



QCM Biyosensör Kullanılan DNA Tespitinde Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

Investigation of Heat Effect on DNA Detection using QCM Biosensor

Furkan Soysaldı¹, Mehmet Çağrı Soylu²

¹Elektronik ve Otomasyon Bölümü, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir, Türkiye
furkansoysaldi@nevsehir.edu.tr

²Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye
mcsoylu@erciyes.edu.tr

Özetçe—Genetik tespit, günümüzde teşhisin doğru yapılabilmesi ve uygun tedavinin uygulanabilmesi için tıbbi diyagnostikte önemli yeri olan konuların başında gelmektedir. DNA tespitinde ‘Altın Standart, olan PCR yerine, daha hızlı, kolay ve ucuz yöntemler üzerinde çalışmalar hızla devam etmektedir. Bu çalışma, araştırma altındaki yöntemlerin başında gelen QCM biyosensör kullanılarak yapılan DNA tespitini ve sıcaklığın bu tespit üzerine etkisini incelemiştir. Sensörün altın yüzeyine, yüzey işlevselleştirme teknikleri ile immobilize edilen pDNA ile model insan sıvısı içerisinde bulunan sentetik tDNA 10⁸ kopya/mL hassasiyet seviyesinde, oda sıcaklığında tespit edilmiştir. Ayrıca, aynı tespit işlemi vücut sıcaklığında da uygulanmış ve sıcaklığın DNA-DNA hibridizasyon ilgisine etkisi neticesinde, hassasiyetin 2 kat azaldığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler — QCM; Biyosensör; DNA tespiti, Sıcaklık etkisi.

Abstract— Genetic detection, nowadays, is one of the major topics having an important place in medical diagnostic to make a correct diagnosis and carry out an appropriate treatment. Researches on the faster, easier, and cheaper methods carry on swiftly instead of PCR, which is ‘Gold Standard, in DNA detection. This study has examined the DNA detection by using QCM biosensor that is the major one of methods under development and the effect of heat on this detection. The synthetic tDNA in simulated human fluid has been detected at 10⁸ copies/mL of sensitivity level at room temperature via pDNA immobilized on the sensor’s gold surface with surface functionalization techniques. Besides, the same detection process has been practiced at body temperature, and the sensitivity has decreased 2 times as a result of the heat effect on DNA-DNA hybridization affinity.

Keywords — QCM; Biosensor; DNA Detection; Heat Effect.

I. GİRİŞ

Bakteriyal ve viral enfeksiyonlar, kanser, Alzheimer, Parkinson v.b. hastalıklar erken teşhis edildiği takdirde tedavi edilebilmekte veya kontrol altında tutulabilmektedir. Gelişmiş tedavi yöntemlerine rağmen erken tanı yapılamaması bu tür hastalıkların komplikasyonlarını yoğunlaştırmakta, ayrıca mortaliteyi de arttırmaktadır [1, 2]. Hassas ve erken genetik teste imkan sağlayan ve bu alanda altın standart olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) pahalı, zaman alıcı ve bu konuda eğitilmiş operatör ihtiyacı duyan bir sistemdir [3].

Gelişmekte olan yöntemler arasında toplam kütle değişimine tepki veren piezoelektrik biyosensörler, tamamıyla elektriksel olması, yerinde ve etiketlemeye ihtiyaç duymadan gerçek zamanlı tespit yapılabilmesi ve hızlı cevap süresine sahip olması gibi özellikleri bünyesinde barındırdığından, erken genetik tespit için ilgi çekici bir platform olmaktadır [4].

Kütle-hassas bir tespit metodu olan Kuvartz Kristal Mikrodenge (QCM), gelişme altında olan DNA tespit yöntemleri içerisinde, moleküler kütle ölçümü için bir standart olmasının yanı sıra, piezoelektriksel özelliklere de sahip olduğu için genetik erken teşhis üzerine yapılan çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır [5].

Sinyal kuvvetlendirme yöntemi (hedef haricinde kütle artırma) kullanılmadan PCR hassasiyetini yakalayamamasına rağmen, QCM biyosensörü genetik tespit için olumlu alternatif bir yöntem olmakla birlikte [6], sinyal kuvvetlendirme ile PCR hassasiyetine yaklaşmakta ve bu sonuçlar PCR’den daha kolay, hızlı ve ucuz bir alternatif yöntem ortaya koymaktadır [7].

DNA-DNA hibridizasyonunun afinitesi, DNA erime sıcaklığına yaklaşılacak hibridizasyon ortamlarında hidrojen bağlarının zayıflamasından dolayı artan sıcaklıktan etkilenmektedir [8]. Ayrıca, piezoelektrik malzemelerin de sıcaklık hassas olduğu göz önüne alındığında [9], QCM

Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

sensörün farklı sıcaklıklardaki DNA tespit hassasiyeti, özellikle insan sıvılarından elde edilmiş numuların hızlı ve yerinde tespiti için incelenmesi gereken bir husustur.

Bu çalışmada, simüle insan sıvılarından hedef DNA'nın tespitinde kullanılacak olan QCM sensörün farklı sıcaklıklardaki performansı, DNA-DNA hibridizasyon afinitesi göz önüne alınarak incelenmiştir.

II. MATERYAL VE METHOD

A. QCM Biyosensör Yüzey Modifikasyonu

QCM (Q-Sense, Biolin Scientific, ERNAM, Erciyes Üniversitesi) sensörün altın kaplamalı kristali (5 MHz, QSX301), % 0.1 (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPS, Sigma-Aldrich, % 95) + % 0.5 deiyonize su içeren, pH=9.0'daki 10 mL'lik etanol (Merck) çözeltisine, 100 µL/dk akış hızındaki peristaltik pompa (Ismatec) vasıtasıyla 60 dakika, kapalı döngü ile maruz bırakıldı. MPS'in thiol grupları altın yüzeye tutunurken, metoksil grupları ise sulu solüsyonda hidrolize olmaktadır. Hidroksil grupları, kaplama sürecinde kendi aralarında yoğunlaşarak altın yüzey üzerinde bir katman oluşturmaktadır. Bu katmanın üzerindeki hidroksil grupları ile serbest MPS moleküllerindeki hidroksil gruplarının yoğunlaşması devam etmekte ve yüzeyde tiyol gruplarından oluşan üst bir katman oluşmaktadır. Yüzeydeki tiyol gruplarına, bir ucu tiyol reaktif maleimide grubu, diğer ucu amin reaktif olan 1 mg/mL oranındaki 1 mL'lik 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt (Sulfo-SMCC) solüsyonu uygulanarak yüzey amine reaktif hale getirilmiştir.

B. Sentetik pDNA İmmobilizasyonu

Tablo 1'de detaylı bilgileri verilen 5' amin aktive edilmiş, Fosfat Tamponlu Tuz (PBS, ERNAM) çözeltisi içerisinde hazırlanmış 1.5 mL'lik 10^{12} kopya/mL oranındaki prob DNA (pDNA, Sentegen), 100 µL/dk akış hızında amin reaktif haldeki yüzeye kapalı döngü ile uygulanmıştır.

C. BSA Bloklama

pDNA immobilize edilmiş sensör yüzeyine, PBS içerisinde hazırlanmış % 5'lik 5 mL Büyükbaş Serum Albumini (BSA, Sigma-Aldrich) 100 µL/dk akış hızında uygulanmış ve yine % 5 BSA içeren ve PBS içerisinde hazırlanan simüle insan sıvısından kaynaklanacak spesifik olmayan bağlantıların önüne geçilmiştir.

Sentetik DNA'lar	Baz Dizilimi
pDNA	AmineC12_5'-ATGTCGTAATCGCATAGAAT-3'
tDNA	5'-ATTCTATGCGATTACGACAT-3'

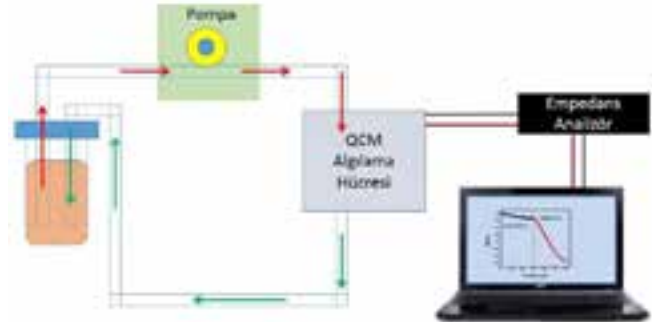
Tablo 1. Sentetik DNA'lar

D. tDNA Tespiti

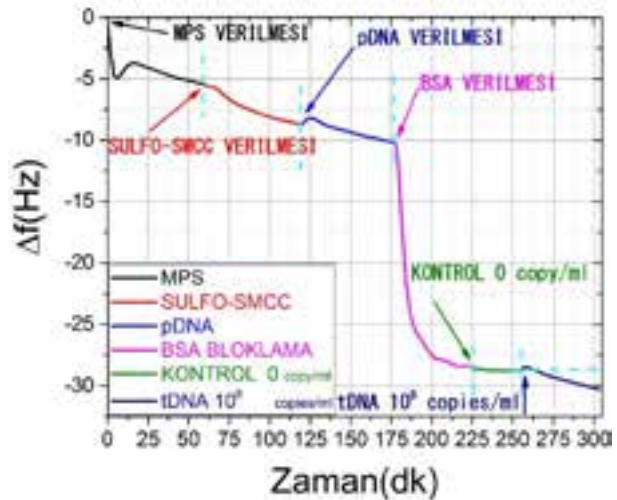
Şekil 1'deki deney düzeneği kullanılarak sıcaklık kontrollü olan QCM sensör tespit hücresi 20° C'ye sabitlendikten sonra, % 5 BSA'lık PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış olan 10^8 kopya/mL konsantrasyonundaki 1.5 mL'lik hedef DNA (tDNA) solüsyonu modifiye sensör yüzeyine, 100 µL/dk akış hızında, kapalı döngüde 30 dakika boyunca uygulanmıştır. Her tespitten sonra QCM tespit hücresi 60° C'ye getirilerek, tutulan DNA'ların dehidridize olması sağlanarak, deiyonize su ile yüzey yıkanmıştır. Aynı konsantrasyondaki yeni tDNA solüsyonları aynı yöntemle tekrarlı deneyler için yıkanmış yüzeye iki kez daha uygulanmıştır. Vücut sıcaklığında tDNA tespiti, QCM tespit hücresi 37° C'ye sabitlenerek, aynı işlem sırası ile uygulanmıştır.

III. SONUÇLAR

Yüzey modifikasyonu için yapılan uygulamalar üçer kez tekrar edilerek, 20° C'de QCM sensörün kütle değişimine verdiği cevap olan rezonans frekansındaki azalma Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Tespit sisteminin şematik gösterimi

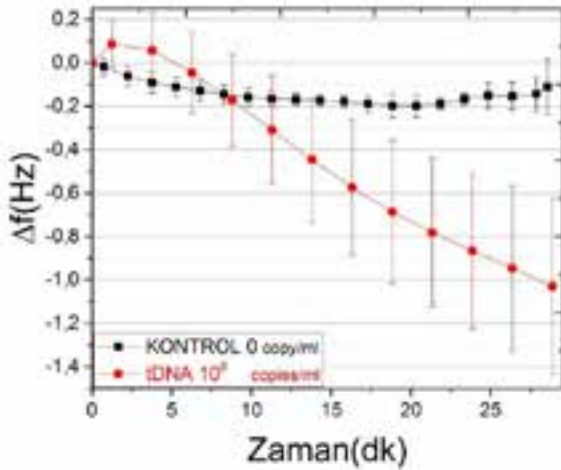


Şekil 2. Deney aşamalarındaki frekans değişimi

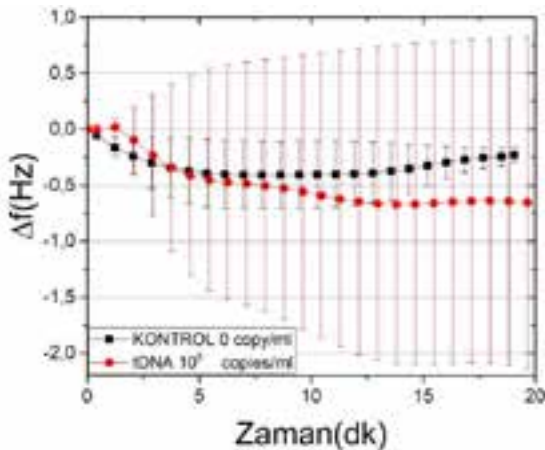
Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

MPS kaplama için ortalama 5 Hz, Sulfo-SMCC çapraz bağlama için ortalama 4 Hz, pDNA immobilizasyonu için ortalama 4 Hz, BSA bloklama için ortalama 17 Hz, kontrol (%5 BSA PBS'de 0 copies/mL tDNA) için ortalama 0.2 Hz ve 10^8 kopya/mL konsantrasyonundaki tDNA için ortalama 1.0 Hz olarak kaydedilmiştir. Şekil 3'de görüldüğü üzere, 20°C 'de sensörün tDNA'ya verdiği yanıt ile kontrol kıyaslandığında S/N oranı 5'ten büyük çıkmaktadır. Bu sonuç, 10^8 kopya/mL konsantrasyon seviyesinde yapılan tespitin sinyal olarak da anlamlı olduğunu göstermektedir. 37°C 'de yapılan tDNA tespit deneyi için elde edilen rezonans frekansı yanıtları Şekil 4'te gösterilmektedir. Kontrol esnasında gerçekleşen frekans kayması ortalama 0.5 Hz iken, 10^8 kopya/mL konsantrasyon seviyesindeki tDNA kaydedilen frekans kayması 0.7 Hz'tür. 37°C 'lik ortamda DNA-DNA hibridizasyonunun zayıflaması neticesinde, yüzeye daha az ve daha gevşek tutunan hedef DNA'lar rezonans frekansında, oda sıcaklığında yapılan deneylere nazaran daha az bir değişime neden olmaktadır.



Şekil 3. 20°C 'de kontrol ve tDNA için kaydedilen frekans yanıtları



Şekil 4. 37°C 'de kontrol ve tDNA için kaydedilen frekans yanıtları

IV. TARTIŞMA

20°C ve 37°C 'de yapılan 10^8 kopya/mL konsantrasyonundaki tDNA tespiti için elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında; sıcaklığın QCM sensör stabilitesi üzerine olan negatif etkisi kontrol aşamasındaki verilerin standart sapmalarındaki değişiklikten anlaşılabilir. 20°C 'deki kontrol verisinin standart sapması 0.2 Hz'lük bir değişim gösterirken, 37°C 'deki kontrol verisinin standart sapması 0.5 Hz'lük bir değişim göstermektedir. Sıcaklığın artması sonucu şekilsel değişim sonucu, 3 boyutlu yapıya bağlı olan rezonans frekansı'da değişmekte ve sensörün stabilitesini ekilemektedir. tDNA için kaydedilen frekans değişimlerinin standart sapmaları incelendiğinde ise; sıcaklık artışının DNA-DNA hibridizasyonunun afinitesi üzerindeki negatif etkisi görülmektedir. Sıcaklık artışı, çift iplikli DNA yapısının oluşmasını sağlayan bazlar arasındaki hidrojen bağlarını zayıflatmakta ve hem hassasiyet seviyesi hem de stabilite anlamında azalmaya neden olmaktadır. İnsan sıvılarının numune olarak kullanılacağı anlık DNA tespiti yapılması planlanan çalışmalarda, numune sıcaklığının piezoelektrik tabanlı sensörlerdeki hassasiyet ve stabilite üzerindeki olumsuz etkisi önemli bir etken olarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKÇA

- [1] Morgan, I., & Wilkes, S. (2017). Improving early diagnosis of cancer in UK general practice. *Br J Gen Pract*, 67(659), 276-277.
- [2] Chen, H. L., Wang, G., Ma, C., Cai, Z. N., Liu, W. B., & Wang, S. J. (2016). An efficient hybrid kernel extreme learning machine approach for early diagnosis of Parkinson's disease. *Neurocomputing*, 184, 131-144.
- [3] Kirimli, C. E., Shih, W. H., & Shih, W. Y. (2017). Piezoelectric Plate Sensor (PEPS) for Analysis of Specific KRAS Point Mutations at Low Copy Number in Urine Without DNA Isolation or Amplification. *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols, Volume 2: Electrochemical, Bioelectronic, Piezoelectric, Cellular and Molecular Biosensors*, 327-348.
- [4] Wang, LiJiang, et al. "The Escherichia coli O157: H7 DNA detection on a gold nanoparticle-enhanced piezoelectric biosensor." *Chinese Science Bulletin* 53.8 (2008): 1175-1184.
- [5] Afzal, A., Mujahid, A., Schirhagl, R., Bajwa, S. Z., Latif, U., & Feroz, S. (2017). Gravimetric Viral Diagnostics: QCM Based Biosensors for Early Detection of Viruses. *Chemosensors*, 5(1), 7.
- [6] Dultsev, F. N., Kolosovsky, E. A., Lomzov, A. A., & Pshny, D. V. (2017). QCM-based rupture force measurement as a tool to study DNA dehybridization and duplex stability. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(4), 891-901.
- [7] Zhao, H. Q., Lin, L., Li, J. R., Tang, J. A., Duan, M. X., & Jiang, L. (2001). DNA biosensor with high sensitivity amplified by gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 3(4), 321-323.
- [8] Fontenete, S., Guimarães, N., Wengel, J., & Azevedo, N. F. (2016). Prediction of melting temperatures in fluorescence in situ hybridization (FISH) procedures using thermodynamic models. *Critical reviews in biotechnology*, 36(3), 566-577.
- [9] Acharya, B., Sidheswaran, M. A., Yung, R., & Krim, J. (2017). Quartz crystal microbalance apparatus for study of viscous liquids at high temperatures. *Review of Scientific Instruments*, 88(2), 025112.