



## **Anaplasma Phagocytophilum'un Tayinine Yönelik Elektrokimyasal DNA Sensörü Geliştirilmesi**

**Adil ELİK<sup>1\*</sup>, Gültekin GÖKÇE<sup>2</sup>, Çağdaş CEYLAN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 58140 Sivas / TÜRKİYE

<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim Fakültesi, 58140 Sivas / TÜRKİYE

Received: 21.04.2017; Accepted: 30.05.2017

<http://dx.doi.org/10.17776/csj.349331>

**Özet:** Bu çalışma, oldukça geniş bir konakçı gurubunda enfeksiyona yol açan bir patojen olan *Anaplasma Phagocytophilum* dizi seçimli DNA hibridizasyonunun voltametrik yöntemle tayin edildiği tek kullanımlık elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirilmesine yöneliktir. Herhangi bir etiketlenmenin yapılmadığı bu elektrokimyasal çalışmanın esasını DNA hibridizasyonu sonrasında Guanin bazının yükseltgenme sinyalinin ölçülmesi ile bir dubleks oluşumunun izlenmesi oluşturur. Söz konusu biyosensör tasarımı inozinmodifiye (guanin içermeyen) probun, kalem grafit elektrotta (PGE) immobilize edilmesi ve diferansiyel puls voltametri (DPV) ile guanin yükseltgenme sinyalinin ölçülerek, dubleks oluşumu tayinini içerir. Bu çalışmanın ilk aşamasında, *Anaplasma phagocytophilum* temsil eden prob dizisi, aktive edilmiş kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine yaş adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmiş ve daha sonra prob ve hedefi arasındaki hibridizasyonun varlığı 1000 mV'da gözlenen guanin yükseltgenme sinyali ile tespit edilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmasında prob derişimi 25 µg/mL, prob immobilize süresi 6 dakika; hibridizasyon için hedef derişimi 40 µg/mL ve hibridizasyon süresinin 10 dakika olduğu gözlenmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal biyosensörün spesifikliği, baz sırasından bir bazın yeri (MM) ve tüm bazların yerleri farklı (NC) olan hedef diziler kullanılarak, test edilmiştir. Ferri/Ferro siyanür redoks sistemi altında elektrokimyasal empedans yöntemi kullanılarak yapılan empedimetrik ölçümler ile DNA hibridizasyonunun gerçekleştirildiği ayrıca teyit edilmiştir. Tayin sınırını (DL) belirlemek için hedef derişimi 0,78 µM ile 3,90 µM arasında değişen hedef diziler kullanılmış ve tayin sınırı 0,244 µM olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Elektrokimyasal DNA Sensörü; Kalem Grafit Elektrot, *Anaplasma Phagocytophilum*, Diferansiyel Puls Voltametri.

## **Development of Electrochemical DNA Sensor for The Determination of *Anaplasma Phagocytophilum***

**Abstract:** This study was intended to enhance the disposable electrochemical DNA biosensor through which *Anaplasma phagocytophilum*, a pathogen causing infection in a considerably wide host group, sequence selective DNA hybridization was detected with a voltammetry method. Monitoring the formation of a duplex by measuring the oxidation signal of guanine base after DNA hybridization forms the basis of this study in which no labeling was done. The biosensor design contained immobilizing inosine modified (guanine-free) probe to the pencil graphite electrode (PGE) and detecting duplex formation by measuring guanine oxidation signal with differential pulse voltammetry (DPV).

In the first stage of this study, probe sequence representing *Anaplasma phagocytophilum* was immobilized to the activated surface of pencil graphite electrode (PGE) by wet adsorbition method, and then the hybridization between probe and its target was confirmed with guanine oxidation signal observed at 1000 mV. In the

optimization study, it was observed that probe concentration was 25 µg/mL, immobilization time was 6 minutes; for the hybridization, target concentration was 40 µg/mL and hybridization time was 10 minutes. Selectivity of biochemical biosensor developed was tested by using mismatch and non complementary target sequences. It was also confirmed that DNA hybridization was carried out with impedimetric measurements by using electrochemical impedance method under the ferri/ferro cyanide redox system. To estimate the detection limit (DL), target sequences whose concentrations varies between 0, 78 µM and 3,90 µM were used, and it was found that the detection limit was 0,244 µM.

**Keywords:** Electrochemical DNA Sensor, Pencil Graphite Electrode, *Anaplasma Phagocytophilum*, Differential Pulse Voltammetry.

## 1. GİRİŞ

Canlı genomunun yapısı ve işlevi hakkında bilgi edinildikçe son yıllarda bu alandaki çalışmalarda artmıştır. Canlıya özgü DNA dizilerindeki bazı dizilimlerinin analizi ile klinik tanıları, ilaç geliştirme, salgın önleme ve biyo-mühendislik hız kazanmıştır [1]. Gen teknolojisindeki hızlı ilerlemeler, tıbbi ve biyo-teknolojik uygulamalarının yanı sıra büyük uluslararası projelere de konu olmaktadır. Kalıtsal hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar, DNA mutasyonları, bir besi ortamındaki bakteri cinsi ve miktar tayinine kadar birçok alanda etkin olarak kullanılan bu elektrokimyasal sensörlere biyosensör denir. Elektrokimyasal sensörlerin yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit vb. biyolojik maddeler eklendiği zaman “biyosensör” adını almaktadır [2].

Bilinen konvansiyonel yöntemlere alternatif olmak üzere elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensör) kullanımı gündeme gelmiştir. Son 10 yılda biyosensör tasarımında nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeylerinin kullanılması yaygınlaşmış ve analitik kimya alanında çip teknolojisine yönelik genosensör tasarımı çalışmaları oldukça hızlanmıştır [2-4]. Bu çalışmalar, gerek analitik kimya gerekse diğer bilimlere yeni ve ender boyutlarda özellikler ekleyerek gelecekte hasta başında ve doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli rol oynayacaktır [5-7]. DNA tanıma yüzeyleri içeren genosensörler, dizisi belli genlerin hibridizasyon tayininde bu dizilere ilişkin kalıtsal ve enfeksiyon hastalıklarının tayininde ve bu yüzeyle etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojenik maddeler, ilaçlar vs) tayininde kullanılabilir olacaktır [8-10]. Tayinler, DNA bazlarının birinin

yükseltgenme sinyalindeki (indikatörsüz yöntem) ya da bu bazlardan en az biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörünün veya interkalatör özellikteki bir hibridizasyon indikatörünün yükseltgenme veya indirgenme sinyalindeki değişikliklerden (indikatörlü yöntem) yola çıkılarak yapılır [11-13].

Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde, herhangi bir indikatör kullanmadan DNA bazlarından biri olan Guanin ve Adenin yükseltgenme sinyallerinden yararlanarak hibridizasyon tayini çalışmaları başlamış ve hızla ilerlemiştir. İndikatörsüz DNA hibridizasyon tayini yöntemi ile bazı enfeksiyon ve kalıtsal hastalıkların tanısına yönelik çalışmalar yapılmaktadır [14-17]. Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, kalıtsal ve enfeksiyon hastalıklarının tanısında bilinen rutin analiz yöntemlerine göre alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir [16].

*Anaplasma phagocytophilum* kene türlerinden bulaşan ve geniş bir konakçı grubunda enfeksiyona yol açan bir patojendir. Başlangıçta bu enfeksiyonun sadece keneler ile geviş getiren hayvanlar arasında bulaşıldığı düşünülmüşse de [18] günümüzde konakçı türler içinde kemirgenlerin, kirpilerin, kuşların, kedilerin, geyiklerin, atların, sığırların, köpeklerin, koyunların ve insanların da yer aldığı bilinmektedir [19]. *Anaplasma phagocytophilum* Avrupa’da ekonomik açıdan oldukça önemli olan bir koyun patojenidir ve enfeksiyonu septisemiye yol açarak ikincil enfeksiyonlara, düşüklere ve kuzuların total olarak doğmalarına sebep olmaktadır [20-22]. Buna bağlı olarak bu bakteri ile enfekte olmuş hastalarda, bakterinin klinik olarak hızlı tayininin

yapılması oldukça önemlidir. Bu bakterinin tanısına yönelik PCR esaslı çok sayıda moleküler teknik mevcuttur [23-26].

Bu bilgiler ışığında araştırmanın amacı, geniş bir konakçı grubunda bulunan ve yaşadığı konakçılarda özellikle de insanlarda ciddi enfeksiyonlar meydana getiren *Anaplasma phagocytophilum*'un seçimli DNA hibridizasyonunun voltametrik yöntemle tayin edildiği tek kullanımlık elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirilmesine yöneliktir. Söz konusu biyosensör tasarımıyla, inozin modifiye (guanin içermeyen) probun kalem grafit elektrota (PGE) immobilize edilmesi ve diferansiyel pulsvoltametri (DPV) ile guanin yükseltgenme sinyalinin ölçülerek, dubleks oluşumunun tayini yapılacaktır.

*Anaplasma phagocytophilum* temsil eden prob dizisi, aktive edilmiş kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine yaş adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilecek ve daha sonra prob ve hedefi arasındaki hibridizasyonun varlığı 1000 mV'da gözlenen guanin yükseltgenme sinyalleri ile tespit edilecektir. Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan bu elektrokimyasal PGE-DNA biyosensörü, kalıtsal ve enfeksiyon hastalıklarının tanısında bilinen rutin analiz yöntemlerine göre alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntem olacaktır.

Prop	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	5'-TGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCC -3'
I-Prop	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	5'-TIACIITACCTACAIAAIAAITCCC -3'

Hedef	5'-GGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCA-3'
MM	5'-GGGACTTCTTCTATAGGTACCGTCA-3'
NC	5'-TTCGGCAAGCGGTCGTTCCGAAAAG-3'

## 2.4 Kullanılan Sentetik Prob'tan ve Hedef Diziler'den Stok Çözeltinin Hazırlanışı

Liyofilize DNA oligonükleotidlerin stok çözeltileri, derişimleri 1000 µg/mL (1000µg/mL) olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl ve 1 mmol/L EDTA içeren Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisi (voltametrik teknik için pH 8,0, impedimetrik teknik için pH 7,4) ile hazırlandı. 1000 µg/mL

## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1 Kullanılan Cihazlar

Terazi (Presica XB 220A), Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sonorex), pH-metre (WTW InolabpH 720), Potansiyostat; µ-AUTOLAB type III (GPES ve FRA Modülleri – EcoChemie, Hollanda), Ag/AgCl referans elektrot, Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı), Manyetik karıştırıcı (AGE Velp).

### 2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck), Di potasyum mono hidrojen fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck), Potasyum dihidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck), Trizma hidroklorik asit (Trizma-HCl) (Sigma), Sodyum klorür (NaCl) (Sigma), tri – Sodyum sitratdihidrat (Merck) , EDTA (Merck), Asetik Asit %100 (Merck), Tüm çalışmalarda Mili Q distile su (18 Mega – ohm'luk) kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (25,0 ± 0,5) °C' de gerçekleştirildi.

### 2.3 Kullanılan DNA Dizileri

Çalışmada kullanılan *Anaplasma phagocytophilum*'a ait tüm sentetik diziler liyofilize toz halinde Gürbüz Medikal Sivas'tan sağlandı. Kullanılan DNA dizileri şunlardır:

konsantrasyona sahip stok DNA çözeltileri, -20 °C'de sterilize DNA tüpleri içinde stok olarak saklanmıştır. Problar asetik asit tampon çözeltisinde (ABS), hedefler ise fosfat tampon çözeltisinde (PBS) seyreltilerek çalışılmıştır.

### 2.5 Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (PBS pH=7,4)

Ölçümler sırasında kullanılan 0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36 g (0,01 mol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 6,96 g (0,04 mol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. Gerekliyse pH, 0,1 M NaOH ve / veya 0,1 M HCl ilavesiyle pH metre ile 7,4'e ayarlanır.

*0,50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (ABS pH=4,8)*

Kullanılan 0,50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 0,2722 g (0,002 mol) sodyum asetat trihidrat ve 0,1154 mL asetik asit içermektedir. Çözeltinin pH'sının 4,8 değerine ayarlanması, 0,1 M NaOH ve / veya 0,1 M HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

*0.02 M Tris-HCl tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH=7.0)*

Kullanılan 0.02 M Tris-HCl tampon çözeltisi litresinde 3.152 g Trizma-HCl içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7.0 değerine ayarlanması, 0.1 M NaOH ve / veya 0.1 M HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir

*.0.01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH=8.0)*

Kullanılan 0.01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisi litresinde 1.576 g Trizma-HCl ve 0.372 g EDTA içermektedir. Çözeltinin pH'sının 8.0 değerine ayarlanması, 0.1 M NaOH ve / veya 0.1 M HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

## 2.6 Kullanılan Yöntemler

Çalışmada kullanılan kalem ucu elektrot, Tombo marka kalem uçlarının 3 cm boyunda kesilmesiyle hazırlandı. 1,5 cm'lik kesilen kısmı kalem içerisinde kalacak şekilde yerleştirildi.

*Elektrot yüzeyinin aktif edilmesi:* Kalem grafit elektrotlar 6 cm olan TOMBO HB kalem uçlarının steril bir ortamda 3'er cm'lik olarak kesilmesi ile kullanıma hazır hale getirildi. 1cm'si tampon çözeltide olacak şekilde üçlü elektrot sistemine yerleştirildi. Elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH=4,8) potansiyostat cihazı μ-

AUTOLAB III (Eco Chemie, Hollanda) kullanılarak +1,40 V gerilimde 60 saniye süreyle aktive edildi. Çalışmanın her aşamasında bu yöntem tekrarlandı.

### 2.6.1 Elektrot yüzeyine DNA probunun immobilizasyonunun Guanin yükseltgenme sinyaline bağlı olarak tayini

*PGE'nin aktif edilmesi:* PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

*PGE yüzeyine anaplasma probunun immobilizasyonu tayini:* 1000 μg/mL olan stok Anaplasma prob çözeltisinden ABS ile seyreltme yapılarak 5 μg/mL, 10 μg/mL, 15 μg/mL, 20 μg/mL, 25 μg/mL, 30 μg/mL ve 35 μg/mL olacak şekilde deney çözeltileri hazırlanmıştır. 10 dakika sabit sürede dsDNA aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. PGE'ler, farklı derişimlerde hazırlanan DNA prob çözeltilerinde 10 dakika bekletildi.

Anaplasma probunun optimum immobilizasyon süresi sabit derişimde farklı zamanlarda PGE yüzeyine adsorbsiyon ile çalışıldı. Anaplasma dsDNA probunun aktive edilmiş PGE yüzeyine adsorbe olduğu en uygun sürenin belirlenmesi için PGE'ler 25 μg/mL sabit derişimde hazırlanan prob çözeltilerinde farklı zamanlarda (2, 3, 4, 5, 6, 8 ve 10 dk) bekletildi ve optimum süre tayin edildi.

*Yıkama ve ölçüm:* Ölçme işleminden önce 10 saniye süre ile ABS tamponu ile yıkandı ve bu işlem her ölçüm öncesi tekrar edildi. ABS (pH=4,8) ile dolu elektrostatik hücre içerisinde, + 0,75 V ile + 1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak ölçüm alındı. Her bir derişim için ölçümler en az dört kez tekrarlandı. Guanin yükseltgenme sinyalleri incelendi.

### 2.6.2 Hibridizasyon çalışması

*PGE'nin aktif edilmesi:* PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) + 1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

*PGE yüzeyine prob immobilizasyonu:* 25 µg/mL inozinli prob 8 dakika Anaplasma dsDNA çözeltisinde bekletilerek aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edildi.

*Hibridizasyon:* Tris-EDTA tamponu ile hazırlanan 1000 µg/mL'lik stok hedef çözeltisinden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 µg/mL olacak şekilde PBS ile seyreltilen deney çözeltileri hazırlandı. PGE yüzeylerine inozinli prob tutturulmuş elektrotlar ile hedef dizinler 10 dakika sabit sürede hibritleşmeye tabi tutuldu.

Hibritleşmenin en uygun derişimi 35 µg/mL olarak bulunduğundan sonra optimum süre çalışması için farklı hibritleşme (2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14 dakika) süreleri çalışıldı.

*Yıkama ve ölçüm:* Hibritleşme sonrasında PGE'ler 10 saniye süre ile PBS tamponu içerisinde yıkandı ve bu işlem her ölçüm öncesi tekrar edildi. + 0,75 V ile + 1,40 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla tarama yapılarak ölçüm alındı. Guanin yükseltgenme sinyalleri üzerinden ölçüm alındı. Her bir derişim için ölçümler en az dört kez tekrarlandı.

### **2.6.3 Hedef diziden tamamen farklı bir dizinin (NC) ve hedeften bir bazı farklı olan dizinin (MM) hibritleşmesinin incelenmesi (seçimlilik çalışması)**

*PGE'nin aktif edilmesi:* PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) + 1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

*Hibridizasyon:* Hedef dizin ile aynı sürede ve eşit derişimdeki, hedef baz diziliminden bir bazı farklı olan (Miss Match) ve hedef baz diziliminden tamamen farklı sıralamaya sahip bir baz (Non-Complementary) dizisi ile prob immobilize edilmiş PGE'lerin hibritleşmesi sağlandı.

*Yıkama ve ölçüm:* 2.6.2 deki aynı işlemler yapıldı.

### **2.6.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi deneyleri**

164,5 mg  $K_3Fe(CN)_6$ , 208,13 mg  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  ve 1,49 g KCl tartılıp hacmi saf su ile 200 mL'ye

tamamlanarak impedimetrik ölçümler için redoks çözelti hazırlandı. Üçlü elektrot sisteminde µ-AUTOLAB III (Eco Chemie, Hollanda) FRA (Frekans Analyzer) sistemi kullanılarak empedans ölçümleri alındı.

### **2.6.5 DNA immobilizasyonuna pH etkisinin incelenmesi**

*PGE'nin aktif edilmesi:* PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) + 1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

*PGE yüzeyine prob immobilizasyonu:* 25 µg/mL inozinli prob 8 dakika Anaplasma ds-DNA çözeltisinde bekletilerek aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edildi.

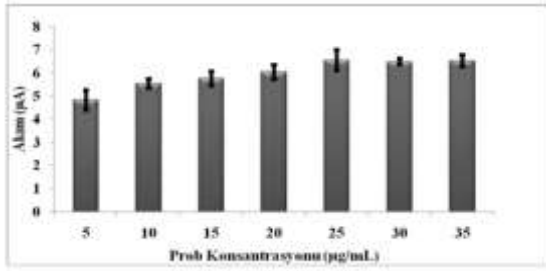
*Yıkama ve ölçüm:* Ölçme işleminden önce 10 saniye süre ile ABS tamponu ile yıkandı ve bu işlem her ölçüm öncesi tekrar edildi. Farklı pH'lardaki (pH=4,8 pH=3,8 ve pH=5,8) ABS ve PSB (pH=7,4) ile dolu elektrostatik hücre içerisinde, + 0,75 V ile + 1,40 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla tarama yapılarak ölçüm alındı. Her bir derişim için ölçümler en az dört kez tekrarlandı. Guanin yükseltgenme sinyalleri incelendi.

## **3. BULGULAR**

### **3.1 Anaplasma Phagocytophilum Probonun Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonunun Guanin Yükseltgenme Sinyaline Bağlı Olarak Tayini**

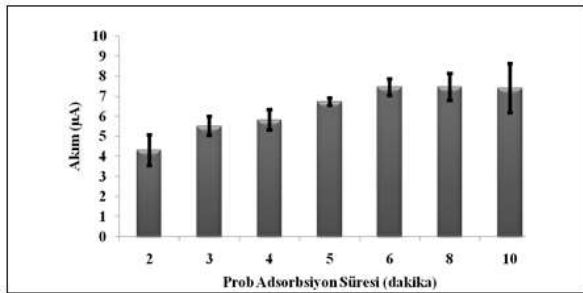
İlk olarak *Anaplasma Phagocytophilum*'un tek sarmal gen dizilimini temsil eden DNA probunun PGE yüzeyine 10 dakika sabit sürede immobilizasyonu sonucunda Guanin bazının verdiği pik akımlarının en yüksek değerlerinin 25 µg/mL de olduğu görülmüştür (Şekil 1).





Şekil 1. *Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için derişim optimizasyonu (10 dakika sabit sürede).

PGE yüzeyine immobilize edilecek DNA probunun sabit sürede optimum derişimi tayin edildikten sonra bu derişimde immobilizasyonun en iyi şekilde gerçekleşebilmesi için PGE'nin DNA çözeltisi içinde tutulması gereken optimum süre de tespit edildi. Şekil 2'den de görüldüğü gibi sabit derişimde immobilizasyon süresinin optimum 6 dakika olduğuna karar verilmiştir.



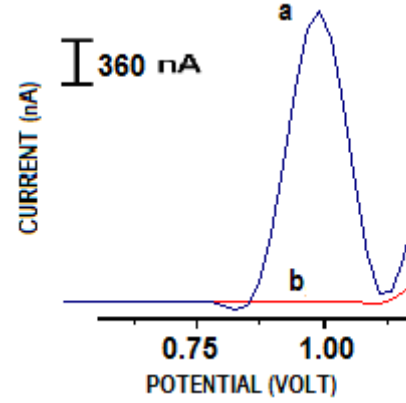
Şekil 2. *Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için süre optimizasyonu (25 µg/mL sabit derişimde) tayini.

Bu deneyler sonucunda *Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için optimum prob derişimi 25 µg/mL ve optimum immobilizasyon süresi 6 dakika olarak tayin edilmiştir.

### 3.2 *Anaplasma Phagocytophilum*'u Temsil Eden Tek Sarmal DNA Probonun Hedef Eşleşimi ile Hibridizasyonu İçin Süre ve Derişim Koşullarının Çalışılması

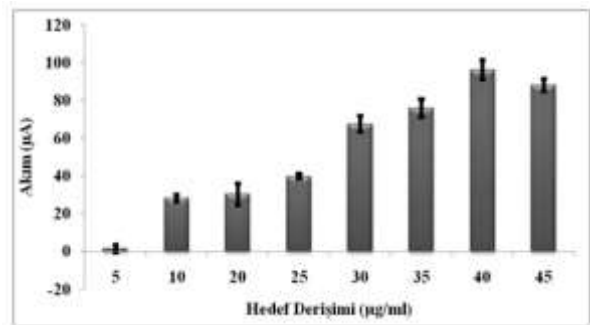
*Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden tek sarmal DNA probunun hedef eşleşimi ile hibridizasyon şartlarının belirlenmesi için önce 10 dakika sabit sürede farklı derişimlerdeki hedef proplar kullanılmıştır. Bunun için ilk önce aktive

edilmiş PGE yüzeyine, immobilizasyon koşulları daha önceden belirlenmiş (25 µg/mL prob derişimi ve 6 dakika tuturtma süresi), inozin modifiye DNA proba adsorbe edilmiş ve uygun hedef derişimin hangisi olduğuna, hibridizasyondan sonra Guanin indirgenme akımları incelenerek karar verilmiştir (Şekil.3).



Şekil 3. Hibridizasyon öncesi (b) ve sonrası (a) Guanin pik akımları.

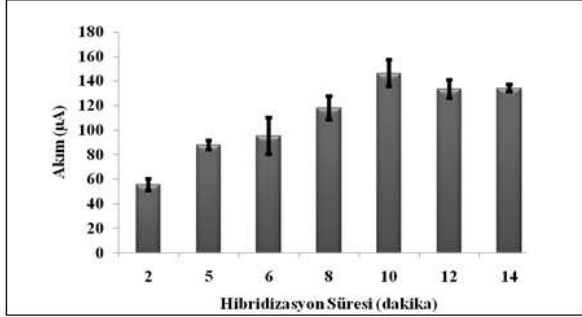
İnozinli DNA probu (baz diziliminde guanin yerine muadili olan inozin içeren prop) hibridizasyondan önce alınan ölçümlerde hiç sinyal vermezken, hibridizasyondan sonra sitozinlere bağlanan hedefteki Guanin bazının derişimine bağlı olarak pik akımları ortaya çıkmaktadır. Şekil 4'den de görüldüğü gibi en yüksek pik akımı 40 µg/mL hedef derişiminde gözlenmiştir.



Şekil 4. Hibridizasyon için optimum hedef derişimi tayini.

*Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun hedef prop ile hibridizasyonu için optimum hedef derişimi 40 µg/mL olarak tayin edildikten sonra bu derişimde hazırlanan hedef DNA probu içeren çözeltiye, inozin modifiye DNA probu immobilize edilmiş aktif PGE'ler daldırılarak değişen sürelerde bekletilmiş ve aynı

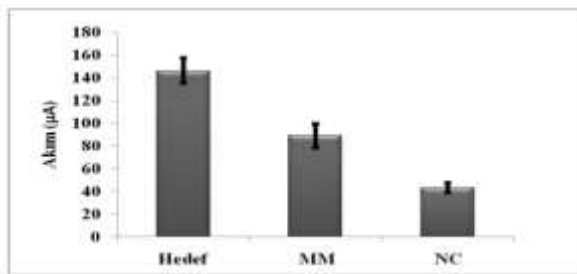
şekilde hibridizasyondan sonra gözlenen Guanin indirgenme akımlarının değerlerine bakılarak hibridizasyon süresi optimize edilmiştir. Şekil 5'den de görüldüğü gibi en yüksek pik akımları 10 dakikalık hibridizasyon süresinde elde edilmiştir.



Şekil 5. Optimum hibridizasyon süresi tayini.

### 3.3 Anaplasma Phagocytophilum'a Duyarlı DNA Sensörü için Seçimlilik Çalışılması

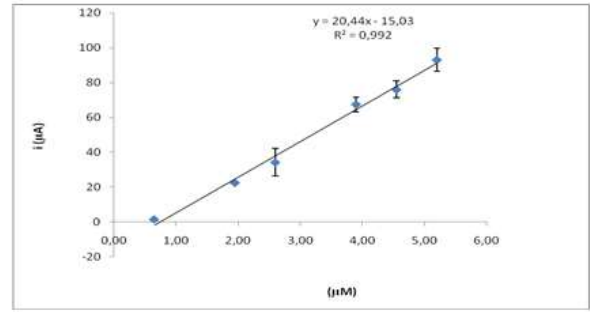
Uygun hibridizasyon süresinin ve uygun hedef derişiminin saptanmasında prob ve ilgili hedefi arasındaki etkileşimin yanı sıra dizilimi hedefdiziden bir bazı farklı (mismatch, MM) ve tamamen farklı (noncomplementary, NC) olan hedef diziler kullanılarak, bunların aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilen DNA probu ile hibridizasyonları incelenerek seçimlilik çalışması yapılmıştır. Tüm hedef dizilerin hibridizasyon sonrası oluşturdukları Guanin pik akımları incelendiğinde en yüksek akımın probun tam karşılığı olan hedef diziden, daha sonra bir bazı farklı olan (MM) dizi ve en düşük pik akımının da tüm bazları farklı olan (NC) diziden elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Sabit derişimde hedef, bir bazı farklı (MM) ve hedeften tamamen farklı (NC) baz dizilimi ile hibritleşme sonrası Guanin akımları.

### 3.4 Hedef Dizi Konsantrasyonundaki Değişimin Hibridizasyon Yanıtına Etkisi

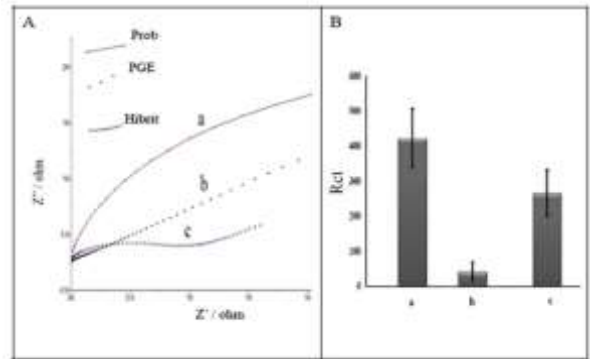
Hibridizasyon derişiminin 0,65 – 5,20 µM arasında artırılması ile hedef DNA konsantrasyon derişiminin yanıtı olan etkisi incelenmiştir. Elde edile veriler ile kalibrasyon eğrisi şekil 7 de gösterilmiştir.



Şekil 7. Hedef DNA konsantrasyon derişiminin yanıtı olan etkisi ve kalibrasyon eğrisi

### 3.4 EIS Çalışması

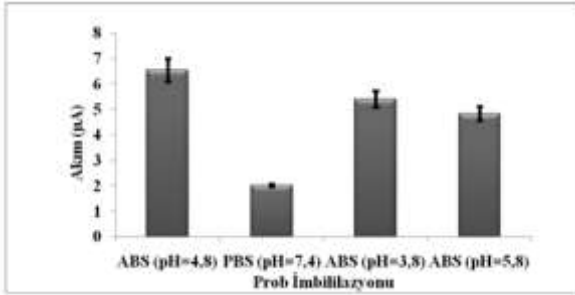
Bu bölümde *Anaplasma Phagocytophilum* DNA hibridizasyonuna ait sonuçlar elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile incelendi. PGE, prob ve hibridizasyona ait EIS sonuçları ve bu sonuçların  $R_{ct}$  değerlerine ait histogramlar Şekil.8'de gösterildi.



Şekil 8. (A) Nyquist diagramları (destek çözeltisi 0,1 M KCl içeren 2,5 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ ). (B)  $R_{ct}$  değerlerine ait histogramlar; (a) *A. Phagocytophilum* Prob (b) PGE, (c) *A. Phagocytophilum* Hibridizasyonu.

### 3.5. İmmobilizasyona pH ve Çözücü Etkisinin İncelenmesi

*Anaplasma phagocytophilu*'u temsil eden tek sarmal dizilerin aktive edilmiş PGE'lere immobilizasyonunda ölçüm alınan çözelti ortamının pH değeri, guanin pik akımlarını doğrudan etkilemektedir. Bu etkiyi görmek ve optimum pH değerinin literatürde [26] verilen ile aynı olduğunu (pH=4,8) teyit etmek amacıyla ölçüm ortamının pH'sı asidik (pH=3,8) ve bazik (pH=7,4) yapılarak ve yine çözücü etkisinin incelenmesi için de ABS tamponu yerine PBS tamponu kullanılarak ölçümler alındı. Ölçüm koşulları olarak prop derişimi 25 µg/mL ve tutturma süresi 6 dakika olarak (daha önce ayin edilen optimum immobilizasyon koşulları) alınmıştır. Sonuçlar Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. Immobilizasyona pH ve çözücü etkisi.

### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada hibridizasyona yönelik DNA biyosensör tasarımı amaçlanmış ve bir biyosensörde bulunması gereken parametreler göz önünde bulundurulmuştur. Bu parametrelerden en önemlileri geliştirilen biyosensörün hassas, seçimliliği yüksek ve düşük maliyetle kısa sürede tayin yapabilmeye elverişli olmasıdır. Herhangi bir etiketlemenin olmadığı ve indikatörün kullanılmadığı hibridizasyon tayin yöntemi kullanılarak tasarımı yapılan biyosensör ile *Anaplasma phagocytophilum* bakterisinin gen dizilimine özgü prob tasarımına bağlı tayini, diferansiyel pulsvoltometri tekniğiyle guanin yükseltgenme sinyalindeki değişimler esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Tayinde hibridizasyon öncesinde biyosensör yüzeyine yalnızca gen

haritasından seçilen bölge (prob) ve aynı bölgeden guanin yerine inozin içeren prob dizilerle yapılan immobilizasyon işleminden sonra ölçümler alınmış; inozin içeren prob sinyal vermezken, guaninli prob dizilerden beklenildiği gibi yüksek sinyaller elde edilmiştir. Hibridizasyondan önce yükseltgenme sinyali vermeyen tek sarmal proba, hedef eşleniği ile hibridizasyona tabi tutulduktan sonra yapılan potansiyel taramasında, yaklaşık +1000 mV civarında [26,27] guanine ait yükseltgenme piki vermesi, hibridizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Guanin bazının yükseltgenme sinyalinin büyüklüğü, PGE yüzeyine immobilize edilen proba bağlı olarak örnekte *Anaplasma phagocytophilum* bakterisine özgü dizinin bulunup bulunmadığına ilişkin bilgi vermiştir. Başka bir deyişle örnekte *Anaplasma phagocytophilum* 'u temsil eden tek sarmal bir gen dizisi mevcut ise, elektrot yüzeyindeki tek sarmal gen dizisi ile hibridizasyon sonrasında alınan ölçümde guanin pik akımları görülecektir. Bu akımlar hem hibridizasyonun gerçekleştiğini hem de örneğin söz konusu bakterinin gen dizisini taşıdığını gösterecek böylece geliştirilen sistem, örneğin alındığı bireyle ilgili olarak pozitif mi yoksa negatif mi olduğuna dair yorum yapabilme imkânı sağlayacaktır. Ayrıca tayinde kullanılan DPV tekniği, diğer elektrokimyasal tekniklere göre daha düşük tayin sınırına da sahiptir [28]. Bu çalışmada geliştirilen biyosensörün herhangi bir işaretleme basamağı ve hibridizasyon indikatörü içermemesi [29,30] de gerek ekonomik açıdan gerekse zaman tasarrufu açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Herhangi bir etiketlemenin yapılmadığı bu biyosensör tasarımıda gerek PGE yüzeyine immobilize edilecek prob için optimum derişim ve tutturma süresi gerekse hibridizasyona girecek olan hedef probun optimum derişim ve etkileşim süresinin belirlenmesi biyosensörün hassasiyetliği açısından oldukça önemlidir. Söz konusu optimum şartların sağlanması için gen dizilerinde yer alan guanin bazının yükseltgenme sinyalleri takip edilmiş ve en yüksek pik akımlarının gözlemlendiği şartlar optimum olarak kabul edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında prob derişiminin 25 µg/mL, prob immobilizasyon süresinin 6 dakika; hibridizasyon için hedef derişiminin 40 µg/mL ve hibridizasyon



süresinin 10 dakika olması gerektiğine karar verilmiştir. Biyosensörün seçiciliğini test etmek amacıyla probun tam eşlenik karşılığı olan dizi yerine bir bazının yeri farklı hedef dizi (MM) ve tüm bazlarının yerleri farklı hedef dizi kullanılarak hibridizasyon yapılmış ve deneyler sonrasında en yüksek pik akımının, probun tam eşlenik karşılığı olan diziden elde edildiği; MM dizisi kullanıldığında pik akımının bariz şekilde düştüğü NC dizisinde ise çok daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında ayrıca EIS ile analizler yapılmıştır. Empedimetrik teknik ile sabit potansiyelde ve farklı frekanslarda hücre içindeki akım ölçümüne bağlı olarak elde edilen empedans değerlerine bağlı analizler yapılmış ve elde edilen sonuçların aktive edilmiş PGE, prob tutturulmuş PGE ve hibridizasyondan sonra PGE yüzeyi için farklı olduğu görülmüştür. Bu farklılığın yukarıda sözü edilen üç PGE yüzeyinin de bir birinden farklı olduğu, özellikle hibridizasyondan sonra PGE yüzey davranışlarının tamamen değişmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Çalışmada, ölçme ortamının pH'sı ve çözücü türünün ne olması gerektiği ile ilgili daha önce birçok çalışma [31,32] olsa da, bu çalışmadaki deney koşulları açısından ortamın pH'sı ve çözücü türünün sonuçlara etkisi araştırıldı. Bu etkiyi görmek ve optimum pH değerinin literatürlerde verilen ile aynı olduğunu (pH=4,8) teyit etmek amacıyla ölçüm ortamının pH'sı asidik (pH=3,8) ve bazik (pH=7,4) yapılarak ve yine çözücü etkisinin incelenmesi için de ABS tamponu yerine PBS tamponu kullanılarak ölçümler alınmış ve literatürdekinden farklı sonuçlar bulunmamıştır. Sentetik dizilerle dizayn edilen DNA biyosensörünün tayin sınırı araştırılmış; bunu belirlemek için hedef derişimi 0,78  $\mu\text{M}$  ile 3,90  $\mu\text{M}$  arasında değişen hedef diziler kullanılmış ve tayin sınırı 0,244  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Bu değer kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan en küçük derişim değerinin de altında olması DNA biyosensörünün yeterli bir tayin sınırına sahip olduğunu göstermiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kene türlerinden bulaşan ve geniş bir konakçı grubunda enfeksiyona yol açan bir patojen olan *Anaplasma phagocytophilum*'un tayinine yönelik bir DNA biyosensörü geliştirilmesi tasarlanmıştır. Bu amaçla tasarlanan biyosensörde, *Anaplasma phagocytophilum* bakterisinin elektrokimyasal olarak tanısı, diferensiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak, tek kullanımlık kalem grafit elektroda (PGE) immobilize edilen DNA'nın gen dizisinde yer alan guanin bazının yükseltgenme sinyalleri esas alınarak ekonomik, güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık PGE'ler kullanılması diğer karbon esaslı elektrotlarla karşılaştırıldığında ucuz olması, her seferinde yeni yüzeylerin kullanılması ve daha tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi açısından da önemli avantajlar sağlamıştır. Çalışmada en uygun hibridizasyon koşullarının bulunabilmesi için sentetik diziler kullanılarak derişim ve süre optimizasyonları yapılmıştır. Ayrıca hedef diziden farklı diziler kullanılarak da geliştirilen DNA biyosensörünün seçiciliği test edilmiştir. Hibridizasyonun gerçekleştiğini teyit etmek amacıyla guanin yükseltgenme sinyallerinin takip edilmesinden farklı olarak elektrokimyasal empedans deneyleri yapılmış ve farklı elektrot yüzeyleri farklı direnç değerlerinin ortaya çıktığı gözlenerek beklenen sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen DNA biyosensöründe herhangi bir etiketlemenin yapılmaması veya indikatör kullanılmaması da ayrıca süre ve maliyet açısından avantajlar sağlamıştır. Ayrıca geliştirilen bu tip biyosensör gelecekte hasta bası analizlerde kullanılmak üzere mikro-üretim teknolojisine uyarlanabilir bir alt yapıya da sahip olduğu düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Kurulu ( CÜBAP) tarafından, Proje No: F-386, desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı CÜBAP'a teşekkür ederiz.

**KAYNAKLAR**

- [1]. Wang J., Rivas G., Cai X., Palecek E., Nielsen P., Shiraiishi H., Dontha N., Luo D., Parrado C., Chicharro M., Farias P.A.M., Valera F.S., Grant D.H., Ozsoz M., Flair M.N., DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review, *Analytica Chimica Acta*, 1997, 347 (1-2), 1.
- [2]. Wang J., Towards genelectronics: Electrochemical biosensing of DNA hybridization, *Chem. Eur. J.*, 1999, 5 (6), 1681.
- [3]. Wang J., Rivas G., Luo D., Cai X., Valera F.S., Dontha N., DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4365.
- [4]. Özkan D., Erdem A., Kara P., Kerman K., Gooding J.J., Nielsen P.E., Özsöz M., Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 462 (1), 39.
- [5]. Fojta M., Havran L., Fulneckova J., Kubicaova T., Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanal.*, 2000, 12, 926.
- [6]. Wang J., Kawde A.N., Erdem A., Salasar M., Magnetic beads based label free electrochemical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 2001, 120, 2020.
- [7]. Meriç B., Kerman K., Özkan D., Kara P., Özsöz M., Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanal.*, 2002, 14(18), 1245.
- [8]. Lumbey-Woodyear T., Campbell C.N., Freeman E. Freeman Georgiou G. Heller A., Rapid Amperometric verification of PCR amplification of DNA, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 535.
- [9]. Kara P., Kerman K., Özkan D., Meriç B., Erdem A., Özkan Z., Özsöz M., Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochem. Commun.*, 2002, 4, 705.
- [10]. Arıksoysal D., Karadeniz H., Erdem A., Şengönül A., Sayiner A.A., Özsöz M., Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance, *Anal. Chem.*, 2005, 77 (15), 4908.
- [11]. Brabec V., Koudelka J., Oxidation of DNA at carbon electrodes the effect of the quality of the DNA sample, *J. Electroanal. Chem.*, 1980, 116, 793.
- [12]. Fojta M., Doffkova R., Palecek E., Determination of traces of RNA in submicrogram amounts of single -or double- stranded DNAs by means of nucleic acid-modified electrodes, *Electroanal.*, 1996, 8(5), 420.
- [13]. Erdem A, Meriç B., Kerman K., Dalbastı T., Özsöz M., Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanal.*, 1999, 11, 1372.
- [14]. Jelen, F., Erdem A., Palecek, E., Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode, *Bioelectrochemistry*, 2002, 55, 165.
- [15]. Pividori M.I., Merkoçi A., Alegret S., Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, 15, 291.
- [16]. Wang A.H.J. Interactions between anti tumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, 1987, Vol.1, 52, (Ed; Eckstein, F., Lilley, D.M.J.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg-Germany.
- [17]. Özkan D., Karadeniz H., Erdem A., Mascini M., Özsöz M., Electrochemical genosensor for Mitomycin C- DNA interaction based

- on guanine signal, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 35, 905.
- [18].Dumitrache M.O., Paştiu A.I., Kalmár Z., Mircean V., Sándor A.D., Gherman C.M., Peştean C., Mihalca A.D., Cozma V., Northern white-breasted hedgehogs *Erinaceus roumanicus* as hosts for ticks infected with *Borrelia burgdorferisensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in Romania, TicksTick-borneDis., 2013, 4 (3) , 214.
- [19].Woldehiwet Z., The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*, Vet. Parasitology, 2010, 167, 108.
- [20].Stuen S., Torsteinbo W.O., Bergstrom K., Bardsen K., Superinfection occurs in *Anaplasma phagocytophilum* infected sheep irrespective of infection phase and protection status, Acta Vet. Scand., 2009, 5, 1.
- [21].Grøva L., Olesen I., Steinshamn H., Stuen S., Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection and effect on lamb growth, Acta Vet. Scand., 2011, 53, 30.
- [22].Stuen S., *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe, Vet. Res. Commun., 2007, 31 (1),79.
- [23].Kathrin H.,Rainer O., Henning F., Stefan O. B., Dieter H., Peter K., Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany, Int. J. Med. Microbiol., 2004, 293(37), 86.
- [24].Petrovec M, Sixl W, Marth E, Bushati N, Wust G, Domestic animals as indicators of *Anaplasma* species infections in Northern Albania, Annuals of the New York Academy of Sciences, 2003, 990, 112.
- [25].Rymaszewska A., Divergence within the marker region of the gro ESL operon in *Anaplasma phagocytophilum*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008, 27, 1025.
- [26].Smrdel K.S., Seret M., Duh D., Knap N., Avsic-Zupanc T. , *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovenia, ParasitesandVectors, 2010, 3, 210.
- [27].Wang J., Cai X., Rivas G., Shiraiishi H. Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, Anal. Chim. Acta, 1996, 326, 141.
- [28].Palecek E., Fojta M., Differential pulse voltammetric determination of RNA at the picomole level in the presence of DNA and nucleic acid component, Anal. Chem., 1994, 66, 1566.
- [29].Meriç B., Kerman K., Özkan D., Kara P., Erensoy S., Akarca U.S., Macsini M., Özsöz M., ). Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue,Talanta, 2002, 56 (5), 939.
- [30].Özkan D., Erdem A., Kara P., Kerman K., Gooding J.J., Nielsen P. E., Özsöz M., Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylen blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, Electrochem. Commun., 2002, 4, 796.
- [31].Erdem A., Özsöz M., Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, Turk. J. Chem, 2001, 25, 469.
- [32].Erdem A., Sayar F., Karadeniz H., Guven G., Ozsoz M., Piskin E., Development of Streptavidin Carrying Magnetic Nanoparticles and Their Applications in Electrochemical Nucleic Acid Sensor Systems, Electroanal., 2007, 19, 798.