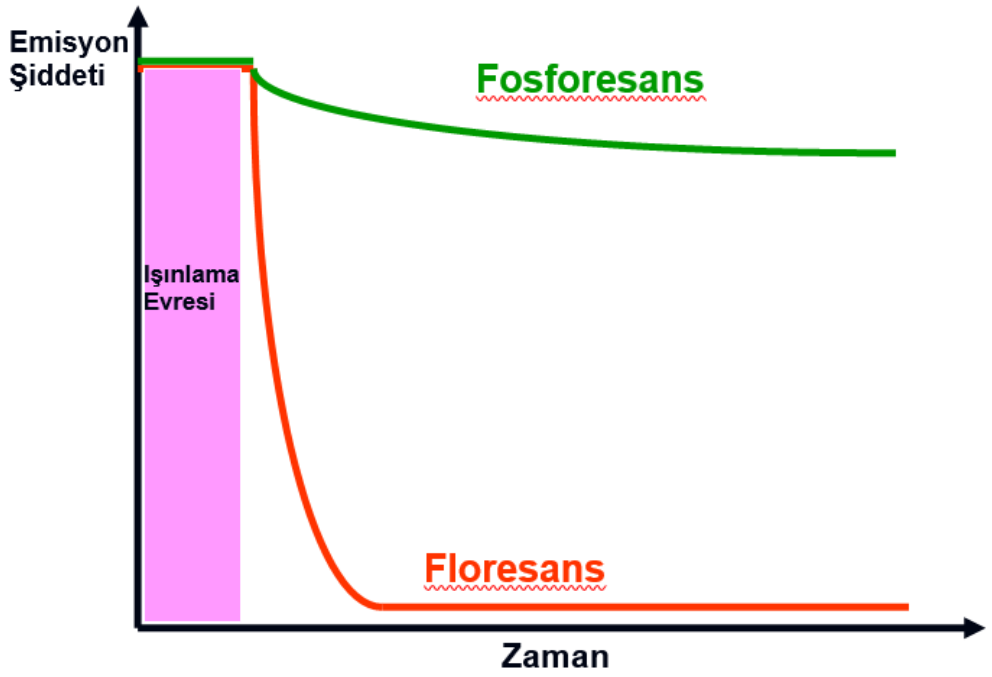


- Absorpsiyon ve emisyon spektrumları yaklaşık olarak **ayna görüntüsü** şeklindedirler.

Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi

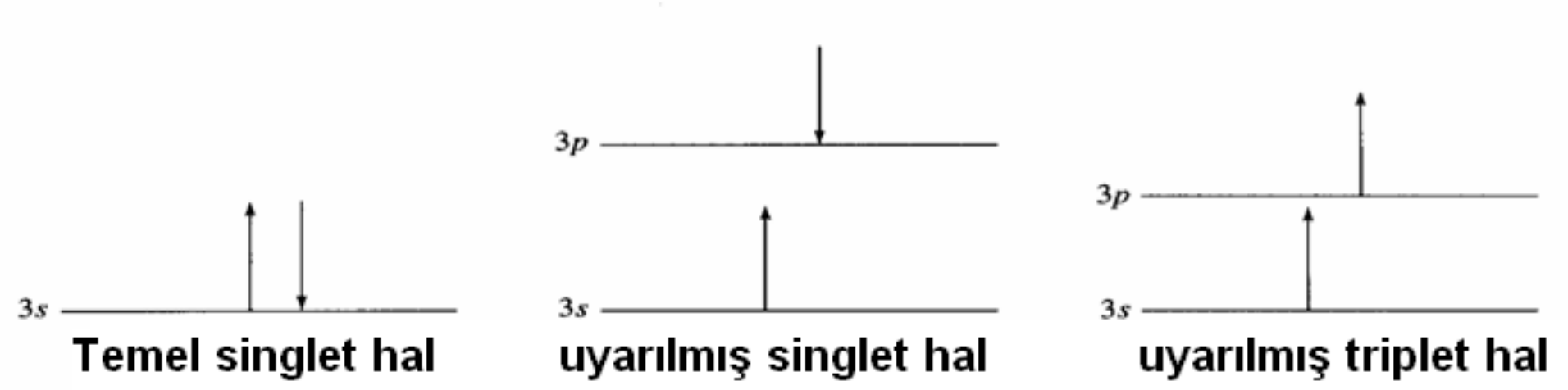
Floresans ve Fosforesans

- **LÜMİNESANS:** Işın enerjisini absorplayan maddenin kısa süreli olmak üzere daha uzun dalga boylu ışınlar yaymasıdır.
- **FLORESANS:** Lüminesans olayının çok kısa sürede gerçekleştiği duruma denir.
- **FOSFORESANS:** Lüminesans olayının daha uzun sürede meydana geldiği duruma denir.



Floresans ve Fosforesans

Floresans	Fosforesans
Kendiliğinden ışıma olayı, uyarıcı ışın kesilince hemen durur.	Kendiliğinden ışıma, uzun zaman (dakikalarca) sürebilir.
Absorplanan ışın, anında yeni ve başka bir ışına dönüştürülür	Enerji önce bir şekilde depolanıp, buradan yavaş yavaş ışın halinde harcanır
Uyarılmış singletten temel hale ışımadır	Uyarılmış tripletten temel hale ışımadır



Floresans Ömrü ve Kuantum verimi

- Floresans özellikli maddenin uyarılmış halde kalma süresi **floresans ömrü** olarak nitelendirilir.
- Lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranıdır.
- Floresein gibi oldukça floresans bir molekül için bazı şartlar altındaki kuantum verimi **bire** yaklaşır.
- Önemli derecede, floresans yapmayan kimyasal türler **sıfıra** yakın verimlere sahiptir.

$$\text{moleküler floresans kuantum verimi} = \frac{\text{floresans özellik gösteren molekül sayısı}}{\text{toplam uyarılmış molekül sayısı}} \qquad \text{moleküler floresans kuantum verimi} = \frac{\text{salınan foton sayısı}}{\text{absorblanan foton sayısı}}$$

Floresansı Etkileyen Faktörler

Moleküler yapıya bağlı faktörler:

- Aromatik veya çoklu konjuge çift bağlar taşıyıp, yüksek rezonans kararlılığı gösteren moleküller floresans özelliktedir.
- En şiddetli floresans, içinde aromatik halkalar bulunan sistemlerdir.
- Floresans polisiklik yapılı aromatik sistemlerde çoğunlukla görülür.
- En şiddetli floresans, içinde aromatik halkalar bulunan sistemlerdir.
- Molekül yapısı rijit ise, floresansı artar.

Floresansı Etkileyen Faktörler

Çevresel Faktörler:

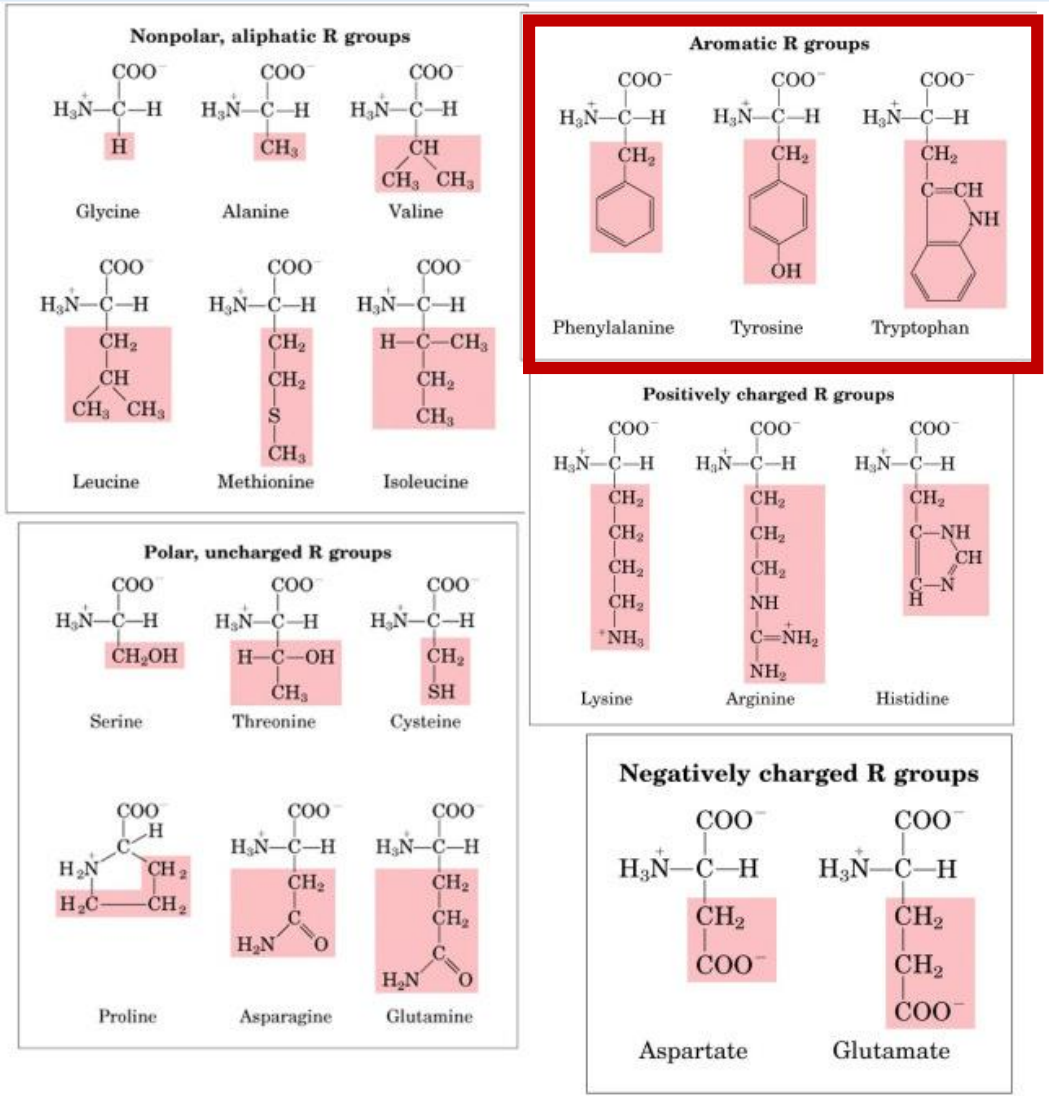
- Asit veya baz grubu içeriğine göre pH ile birlikte floresans değişir.
- Sıcaklığın yükselmesi çarpışmayı dolayısıyla floresans ışımasını azaltır.
- Çözücünün polarlığının artması da floresansı arttırır.
- Çözünmüş oksijen genellikle floresans şiddetini azaltır.
- **Floresans şiddeti, çözelti içindeki floresant maddenin konsantrasyonuyla orantılıdır.**

Uygulama Alanları

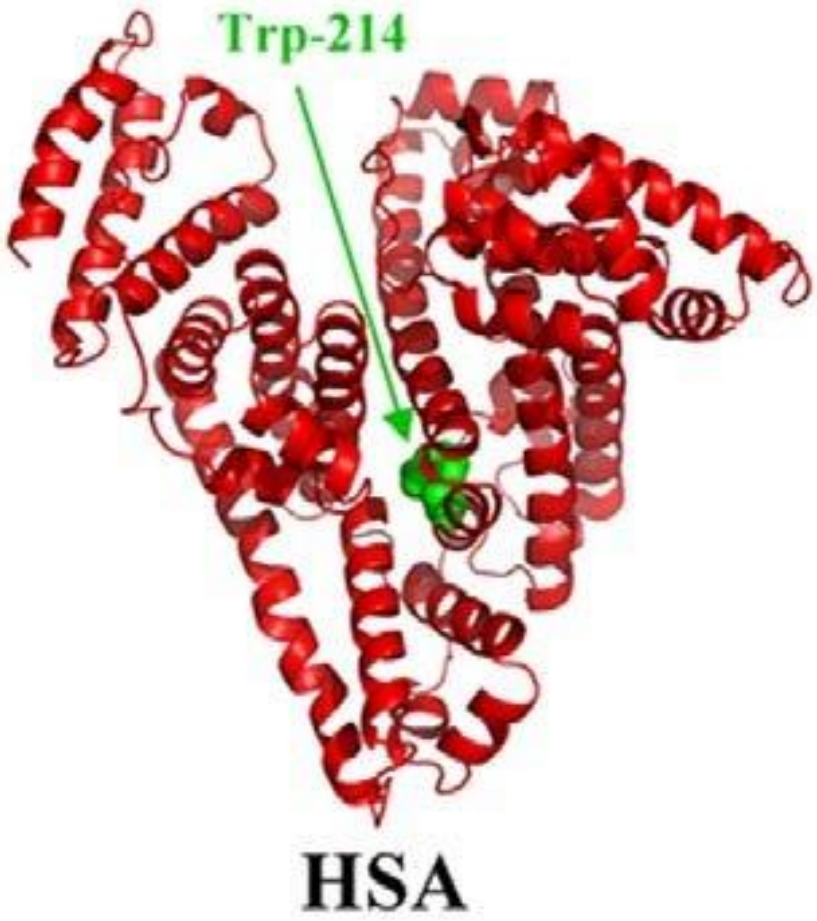
- Hücre içi konsantrasyon tayini,
- Protein miktar tayini,
- Üç boyutlu yapısı hakkında bilgi (açıldı veya katlandı),
- DNA bağlanmaları.
- Besin maddeleri, ilaçlar, klinik numuneler ve doğal maddelerin tayini.

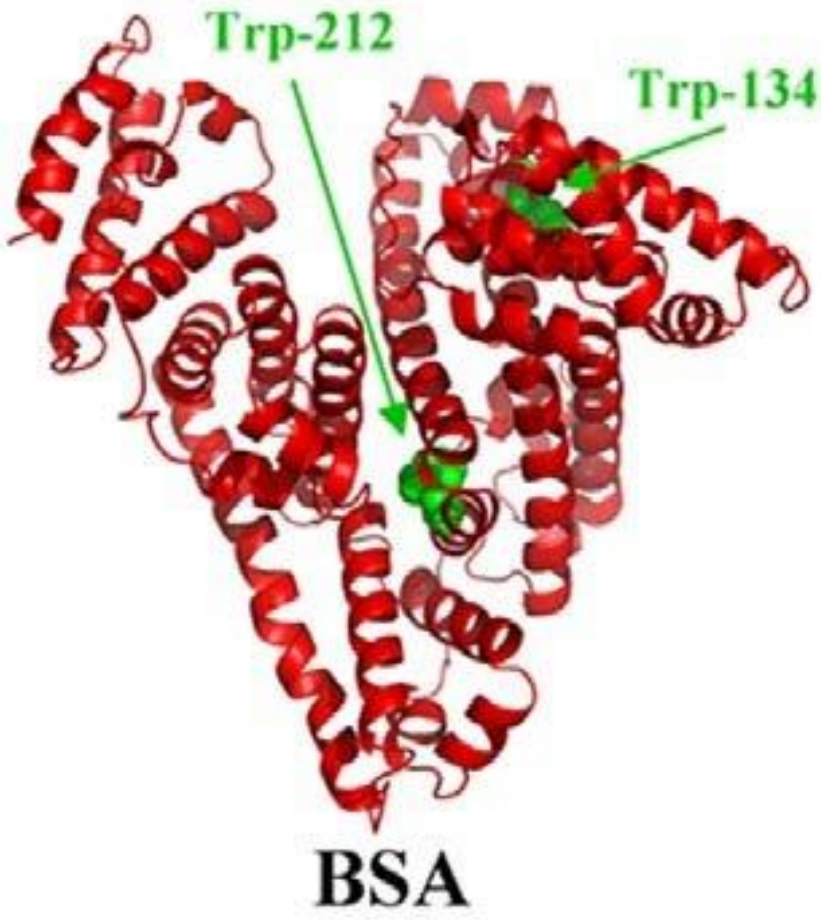
Floresans veren Aminoasitler

- Aromatik amino asitleri olan proteinler ve peptidler, UV ışığı ile uyarıldıklarında kendiliğinden floresans ışıma yaparlar.
- Bu aminoasitlerin farklı soğurma ve emisyon dalga boyları vardır ve kuantum verimleri de farklılık gösterir.



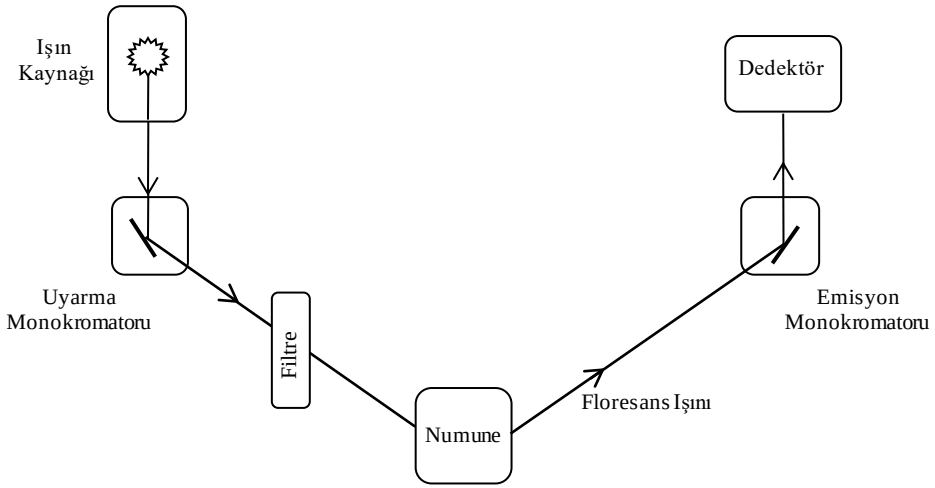
BSA: Bovin Serum Albumin

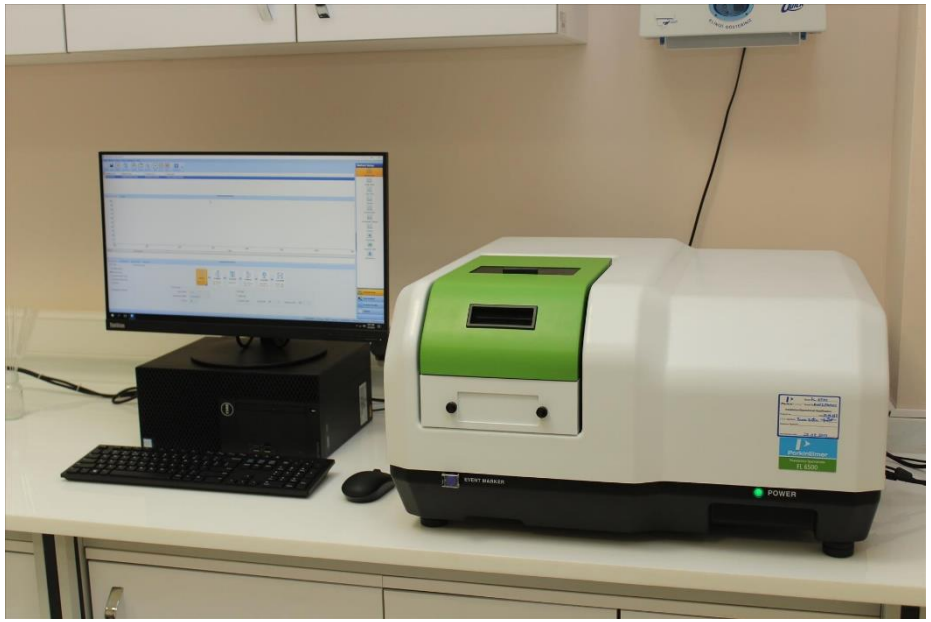




Deneysel Yöntem

Deney Düzeneği ve Cihaz Şematik Gösterimi





Yöntem

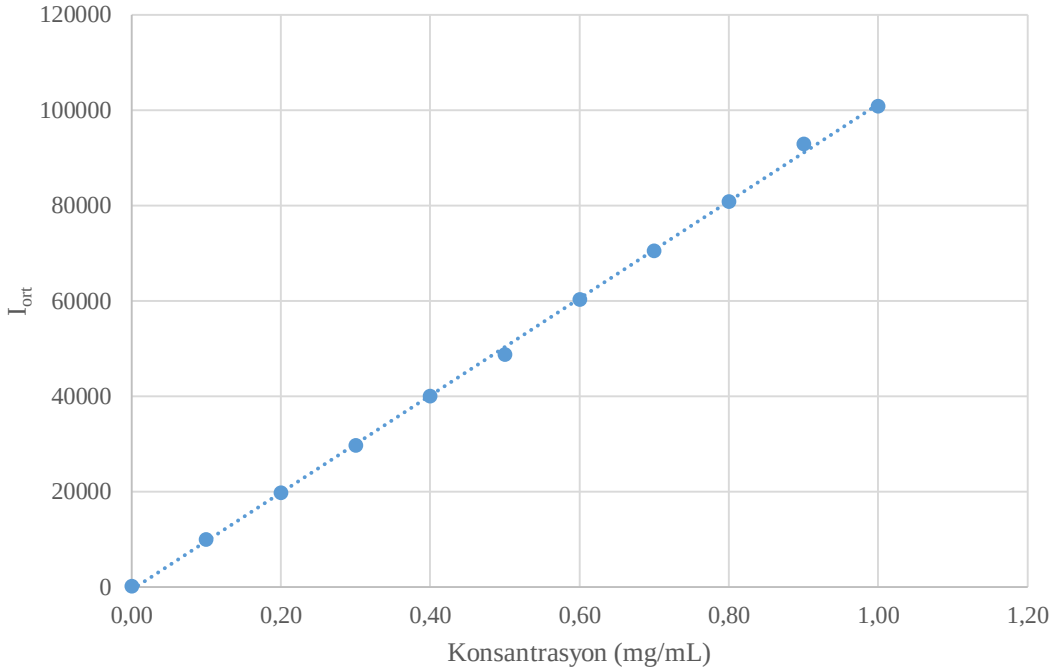
- 0.05 molar (PBS) çözeltisi hazırlanır.
- Standart BSA çözeltileri değişik konsantrasyonlarda hazırlanır;

Concentration (mg/mL)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
mL BSA (1.0 mg/mL)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
mL Buffer 0.05 M PBS	5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.5	0

- Bu şekilde hazırlanan 11 adet standart çözeltinin 280 nm uyaranla floresans şiddetleri üç tekrarda ölçülür.

Yöntem

- Çözeltilerin maksimum floresans şiddetine karşı derişim grafiği çizilir.
- Derişimi bilinmeyen çözeltinin floresans şiddeti ölçülür ve floresans şiddeti okunarak oluşturulan bu kalibrasyon doğrusundan derişimi hesaplanır.



$Y = X.a + b$

Video



https://www.youtube.com/watch?v=9MQPp0cwI8g

Animasyon önerisi: https://www.youtube.com/watch?v=CcN8NnGGPhs

Veriler

Konsantrasyon (mg/mL)	I_1	I_2	I_3	I_{ort}
0,00	120	119	97	?
0,10	9917	9824	10015	?
0,20	19668	19891	19834	?
0,30	29481	30017	29732	?
0,40	40181	40238	39728	?
0,50	48671	48915	48794	?
0,60	59903	60740	60342	?
0,70	70476	70676	70305	?
0,80	81075	80699	80735	?
0,90	96961	90833	90749	?
1,00	100969	100672	100750	?

Bilinmeyen Örnek Floresans Şiddeti:

73916

Sonuç Raporu

- Sonucunuzu nasıl doğrularsınız? (Literatür veya ek metot?)
- BSA yapısını detayıyla incelendiğinde fotolüminesans özellik nasıl sağlanmıştır.
- Deney düzeneğinde dikkat edilecek noktalar nelerdir?
- Diğer spektroskopi yöntemleri nelerdir? Avantaj ve dezavantajları nelerdir?
- HSA (Human Serum Albumin) analizinde floresans spektroskopisinin uygulanabilirliğini tartışınız.

- Teslim Tarihi:

25 Aralık 2020

- selcenarii@gmail.com