

# **Çip Formatında Oligonukleotid ve Aptamer Tabanlı Biyosensör Platformunun Geliştirilmesi**

**Proje No: 108M410**

Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem (Proje Yürütücüsü)  
Dr. Can Özen (Araştırmacı)  
Abdullah Tahir Bayraç (Bursiyer)  
Taner Tuncer (Burs talep edilmemiştir)  
Ceren Karakaş (Burs talep edilmemiştir)  
Sena Cansız (Bursiyer)  
Fatma Kılıbacak (Bursiyer)

Kasım 2010

ANKARA

## ÖNSÖZ

Son yıllarda dizi (array) platformları moleküller tanı alanında oldukça önem kazanmaya başlamıştır. Projemiz kapsamında nükleik asit (DNA), protein ve hücre olmak üzere farklı moleküllerin tayininde kullanılacak dizi (array) platformlarının geliştirilmesi konusunda araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaların tümü TÜBİTAK tarafından sağlanan desteklerle, ODTÜ, Biyolojik Bilimler Bölümü, Nanobiyoteknoloji Ar-Ge Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ODTÜ Merkezi Laboratuvarı Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Biriminden de hizmet alımları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalar sonucunda DNA ve aptamer tabanlı dizi platformları konularında önemli seviyede bilgi birikimi oluşturulmuştur. Bahsi geçen dizi platformlarına yönelik kavram doğrulama çalışmaları da başarı ile tamamlanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar baz alınarak birçok yeni Ar-Ge projesi ve tez çalışması tetiklenmiş olup bazıları projenin sonuçlanmasını takiben ivedilikle başlatılmıştır.

Projede emeği geçen tüm araştırmacılar adına TÜBİTAK'a sağlamış olduğu destekten dolayı teşekkür ederiz.

Saygılarımla,

Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem  
ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü Öğretim Üyesi

Kasım 2010, Ankara

## İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ .....	5
ŞEKİL LİSTESİ .....	6
ÖZET.....	8
ABSTRACT .....	9
GİRİŞ .....	10
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	11
GEREÇ VE YÖNTEM .....	20
1. Materyaller .....	20
2. Parametreler .....	20
3. Replikalar .....	21
4. Kontroller .....	22
5. Prosedür Basamakları.....	22
Prob dizaynı ve sentezi.....	22
Slaytların hazırlanması ve temizlenmesi .....	22
Slaytların yüzeylerinin silanizasyonu ve aktivasyonu.....	23
Oligoların, aktive edilmiş yüzeylere uygulanması .....	23
Hibridizasyon .....	23
Sinyal tespiti.....	23
Aptamer tabanlı biosensörlerinin geliştirilmesi.....	24
Aptamer tabanlı hücre biyosensörleri.....	24
Aptamer tabanlı protein biyosensörleri .....	26
BULGULAR .....	26
1. Floresan Oligonükleotid Tanıma Sistemiyle Sandviç Hibridizasyonunun Optimizasyonu .....	27
1.1. DNA Dizi Platformu .....	27
1.1.1 Oligonükleotidler .....	27
1.1.1.1 Prob 2 (P2) .....	27
1.1.1.2 Adaptör (A) .....	28
1.1.1.3 Eşlenik Olmayan Adaptör (unA) .....	28
1.1.1.4 Prob 1 (P1) .....	28
1.1.2 Kontroller .....	29

1.1.3 Noktalama (Spotting) .....	29
1.2 Aminosilan Kaplama.....	29
1.3 Poli-L-Lizin Kaplama .....	30
1.4 Isı Yoluyla İmmobilizasyon.....	31
1.5 Çapraz bağlayıcı (Crosslinker) Yoluyla İmmobilizasyon.....	31
1.6 Bovin Serum Albümin (BSA) Konsantrasyonu .....	33
1.7 Hibridizasyon Optimizasyonları .....	34
1.7.1 Lamel ve Lamelsiz Hibridizasyon .....	34
1.7.2 Hibridizasyon Sırası .....	34
1.7.3 Hibridizasyon Süresi .....	34
1.7.4 Hibridizasyon Sıcaklığı.....	34
1.7.5 Hibridizasyon Sonrası Yıkama .....	35
1.8 İmmobilize Prob Konsantrasyonu.....	35
1.9 Sinyal Probu (P1) Konsantrasyon Optimizasyonu.....	36
1.10 Hassasiyet Belirlenmesi .....	37
1.11 Slayt Tarama ve Sinyal Analizi.....	37
1.12 Raf Ömrü.....	38
2.Kuantum Noktacıklarının (KN) DNA Dizi Sistemine Adaptasyonu .....	39
2.1 Giriş.....	39
2.2.Kuantum Noktacıkları ile Mikrodizi Çalışmaları .....	39
2.2.1 Yüzey Prob Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	41
2.2.2 Bloklama Süresinin Optimizasyonu.....	42
2.2.3 Adaptör Konsantrasyonunun ve Hassasiyetin Belirlenmesi .....	43
2.2.4 Biotinli Prob 1 (P1-B) Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	45
2.2.5 Hibridizasyon Süresinin Belirlenmesi.....	45
2.2.6 Hibridizasyon Sıcaklığının Belirlenmesi .....	47
2.2.7 Farklı Uzunluktaki Adaptörlerin Sandviç DNA Dizi Sistemine Adaptasyonu..	47

2.2.8 Kuantum Noktacıklarının İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi.....	48
3. Altın Nanoparçacıkların DNA Dizi Sistemine Adaptasyonu.....	49
3.1 Giriş.....	49
3.2 ANP'lerin İşlevselleştirilmesi .....	50
3.3 Farklı Yüzeylerde ANP'li Sandviç Geliştirilmesi ve Gümüş Sinyal Eldesi.....	50
3.4 ANP Bağlanacak Yüzeylerin Bloklanması .....	54
4. Aptamer Tabanlı Sandviç Dizi Platformu Çalışmaları.....	57
4.1 Giriş.....	57
4.1.1 Aptamerler.....	58
4.1.2 Poli-L-Lizin Kaplı Slaytlar.....	59
4.1.3 Noktalama .....	59
4.1.4 Çapraz Bağlama Ajanının Yüzeğe Uygulanma Şeklinin Karşılaştırılması .....	60
4.1.5 Yüzeğe-Sinyal Probu Etkileşim Problemi .....	60
4.1.6 Yüzeğe Bloklanması .....	60
4.1.7 Yıkama Ajanları ve Koşulları.....	61
4.1.8 Aldehid Yüzeğe Kaplanması.....	61
4.2. Trombin Aptameri Mikrodizi Çalışmaları.....	62
4.2.1. Trombin Aktivitesi ve Aptameriyle Bağlanımını Gösteren Çalışmalar .....	62
4.2.2 Mikrodizi Platformu .....	67
4.2.2.1 Temel Aşamalardaki Farklı Uygulamalar .....	68
4.2.2.1.1 Çapraz Bağlama Ajanının Yüzeğe Uygulanma Şeklinin Karşılaştırılması. 68	
4.2.2.1.2 Trombin ve FAM'lı Aptamer Uygulanma Sırasının Denenmesi.....	68
4.2.2.1.3 Epoksi Kaplı Yüzeğe Kullanımı.....	69
4.2.2.1.4 PLL Kaplı Yüzeğe Kullanımı.....	71
5. Lösemi Hücreleri Aptamer Çalışmaları .....	73
5.1 Giriş.....	73
SONUÇ .....	79
REFERANSLAR .....	81
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU .....	86

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1</b> Yüzeğe Probu immobilizasyonu için kullanılan çapraz bağlayıcı .....	31
--	----

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil A. Sandviç platform dizaynı.....	10
Şekil B. Genel SELEX Yöntemi.....	14
Şekil C. Aptamerleri yüzeye bağlayacak farklı arayıcılar.....	26
Şekil 1.1. DNA dizi platformunda kullanılan sandviç formatı.....	26
Şekil 1.2. Poli-L-lizin kaplı yüzeyde oluşturulan sandviç sistemi.....	30
Şekil 1.3. Isı yoluyla P2 immobilizasyonu.....	31
Şekil 1.4. P2'nin Sulfo-EMCS yoluyla cam yüzeye immobilizasyon.....	32
Şekil 1.5. Farklı çapraz bağlayıcılar ile gerçekleştirilmiş sandviç hibridizasyonları.....	33
Şekil 1.6. İmmobilize prob konsantrasyonları.....	35
Şekil 1.7. 20, 40, 50 µM P1 konsantrasyonları ve negatif kontrolleri.....	36
Şekil 1.8. Farklı Adaptör konsantrasyonu ile gerçekleştirilen deney sonuçları.....	37
Şekil 1.9. a)Konfokal mikroskopuyla nokta taraması; a) 4X büyütme b) 20X büyütme.....	38
Şekil 2.1 İki farklı probe-2 konsantrasyonunun karşılaştırılması.....	42
Şekil 2.2 Dört farklı bloklama süresinin karşılaştırılması.....	43
Şekil 2.3 Altı farklı adaptör konsantrasyonunun karşılaştırılması.....	44
Şekil 2.4 Üç farklı P1-B konsantrasyonunun karşılaştırılması.....	45
Şekil 2.5 Dört farklı hibridizasyon süresinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 2.6 İki farklı hibridizasyon sıcaklığının karşılaştırılması.....	47
Şekil 2.7 Üç farklı uzunluktaki adaptörün sandviç dizi platformuna entegrasyonu.....	48
Şekil 2.8 Kuantum noktacıklarının üç farklı inkübasyon sürelerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 3.1 Sandviç prensibine dayalı, altın nanoparçacıkları ile sinyal vermesi Planlanan platformun şeması.....	50
Şekil 3.2 Poli-L-Lizin slaytlarda, Prob 2 kurutulduktan sonra, 10 nm (üst panel) ve 20 nm ANP kullanılarak yapılan sandviç ve gümüş zenginleştirme denemesi.....	51
Şekil 3.3 Poli-L-Lizin slaytlarda, Prob 2 kurutulmadan, 10 nm ve 20 nm ANP kullanılarak yapılan sandviç ve gümüş zenginleştirme denemesi.....	52
Şekil 3.4 Epoksi slaytlarda elde edilen sinyaller.....	53
Şekil 3.5 Farklı konsantrasyonlarda BSA (Bovine Serum Albumin) ve YST (Yağsız süt tozu) kullanılarak yapılan bloklama ile elde edilen gümüş sinyal sonuçları.....	55
Şekil 3.6. Farklı bloklama ve ANP boyutları (10 ve 20 nm) ile yapılan gümüş sinyal sonuçları.....	56

<b>Şekil 4.1.</b> Aptamer sandviç sistemi.....	58
<b>Şekil 4.2.</b> Farklı yıkama ajanları ile alınan sonuçlar.....	61
<b>Şekil 4.3.</b> Aldehid kaplamanın DNA-yüzey etkileşimlerine etkisi.....	62
<b>Şekil 4.4</b> Farklı konsantrasyonlardaki karbonik anhidraz ın %7.5lik Poliakrilamid jel görüntüsü.....	63
<b>Şekil 4.5</b> Farklı konsantrasyonlardaki carbonic anhydrase, conalbumin ve ovalbumin'in %7.5lik Poliakrilamid jel görüntüsü.....	64
<b>Şekil 4.6</b> Eşit miktarda karbonik anhidraz, conalbumin ve ovalbumin'in %7.5'lik poliakrilamid jel görüntüsü.....	65
<b>Şekil 4.7</b> Trombin ve aptamerlerin %7.5'lik poliakrilamid jel görüntüsü.....	66
<b>Şekil 4.8</b> Trombin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi jel görüntüsü.....	67
<b>Şekil 4.9</b> Aptamer 2-FAM ve trombinin bağlanma için uygulanma sıralarının karşılaştırılması.....	69
<b>Şekil 4.10</b> Tek bir epoksi platformu üzerinde üç ayrı kontrol.....	70
<b>Şekil 4.11</b> Trombin sandviç sisteminin PLL yüzeyde denenmesi.....	71
<b>Şekil 4.12</b> Trombin sandviç sisteminin PLL yüzeyde denenmesi.....	72
<b>Şekil 4.13</b> Trombin sandviç sisteminin PLL yüzeyde denenmesi.....	72
<b>Şekil 5.1</b> Aptamer sandviç sistemi.....	73
<b>Şekil 5.2</b> CEM lösemi hücresi ile inkübe edilen yüzeyin mikroskop görüntüsü.....	74
<b>Şekil 5.3</b> CEM lösemi hücresi ile inkübe edilen yüzeyin yıkanma işleminden sonraki mikroskop görüntüsü.....	75
<b>Şekil 5.4</b> Neutral red ile boyanmış CEM hücrelerinin poli-L-lisin kaplı yüzeyde A. 40X mikroskop görüntüsü.....	76
<b>Şekil 5.5</b> Epoksi slaytların üzerine pipet uçlarının taban kısmının epoksi yapıştırıcı ile yapıştırılmasıyla oluşturulan slayt dizaynı.....	77
<b>Şekil 5.6</b> 10µM (A), 5µM (B) ve 1µM (C) sgc8c aptamer sabitlenmiş epoksi yüzeyde CCRF-CEM hücrelerinin 10µM floresan modifiyeli aptamer ile konfokal floresan mikroskop görüntüsü.....	78
<b>Şekil 5.7</b> 10 µM sgc8c aptamer sabitlenmiş yüzeyde CCRF-CEM hücrelerinin floresanlı aptamer ile 4X (A,C) ve 40X (B,D) floresan (A,B) ve ışık (C,D) görüntüsü.....	79

## ÖZET

Projemiz kapsamında nükleik asit (DNA), protein ve hücre olmak üzere farklı moleküllerin tayininde kullanılacak dizi (array) platformlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilmesi hedeflenen platformların sandviç hibridizasyon esasına dayalı olması ve farklı görüntüleme yöntemleri ile çalıştırılması hedeflenmiştir.

Sandviç hibridizasyon esasına dayalı DNA dizi platformunun geliştirilmesi esnasında cam yüzeylerin kaplanması, problemlerin yüzeye tutturulması, adaptör DNA'nın bağlanma koşullarının optimizasyonu, görüntüleme probunun hibridizasyon ve yıkama koşullarının optimizasyonu ve florasan, quantum noktacık ve altın nanoparçacık olmak üzere üç farklı görüntüleme yönteminin geliştirilmesi konusunda araştırmalar yürütülmüştür. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda florasan prob ve kuantum noktacıkları ile görüntülenebilen, düşük arka plan sinyal seviyesine sahip ve oldukça verimli çalışan bir dizi platformuna ulaşılmıştır. Projemizin diğer bölümlerinde aptamer tabanlı dizi platformlarında protein ve hücrelerin algılanabilmesi ile ilgili araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda da aptamerlerin yüzeye bağlanması, protein ve hücrelerin bağlanma koşullarının optimizasyonu ve florasan ve/veya kuantum noktacıkları kullanılarak görüntü alma konusunda araştırmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda yüzeyde oluşturulan aptamer dizilere trombin proteinin özgün olarak bağlandığı ve bağlanan proteinlerin kuantum noktacıkları ile görüntülenebildiği gösterilmiştir. Hücre çalışmalarında da oluşturulan aptamer dizilerine lösemi kanser hücre hatlarının seçici olarak bağlandığı ve florasan işaretli ikincil aptamerler ile işaretlenebildiği gösterilmiştir. Ulaşılan bu sonuçlar protein ve hücre tanısında kullanılacak aptamer dizilerinin geliştirilebilmesi açısından konsept doğrulama niteliği taşımaktadır.

Projemiz kapsamında iki yüksek lisans tez çalışması tamamlanmış, iki doktora tezinin de bazı bölümleri gerçekleştirilmiştir. Proje faaliyetleri sonucunda grubumuz bünyesinde birçok yeni Ar-Ge projesi tetiklenmiş ve bunlara bağlı muhtelif tez çalışmaları başlatılmıştır.

Anahtar Kelimeler: biyosensör, nükleik asit, aptamer, hibridizasyon, cam yüzey, immobilizasyon, floresans, kuantum noktacıkları, altın nanoparçacıkları



## **ABSTRACT**

Within the scope of our project the development of array platforms is proposed for the detection of nucleic acid (DNA), proteins and cells. Platforms thought to be developed by the project are aimed to be based on sandwich hybridization and different screening techniques.

During the development of DNA array platform which is based on sandwich hybridization, researches are conducted for the coating of glass surface, attachment of probes to surface, optimization of binding conditions for adapter DNA, optimization of hybridization and washing conditions for imaging probe and the development of three different imaging methods (fluorescence, quantum dot and gold nanoparticle). As a result of the experiments, array platform which is imaged with fluorescent probes and quantum dots, has a low level of background signal and works efficiently has been reached.

In other parts of the project, aptamer based array platforms are used for the detection of proteins and cells. These studies are composed of optimization of binding of aptamers to surface, optimization of binding conditions of proteins and cells to immobilized aptamers, and detection of signals by quantum dots or fluorescent dyes. As a result of these studies, specific binding of trombin protein to its aptamer immobilized on the surface and imaging of this specific binding with quantum dots are indicated. Also, in cell studies it is shown that aptamer sequences specifically binds to leukemia cancer cell line and this binding is imaged with fluorescence labeled secondary aptamer. Obtained results can be used as concept validation tool for newly developed aptamer sequences for different proteins and cells.

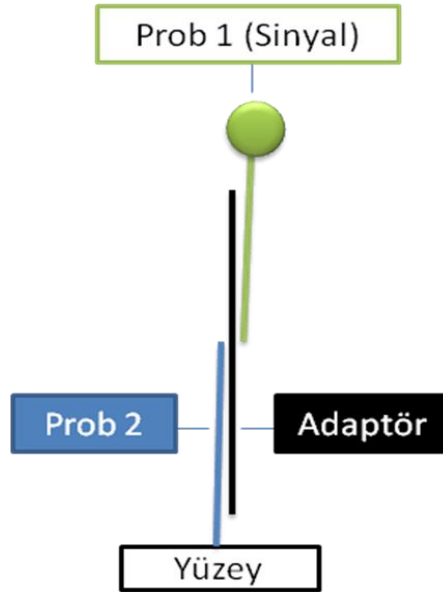
Within the scope of our project two master's thesis are completed and certain parts of two doctoral thesis are performed. As a result of project activities many new R & D projects are triggered within group and many different thesis studies are initiated.

Keywords: Biosensor, nucleic acid, aptamer, hybridization, glass surface, immobilization, fluorescence, quantum dots, gold nanoparticles

## GİRİŞ

Biyosensörler, biyolojik kökenli tanı öğelerini kimyasal, optik, elektrik veya mekanik sinyal iletim mekanizmalarıyla birleştiren cihazlardır. Günümüzde geliştirilme aşamasındaki biyosensörlerin ileride hastalıklara tanı konması, patojen tayini ve çevre kirliliği yaratan maddelerin tespiti gibi amaçlara hizmet etmesi planlanmaktadır. Biyosensörlerin en ilgi çekici özellikleri hızlı sonuç verebilmeleri, uygulamadaki kolaylıkları, yüksek hassasiyetleri ve ucuz maliyetleridir.

Tamamlamış olduğumuz projenin konusu günümüzde kullanılan tanı metodlarına ucuz ve pratik alternatif oluşturabilecek biyosensör cihazlarında kullanılacak verimli bir platformun geliştirilmesidir. Bu platform bir sandviç tasarımı olan cam bir yüzeye sabitlenmiş prob (P2), bu probun tanımayı hedeflediği hedef (adaptör) ve hedefe spesifik işaretli bir sinyal probuna (P1) dayanmaktadır (Şekil A).



**Şekil A.** Sandviç platform tasarımı.

Projenin birinci aşamasında oligonukleotid problar ve adaptör kullanılarak oligonukleotid bazlı bir biyosensör platformu geliştirilmiş ve bu aşamada elde edilen tecrübe ışığında ikinci aşamaya geçilerek aptamer prob tabanlı bir hücre tanı sistemi oluşturulmuştur. Platformun

optimizasyonu farklı yüzey kaplama ve aktivasyon kimyasallarının, yöntem bölümünde detaylandırılan çeşitli parametrelerle beraber denenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

## **GENEL BİLGİLER**

Biyosensörler, kimyasal, optik, elektrik veya mekanik gibi farklı çalışma prensiplerine sahip olabilen tanı cihazlarıdır (Jeronimo, 2007; Koncki, 2007; Nakamura, 2007). Günümüzde geliştirilmeye çalışılan biyosensörlerin ileride; hastalıklara tanı konması, patojen tayini, çevre kirliliği yaratan maddelerin tespiti, kandaki şeker ve üre miktarının tespiti gibi amaçlara hizmet etmesi düşünülmektedir. Biosensörlerin en ilgi çekici özellikleri hızlı sonuç verebilmeleri, uygulamadaki kolaylıkları, yüksek hassasiyetleri ve ucuz maliyetleridir. Örnek olarak, gıda sektöründe zararlı bakterilerin tayininde en sık kullanılan yöntemler PCR, koloni sayımı ve ELISA'dır (Lzacka, 2007). En eski yöntemlerden biri olan koloni sayma metodunda, 16 güne varan sürelerde inkübasyonlar gerekmektedir. PCR yönteminde ise DNA kullanıldığı için hücrelerin canlı olup olmadığı anlaşılabilir. ELISA pahalı olması ve duyarlılığının fazla olmaması nedeni ile diğer iki yöntemle göre günümüzde pek tercih edilmemektedir. Geliştirilecek bir biyosensör ile, aynı anda, hem patojenin DNA'sı, hem herhangi bir yüzey proteini veya toksini ve hatta hücre tespit edilerek bu zorlukların önüne geçilebilir.

Projemiz kapsamında biyosensör cihazlarında kullanılacak verimli bir platformun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yaptığımız platform geliştirme çalışmalarında bir çok parametre denenmiştir. Yüzey olarak literatürde kullanılan cam mikroskop slaytları ve poly-L-lysine modifiyeli slaytlar kullanılmıştır. Yüzeğe oligonükleotid problemlerin bağlanabilmesi için slaytların silanizasyonunda farklı kimyasallar denenmiştir (Halliwell, 2001). Literatürde silanizasyon sonrası problemlerin bağlanabilmesi için kullanılacak birçok heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan bulunmaktadır fakat bunlar cam yüzeyde karşılaştırılmamıştır (Chrisey, 1996). Çalışmamız kapsamında farklı çapraz bağlayıcılar karşılaştırılmıştır. Literatürde bulunan sandviç yöntemi ile hedef oligonükleotid dizisi (adaptör) yakalanabilmektedir (Rautio, 2003; Nugen, 2007). Sandviç sisteminde hedef adaptöre eşlenik iki prob dizisi tasarlanır, problemlardan biri adaptörün bir yarısına, diğeri de adaptörün diğeri yarısına eşleniktir.

Platform geliştirme çalışmaları sırasında, sinyal eldesinde ve optimizasyonda 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar kuantum noktacıkları, florasanlı oligolar ve altın nanoparçacıklar. Çok farklı nanometre boyunda florasan yapabilen boyalar vardır. Bu boyalar içinde FAM ucuz olduğu için sıkça tercih edilen bir boyadır. Fakat uzun vadede, organik boyaların ve florasanların foto-fiziksel özellikleri dolayısıyla uzun süreli görüntüleme ve aynı anda çoklu sinyal belirlemede verimli olarak kullanılamamaları, bu boyaların ileride tercih edilmemelerine neden olacaktır (Xiao, 2005).

Bu yüzden günümüzde biyolojik yapı içine yerleştirilebilen ve daha sağlam foto-fiziksel özelliklere sahip olan kolloidal yapıda, yarı iletken nanokristaller kullanılmaktadır. Bu yapılar kuantum noktacıkları olarak adlandırılmaktadır. Kuantum noktacıklarının geniş bantlı foton emme spektrumları vardır. Dar, simetrik ve ayarlanabilir emisyon bantları sayesinde de yüksek oranda floresans yayabilme kapasitesine sahiptirler (Bang, 2005). Bu özelliklerinden dolayı geleneksel floforlara göre daha avantajlıdır. Kuantum noktacıkları çok çeşitli biyomoleküller için prob olarak kullanılabilirler (Ikebukuro, 2005). Bilim adamları kuantum noktacıklarını kapladıktan sonra antikor, oligonükleotid veya aptamer gibi hedef ajanı eklerler, bu işlem kuantum noktacıklarının ilgili biyomoleküle sıkıca bağlanmasını sağlar (Rodriguez, 2005).

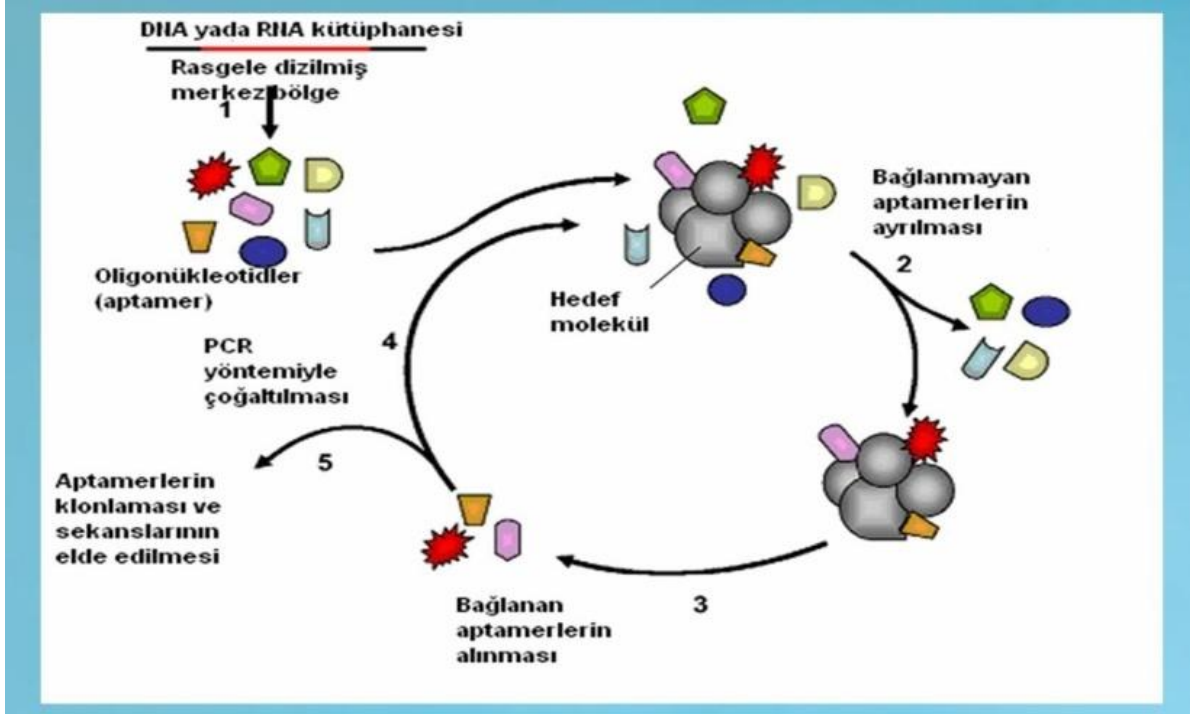
Bunun dışında, çalışmalar altın nanoparçacıklarının da (AuNP) DNA, protein ve metal iyonları gibi biyolojik açıdan önemli maddelerin işaretlenmesinde yeni ve kullanışlı bir araç olduğunu ortaya koymuştur (Demers, 2000; Liu 2004; Huang, 2005). Bu nanoparçacıklar kullanım kolaylığı, pahalı ve karışık deney malzeme gereksinimleri olmaması ve stabil halde bulunmaları nedeniyle diğer işaretleyicilere göre avantaj teşkil etmektedirler (Zhao, 2007). Bu nanoparçacıklara, gümüş uygulandığında ve böylece gümüş nanoparçacıkları ile kaplandığında ışık mikroskobu ile bile görüntü tespit edilebilmektedir (Xie, 2006).

Projenin ikinci kısmında hedef olarak protein ve hücre kullanılmış ve bu hedeflerin algılanması için DNA aptamerler tabanlı platform ve sistemler gerçekleştirilmiştir. Protein hedeflerin algılanması için çalışılan sistemde hedef olarak trombin ve Taq polimeraz hücre olarak ise akut lenfoid lösemi hücreleri kullanılmıştır. Sistemlerde daha önceden bulunmuş aptamerler kullanılmıştır.

Aptamerler farklı hedeflere yüksek etkin ve özgünlükte bağlanabilen DNA ve RNA molekülleridir. ‘Aptamer’ sözcüğü Latince kökenli olup ‘uygun olmak’ anlamına gelmektedir (Famulok, 1994). Bu spesifik oligonükleotidlerin hedeflerine yüksek etkinlikte bağlanmasının sebebi yapılarındaki bazların birbirlerini tamamlayıcı olması değil, farklı dizilerin oluşturduğu farklı üç boyutlu yapılarıdır (Proske, 2005). Literatürdeki yüksek çözünürlükteki yapısal verilere göre aptamer ve hedef molekül arasındaki etkileşimin yüzey alanının geniş olmasından dolayı hedef moleküldeki en küçük değişiklikler bile aptamerin hedef molekülüne bağlanmasını engeller. Aptamerler bu özellikleri sayesinde, bir protein ailesindeki benzer proteinleri ya da aynı proteinin farklı biçimsel ve işlevsel durumlarını bile birbirlerinden ayrılabilirler (Burmeister, 2005). Aynı zamanda aptamerler zeptomolar ( $10^{-21}$ ) gibi çok düşük konsantrasyonlardaki hedef molekülleri algılayabilecek hassasiyete sahiptirler. Böylece aptamerler ELISA, flow sitometri ve mikroskopik çalışmalar için uygun ajanlar haline gelmektedir (Fredriksson, 2002). Kullanılacak olan oligonükleotid tek sarmal DNA ya da RNA olarak belirlenebilir. Çoğu zaman hedeflerle ilgili çok fazla bilgi elde bulunmasa da bu hedeflere çok yüksek etkinlikle bağlanabilecek olan aptamerler seçilebilmektedir. Bağlanacak olan hedefler küçük moleküller, proteinler, nükleik asitler, çeşitli hücreler (hayvan, bitki hücresi, bakteri vb.), dokular olabilir.

Aptamer fikri ilk defa 1990’lı yıllarda 3 farklı grup tarafından birbirinden bağımsız olarak ortaya atılmıştır (Robetson, 1990; Tuerk, 1990; Ellington, 1990). Aptamerler bir *in vitro* seçme çoğaltma tekniği olan SELEX ile üretilmektedir. SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Üssel Zenginleştirilmeyle Ligandların Sistematik Evrimi) bir kombinasyonel bir tekniktir (Tuerk, 1990). Teknikte, DNA veya RNA kütüphanelerinden yüksek etkinlikte olanlar hedef molekül için kombinasyonel teknikler kullanılarak seçilir. SELEX yönteminde ilk adım bir oligonükleotid kütüphanesi hazırlamaktır. Bu kütüphane rastgele dizilmiş 40-80 baz uzunluğunda bir merkez bölgeye sahip olan DNA ya da RNA parçasıyla hazırlanır ve bu merkez bölgenin çeşitliliğiyle yaklaşık  $10^{16}$  oligonükleotid içerir. Bu kütüphane daha sonra PCR yardımıyla çoğaltılır ve hedefe uygulanır. Uygulamadan sonra sırasıyla bu hedefe bağlanmayan ve bağlanan DNA ayrılır. Bağlanan DNA tekrar PCR yöntemiyle çoğaltılarak hedefe uygulanır ve bağlanmayan ve bağlanan DNA ayrılır. Bu her dönüş bir SELEX turu olarak kabul edilir. Bu SELEX turları genellikle 10 ile 12 tur arasında devam ettirilir ve elde edilen DNA hedefe güçlü bağlanma özelliği taşır. Daha sonra elde edilen DNA klonlanarak dizisi çıkarılır. SELEX yöntemiyle

elde edilen aptamerler çeşitli biyoteknolojik araştırmalarda, hastalıkların tanı ve tedavi aşamalarında çok önemli görevler üstlenebilir.



**Şekil B.** Genel SELEX Yöntemi. Oligonükleotid kütüphanesi üretilir ve hedefe uygulanır (1). Uygulanan hedefe bağlanmayan oligonükleotidler ayrılır (2). Ve daha sonra hedefe bağlanan aptamerler ortamdan uzaklaştırılır (3). Bağlanan aptamerler PCR yöntemiyle çoğaltılır (4) ve seçilmiş olan aptamerler bir sonraki SELEX turu için kullanılır. SELEX turları sonunda elde edilen aptamer klonlanır, dizilimi çıkarılır (5).

Biyolojik algılama dendiğinde akla ilk olarak antikorlar gelmektedir fakat aptamerler antikorlara göre bir çok yönden daha avantajlıdır. Antikorlar biyolojik sistemlerde bağışıklık sistemine tepki olarak üretilir ancak aptamerler hayvanlardan bağımsız, *in vitro* üretilirler. Bununla beraber, antikorlar sadece bağışıklık sistemini tetikleyen moleküller ile sınırlıyken, aptamerler her türlü ilaç ve hatta toksik moleküllere bağlanabilme özelliği gösterirler. Ek olarak, antikorlar fizyolojik koşullarda üretildiği için genellikle sadece fizyolojik koşullarda çalışır ama aptamerlerin seçim koşulları (pH, tampon çeşidi, tuzlar, vb.) istenildiği gibi ayarlanabilir ve dolayısıyla istenilen koşullarda etkin çalışır. Aptamerler kimyasal sentez ile üretildiği için üretim farklılığı içermez fakat antikorlar üretimden üretime farklılık

gösterebilir. Buna ilaveten, aptamerler yüksek sıcaklık, pH gibi elverişsiz şartlara dayanırken, antikorlar geri dönüşümsüz denatürasyona uğrarlar. Son olarak, antikorlar sıcaklık ve nemden çok kolay etkilenebildikleri için soğuk muhafazaya gereksinimleri vardır ve bu sebepten raf ömürleri çok kısadır, fakat aptamerler oda sıcaklığında kolaylıkla saklanabilirler ve bu da onların raf ömürlerinin uzun olmasını sağlar (Ellington, 1990).

Aptamerler günümüzün en çok araştırılan hastalıklarından biri olan kanser ve türleri için bir umut ışığı taşımaktadır. Ayrıca çabuk sentezlenmeleri ve bir deney tüpünde bile elde edilebilmeleri açısından yaygındırlar ve bu özellikleri sayesinde bir çok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Aptamerler bugüne kadar hedef onaylama, diagnostik, biyosensör, saflaştırma ve tedavi amaçlı kullanılmışlardır. Aptamerlerin hedef moleküllere bağlanabilme özellikleri sayesinde teşhis alanında önemli rol oynarlar. Hedef molekülün yüzeyindeki spesifik bir antijene bağlanarak, hem hedefin varlığının hem de nerede olduğunun gözlemlenmesini sağlarlar. Aptamerler kimyasal olarak sentezlenebildikleri için 3' ve 5' uçlarına kolaylıkla biotin, amino ya da başka işlevsel gruplar eklenebilir. Bu sayede aptamerler taşıyıcı yüzey üzerine sabitlenebilir ve hedef maddeye bağlanarak onun saflaştırılmasını sağlarlar. Aptamerler hem küçük yapılar olması dolayısıyla hem de vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılabilmeleri özellikleri sayesinde diğer farmasötiklere oranla terapatik olarak daha çok tercih edilmektedirler. Ayrıca kolesterol ve polietilen glikol guruplarının aptamere eklenmesiyle, bu tür terapatiklerin biyoyararlanımları artırılmıştır (Proske, 2005).

Mevcut biyosensör sistemlerinin aptamer tabanlı sensör sistemlerinde temel olarak kullanılması ve yeni tanı sistemlerinin geliştirilmesi 2000li yıllarla birlikte hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalarla aptamer tabanlı sensör sistemleri hedef tanı mekanizmasına göre elektronik aptasensör, optik aptasensör, aptazyme ve aptabeacon olarak sınıflandırılabilir (Mairal, 2008). 2005 yılından itibaren yapılan ve geliştirilen bir aptasensör çeşidi olan aptamer tabanlı elektronik sensör kendilerine özgü hedef moleküllerine bağlandıklarında aptamerlerle tutturuldukları çeşitli elektrot yüzeyleri arasındaki elektron transferini algılayan sensörlerdir. Elektronik aptasensörler elektron transdüksiyon yöntemine göre elektrokimyasal, alan etkin ve piezoelektrik olmak üzere üç gruba ayrılabilir (Willner, 2007).

Elektrokimyasal aptasensörlerin temel çalışma prensibi indirgenme/yükseltgenme özelliği taşıyan çeşitli moleküllerle işaretlenen aptamerlerin tiyol gruplarıyla altın yüzeye sabitlenmesi

ve sabitlenen aptamerin kendine özgü hedef molekülüne bağlanmasıyla elektrot yüzeyinde oluşan negatif ya da pozitif elektron akım değişiminin tanınmasıdır. 2005 yılında ilk örneklerinin çalışılmaya başlandığı elektrokimyasal aptasensörler de temel prensip korunmuş fakat aptameri işaretlemek için kullanılan moleküller çeşitlilik göstermiştir (Willner, 2007). Bu tip sistemlerde indirgenme/yükseltgenme özelliği bulunan çeşitli enzimler, inorganik ya da organik katalizörler, platinyum nanoparçacıkları ve metilen mavisi sıklıkla kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda hedef protein olarak sıklıkla trombin seçilmiş ve trombinin aptamere bağlanmasından sonra aptamerin üç boyutlu yapısındaki değişimin indirgenme/yükseltgenme özelliği olan farklı moleküllerin etkisiyle elektron transferindeki rolü çalışılmıştır (Willner, 2007; Xiao 2005; Bang, 2005; Ikebukuro, 2005; Rodriguez, 2005; Song, 2008; Bergveld, 2003).

Elektronik aptasensörlerin diğer bir çeşidi olan alan etkin transistörlerin temel çalışma prensibi alan etkin transistörlerde bulunan iki elektrot arasındaki anahtar yüzeye çeşitli fonksiyonel gruplarla sabitlenen aptamerin hedef moleküle bağlandığında anahtar yüzeyde oluşturduğu elektron yükündeki değişimin tanınmasıdır (Bergveld, 2003; Dzyadevych, 2006; Schöning, 2002; Schöning, 2006; Shin, 2004; Fritz, 2002; Kim, 2004.; Uslu, 2004; Sakata, 2005). Bu alternatif elektronik aptasensör uygulamalarında karbon nanotüpler de aptamerlerin sabitlenme yüzeyi olarak kullanılabilir (So, 2005).

Elektronik aptasensörlerin son çeşidi aptamer tabanlı piezoelektrik sensörlerdir. Bu tür aptasensörlerin temel çalışma prensibi elektrokimyasal aptasensörlerdeki elektron akım değişiminden ya da alan etkin transistorlerdeki elektron yükü değişiminden farklı olarak sensör yüzeyindeki ağırlık değişimini baz almaktadır. Çeşitli fonksiyonel gruplarla piezoelektrik kuartz kristal yüzeyine sabitlenen aptamerin hedef moleküle bağlanmasıyla kristal yüzeyde ağırlığının artması kristalin rezonans frekansında azalmaya sebep olur (Tombelli, 2005; Minunni, 2004).

Elektronik aptasensörlerin yanı sıra diğer bir aptasensör çeşidi optik aptasensörlerdir. Basit yapılı, düşük maliyetli ve radyoaktivite temeline dayalı olmayan nükleik asit işaretleme yöntemlerinin keşfi, nükleik asit hibridizasyon problemlerinin tanı sistemlerinde yaygın olarak kullanılmasının miladını oluşturmaktadır. Bunlardan biri olan floresanlı hibridizasyon problemleri, sadece hedef moleküle bağlandıkları takdirde sinyal verme özellikleri sayesinde



gerçek zamanlı gözlem sağlamaktadırlar (Marras, 2006). Bununla beraber, ticari olarak çok sayıda florofor ve söndürücünün (quencher) varlığı ve kolay uygulanabilirliği sayesinde floresanlı izleme tekniği, aptamer işaretlemelerinde sıkça kullanılmaktadır.

Son aptasensör çeşidi aptabeaconlardır. Moleküler işaretçiler nükleik asitlerin belirlenmesinde kullanılan biyosensörler olarak bilinirler. Bu nükleik asit problemleri kendilerini tamamlayıcı nükleik asit hedefleriyle hibritlendikten sonra kendiliğinden biçimsel değişime uğrarlar ve bu da kolaylıkla gözlemlenebilecek renk değişimine yol açar. Teorik olarak bilinen herhangi bir aptamerin 5' ucuna küçük bir nükleotid sekansı ekleyerek yeni bir moleküler aptamer işaretçisi elde edilebilir. 5' ucuna eklenen sekans aptamerin 3' ucuna tamamlayıcı olacağından dolayı moleküler aptamer işaretçisi kıvrılarak U şeklini alır. 5' ucuna florofor kovalent bağ yapacak şekilde eklenir. 3' ucunda floresanlı quencher bağlanır. Hedef molekülün yokluğunda bu moleküler aptamer işaretçisi U şeklini korur. Florofor ve floresanlı quencher birarada bulunacağı için floresans baskılanır ve herhangi bir görüntü alınamaz. Fakat hedef molekülün bağlanmasıyla, aptamer işaretçisi bükülür ve hem floroforun hemde floresanlı quencher'ın kendisinden uzaklaşmasına sebep olur. Böylece ikisi birbirinden uzaklaşarak serbest kalır ve floresan ışığı yaymaya başlar. Bu artış hedef molekülün ortamda belirlenmesinde büyük rol oynar (Mairal, 2008).

Lösemi kan yapımında görevli organlarda oluşan hematolojik bozukluklardan kaynaklanan ve kan hücrelerinin özellikle de lökositlerin normalin üzerinde çoğalması ile kendini gösteren bir kanser türüdür. Lösemi akut lenfoid lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML) ve kronik lenfoid lösemi (KLL) olmak üzere dört çeşittir (Kasteng, 2007).

Lösemi türleri içerisinde ALL en çok gözlenen çocukluk çağı kanseridir ve 15 yaşın altındaki çocuklarda gözlenen lösemilerin % 80'ini oluşturmaktadır. ALL normalde lenfosit adı verilen olgun kan hücresi tipine dönüşmesi gereken lenfoblast isimli olgunlaşmamış kan hücrelerinin artması ile karakterizedir (Pui, 2008). ALL'nin küçük yaşlarda görülmesi ve yüksek bir yüzde ile rastlanması sebebi ile erken ve hızlı teşhisi önemlidir. Şu an ALL tanısı için kullanılan yöntemlerde patolojik morfoloji, immüno fenotiplendirme, genetik özellikler, klinik karakterler ve moleküler bulguların sonuçları optimal kullanılarak karar verilmektedir (Han, 2005). Şu anda kullanılan tanı sistemlerinin birçoğu kemik iliğinden biyopsi ile elde

edilen örneklerin hücre kültürü ile çoğaltılmasını gerektirmektedir. Bu kadar yaygın bir hastalıkta hızlı tanı sistemlerinin olmaması literatürdeki büyük eksikliklerden biridir. Bunun yanında farklı lösemi tiplerinin birbirinden ayrılması detaylı mikroskopik ve flowsitometrisi teknikleri ile mümkün olmaktadır (Pui, 2008). Daha önceki kısımlarda belirtildiği gibi aptamerler hedeflerini nano ve pikomolar seviyelerde ve çok özgün tanıyan biyolojik ajanlardır. ALL tanısında kullanılmak üzere geliştirilecek aptamer tabanlı bir tanı sistemi gerekli zamanı düşürmenin yanında, hücre kültürü yapma gerekliliğini ortadan kaldırabilecek ve istenilen hücre hattına hassas tanıma sağlanabilecektir.

Doğrudan hücelere yapılmış aptamerler, hedef hücrede kontrolden farklı olan yüzey elemanlarına bağlanarak hassas hücre tayini sağlayabilmektedir. Shangguan ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışma ile kanserli hücelere özel ilk aptameri üretmişlerdir (Shangguan, 2006). Bu çalışma sonucu elde edilen aptamerlerden sgc8  $K_d=0.8$  nM bağlanma kapasitesi ile en iyi performansı göstermiş ve daha sonraki çalışmalarda en çok kullanılan aptamerlerden biri olmuştur. Sgc8 CCRF-CEM isimli bir akut lenfoid lösemi hattı kullanılarak seçilmiş bir DNA aptamerdir. Üretilen bu aptamer ALL örneklerinde denenmiş ve hastalığı içeren hücreleri kontrol gruplarından başarı ile ayırdığı gösterilmiştir (Shangguan, 2006; Shangguan, 2007). Geliştirilen bu aptamerlerin kullanımı genellikle mikroskopik araştırmalarla sınırlı kalmıştır. Tanı için yalnız Medley ve arkadaşları 2008 yılında sga16 aptameri ve altın kürecikleri kullanarak çalışan bir sistem oluşturmuş ama bu sistemde kullanılan nanoküreciklerin kontrol grubu hücrelerinde düşükte olsa bir bağlanma göstermesinden dolayı doğrudan tanıda kullanılabilecek bir sistem oluşturulamamıştır (Medley, 2008).

Sgc8 çok özgün ve etkin bir şekilde ALL tanısında kullanılabilecek bir biyolojik ajan olmasına rağmen literatürde tanıda kullanılabilecek hızlı bir platform ve sistemin bulunmaması dikkat çekmektedir. Proje kapsamında geliştirmeye çalıştığımız sistemde bu yüzden hedef olarak ALL seçilmiştir.

Çalışmamızda aptamerin bağlanması için seçilen hedef proteinlerden biri, trombin, daha önceki aptamer tabanlı sensor uygulamalarında özellikle elektrokimyasal aptasensör uygulamalarında sıklıkla kullanılmıştır. Literatürde trombin proteininin aptasensör uygulamalarında sıklıkla seçilmesi aslında bu protein tanı sisteminin ne kadar önemli

olduğunun bir göstergesidir. Trombin kanda bulunan önemli fonksiyonlara sahip serin aminoasit içerikli bir proteaz enzimidir (Wang, 2006; Mir, 2006; Bock, 1992; Dougana, 2003). Fibrinojeni fibrine çevirerek kanın pıhtılaşmasında önemli bir role sahip olmasının yanı sıra yara ve ameliyat izlerinin kapanmasında ve iltihaplanmalarda da fonksiyonları görülmüştür (Wang, 2006). Ayrıca Rodriguez ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılan çalışmada akciğer kanserinin yayılması tanısında önemli bir tümör ajanı olduğu saptanmıştır (Hernandez-Rodriguez, 1997). Bu önemli fonksiyonlarından dolayı trombinin temel ve klinik çalışmalarda tanısı ve nicel analizi önem kazanmıştır. İlk olarak 1992 yılında Bock ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada trombine özgü yüksek etkinlikte bağlanan DNA aptamer grubu bulunmuştur (Bock, 1992). Bu grup içerisindeki iki aptamerin bağlanma etkinliklerinin diğerlerine göre daha yüksek olması ve trombin proteininin farklı bölgelerine bağlanabilme özellikleri nedeniyle daha sonra yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmışlardır. Dolayısıyla bu çalışmada literatürdeki çalışmaların sağladığı bilgi birikiminden ve ikili aptamer sisteminin bulunmasından dolayı trombin hedef proteinlerden biri olarak seçilmiş ve ülkemizdeki protein tanı sistemindeki eksikliğin giderilmesi hedeflenmiştir.

Diğer hedef protein olarak seçilen Taq DNA polimeraz enzimi ısıya karşı dayanıklı, yüksek sıcaklıklarda yapısını ve aktivitesini kaybetmeyen bir polimeraz enzimidir. Bu enzim yüksek sıcaklıklardaki doğal kaynak sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilir ve polimeraz zincir reaksiyonlarında DNA'nın çoğaltılmasında kullanılır. DNA polimeraz ve 5'-3' egzonükleaz fonksiyonları olan iki bölgeden oluşan ve 832 aminoasitlik yapı içeren bir polimerazdır (Oktem, 2007; Yakimovich, 2003; Dang, 1996). İlk olarak 1996 yılında Dang ve arkadaşları tarafından Taq DNA polimeraza karşı aptamer dizayn edilmiştir (So, 2005). Seçilen bu aptamer polimeraz zincir reaksiyonu sırasında istenmeyen DNA'nın çoğalmasını engellemek amacıyla kullanılmış ve oda sıcaklığında enzime bağlanıp polimeraz fonksiyonunu engellediği görülmüştür. Bu çalışmada hedef proteinlerden biri olarak Taq DNA polimeraz seçilmesinin amacı daha önce grup olarak Taq DNA polimeraza karşı seçilen aptamerin manyetik kürelerle saflaştırılma çalışmalarının yapılmış olması ve dolayısıyla bu konudaki bilgi birikiminin fazla olmasıdır (Oktem, 2007). 2007 yılında grubumuz tarafından yayınlanan "Single-Step Purification of Recombinant *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Using DNA-Aptamer Immobilized Novel Affinity Magnetic Beads" isimli makalenin ve öncesindeki temel bilgilerin ışığında Taq DNA polimerazın hedef protein seçilmesi ülkemizdeki bilgi ve uygulama eksikliğinin gidermesinde katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

# GEREÇ VE YÖNTEM

## 1. Materyaller

- MilliQ ultra-distile su (direnç >18 MΩcm): Tüm kimyasallar bu kalitede su ile hazırlanmıştır.
- 3-APMES (3-aminopropil-trimetoksisilan) (Fluka), 3-APTES (3-aminopropil-trietoksisilan) (Fluka), 3-MPTS (3-Merkaptotrietoksisilan) (Flurochem) veya 3-GPMS (3-Glycidyloksiopropil-trimetoksisilan)
- [N-e-Maleimidocaproyloxy] sulfosuccinimide ester (EMCS), succinimidyl 4-[maleido-phenyl]butyrate (SMPB), m-maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide ester (MBS), succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), N-(γ-maleimidobutryloxy) succinimide ester (GMBS), m-maleimidopropionic acid-N-hydroxysuccinimide ester (MPS) ve N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate (SIAB) (Pierce (Rockford, IL), Sigma Kimyasal (St Louis, MO))
- Histidin, borat, sodyum sitrat salin ve fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltileri
- Altın nanoparçacıkları (20nm) (Sigma)
- Tiyol gruplu oligolar (Prob 2), adaptör oligo, FAM (6-Carboxyfluorescein ,florasan kimyasal) bağlı oligo (Prob 1), kuantum noktacıklara bağlamak için biotinli oligo (Prob 1) (IDTDNA)
- Streptavidinli Kuantum Noktacıklar (Evident Technologies)

## 2. Parametreler

Optimum koşulların bulunması için farklı alanlarda parametreler araştırılmıştır.

- Yüzey: Basit mikroskop cam slaytları veya poly-L-lysine modifiyeli cam slaytlar
- Silanizasyon kimyasalları: 3-APMES, 3-APTES, 3-MPTS veya 3-GPMS

- Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı kimyasallar: EMCS, SMPB, MBS, SMCC, GMBS, MPS veya SIAB
- Bloklama ajanı: BSA (Bovin Serum Albümin)
- Tampon solüsyonları: Literatürde daha önce benzer amaçlar için kullanılmış olan histidin, borat, sodyum sitrat salin ve fosfat tamponlu salin (PBS) tampon solüsyonları farklı konsantrasyonlarda denenmiştir.
- Yüzeğe bağlanma uygulama sırası:
  - 1) Çapraz bağlayıcı ve prob 2, konjugasyon sonrası yüzeğe uygulanır.
  - 2) Çapraz bağlayıcı yüzeğe konjuge edildikten sonra prob 2 uygulanır.
- Hibridizasyon uygulama sırası:
  - 1) Adaptör ve prob 1 eşlendikten sonra yüzeğe sabitlenmiş prob 2'ye uygulanır
  - 2) Adaptör ve prob 1 daha önce eşlenmeden, sırayla yüzeğe sabitlenmiş prob 2'ye uygulanır
- Hibridizasyon sıcaklığı: Prob ve adaptör dizilerine bağlı olarak farklı sıcaklıklar denenmiştir.
- Hibridizasyon uzunluğu: Prob 1 ve 2'nin adaptörle oluşturacağı ikili sarmal yapıda yer alacak nükleotid sayısının alt ve üst sınırları ve optimum uzunluğu belirlenmiştir.
- Uyumsuzluk Toleransı: Prob 1 ve 2'nin dizilerinde yapılacak değişikliklerle, kaç tane nükleotit farkına rağmen adaptöre bağlanacakları araştırılmıştır.
- Raf süresi: Yüzeğe kaplama ve Prob 2'nin yüzeğe bağlanma aşamalarından sonra slaytların hangi koşullar altında ve ne kadar süreyle saklanabileceği araştırılmıştır.

### 3. Replikalar

- Replikalar 5 bağımsız ölçümden oluşmuştur ve kıyaslanacak değerler bu replikaların ortalamasıdır.

#### 4. Kontroller

- Prob 2 içermeyen uygulama ile yüzeye Adaptör ve Prob 1 eklendiğinde, yüzeyde bağlanacak bir Prob 2 olmadığı için sinyal alınmamalıdır.
- Adaptör içermeyen uygulama ile Prob 2 ve Prob 1 eklendiğinde, adaptör olmadığı için sinyal alınmamalıdır.
- Adaptör yerine Prob2 ve Prob 2'ye eşlenik olmayan başka bir oligo dizisi uygulanacak, ve hibridizasyon ve dolayısıyla Prob1 tutulmadığı için sinyal alınmamalıdır.

#### 5. Prosedür Basamakları

##### Prob dizaynı ve sentezi

- Adaptör dizi belirlenmiş, bu adaptörün her iki yarısına eşlenik gelecek iki prob dizayn edilmiş ve böylece sandviç sistemi oluşturulmuştur (Şekil A).
- Bu problemlerin kendi aralarında eşlenik olmamalarına ve kendi içlerinde ikincil yapı oluşturmamalarına dikkat edilmiştir.
- Aktive edilmiş cam yüzeye bağlanacak prob (P2), tiyol grubu modifiyeli olarak üretilmiştir. Öte yandan, 3 çeşit Prob 1 üretilmiştir. Bunlar, altın nanoparçacıklara bağlanacağı için tiyol gruplu, FAM modifiyeli ve kuantum noktalara bağlanacağı için biotinli üretilmiştir (IDT).

##### Slaytların hazırlanması ve temizlenmesi

- Cam slaytların yüzeyleri kaplanmadan önce, pirana (Sülfürik asit : Peroksit, 3:1 ) çözeltisi ile derinlemesine temizlenmiştir.
- Pirana çözeltisinde bekletilen slaytlar milliQ ultra-distile su (direnc  $>18 \text{ M}\Omega\text{cm}$ ) ile 3 defa durulanmış, her türlü çözelti hazırlanmasında ve durulama işleminde bu kalitede su kullanılmıştır.

### **Slaytların yüzeylerinin silanizasyonu ve aktivasyonu**

- Silanizasyon için en uygun alkiloksisilanı bulabilmek amacı ile farklı kimyasallar denenmiştir. Temizlenen slaytların yüzeyleri silanizasyon kimyasalları ile muamele edilerek silanizasyon işlemi yapılmıştır. Belirli oranlarda uygun alkiloksisilan çözeltileri hazırlanmış ve uygulanmıştır.
- Silanize edilen yüzeyler, fonksiyonel gruplu oligoların bağlanabilmesi için heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı kimyasallar ile aktive edilmiştir.
- Belirli süre 37 °C bekletilen slaytlar PBS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. 37 °C'de kurutulan slaytlar, uygulamalar için hazır hale getirilmiştir.

### **Oligoların, aktive edilmiş yüzeylere uygulanması**

- Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış tiyol fonksiyonel gruplu oligo prob 2 (P2), yüzeylere mikropipet yardımı ile uygulanmıştır. Belirli bir süre, uygun sıcaklıkta beklenerek oligoların aktive edilmiş yüzey ile bağlanması sağlanmıştır.
- Bağlanmayan oligolardan kurtulmak için slaytlar yıkanmıştır.

### **Hibridizasyon**

- Hibridizasyon öncesi, adaptörün ve uygulanacak sinyal probunun (P1), aktive olmuş cam yüzeye yapabileceği istenmeyen bağlanmaları ortadan kaldırmak amacıyla, özgün olmayan yüzeyler BSA ile bloke edilmiştir.
- Önceden hibridize edilen adaptör ve adaptörün yarısına eşlenik olan P1, P2 bağlanmış yüzeylere uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda adaptör ve P1 uygulamaları yapılmıştır. P1-P2 ile Adaptör arasındaki hibridizasyon için uygun sıcaklık hesaplanmış ve bu sıcaklıkta slaytlar belirli bir süre inkübe edilmişlerdir.
- Daha sonra bağlanamayan oligolardan kurtulmak için slaytlar yıkanmıştır.

### **Sinyal tespiti**

Projede 3 farklı sinyal sistemi kullanılmıştır.

- FAM

- 6-FAM gruplu P1, hibridizasyon aracılığı ile yüzeye bağlandığı için bu sinyal, floresan mikroskop ile tespit edilebilmiş ve yüzey karakterizasyonu yapılmıştır.
- Altın nanoparçacıklar
  - Tiyol modifiyeli oligo P1, literatürdeki metotlarla altın nanoparçacıkların (AuNP) yüzeyine bağlanmıştır. (Storhoff, 1997)
  - Hazırlanan oligolu AuNP'lerin (P1) tespiti için gümüş uygulaması yapılmış, mikroskop altında AuNP'lere bağlanan gümüş parçacıkları tespit edilmiş ve sinyal alınmıştır.
- Kuantum noktacıklar
  - Literatürdeki metotlarla biotinli oligolar, streptavidinli kuantum noktacıkları ile birleştirilmiştir (Liu, 2007).
  - Daha sonra bunlar, adaptör ile birleştirilerek cam yüzeylere uygulanmış ve böylece sinyal uygun dalga boyunda floresan mikroskop ile tespit edilmiştir.

### **Aptamer tabanlı biosensörlerinin geliştirilmesi**

- Projenin aptamer uygulamaları içeren bölümlerinde optimize edilmiş sisteme sabitlenecek aptamerlerin üzerinde yapılacak değişikliklerin ve denenecek sistemin bağlanma üzerindeki etkisi araştırılmıştır.
- Projede kullanılan bütün modifiye ve normal oligonükleotid dizileri IDTDNA<sup>®</sup> (Leuven, Belçika) şirketinden temin edilmiştir.

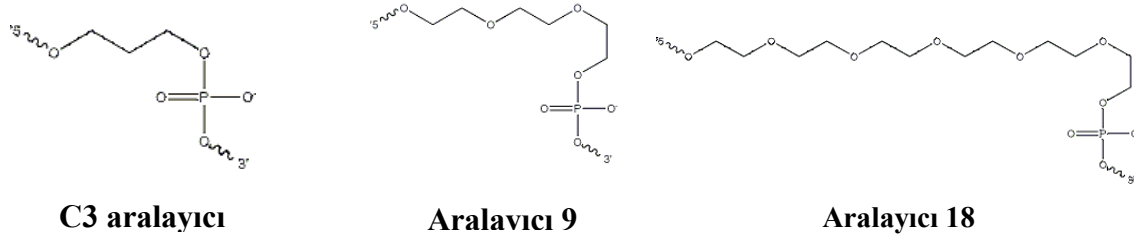
### **Aptamer tabanlı hücre biyosensörleri**

- Hücre tabanlı çalışmalarda hedef hücre olarak CCRF-CEM tipi T akut lenfoid lösemi hattı (CCL-119) kullanılmıştır. Deneylerde kontrol grubu olarak CRL-1596 Ramos B Burkitt lenfoma hücreleri kullanılmıştır. Böylece geliştirilen sensörün farklı tip kanser hücrelerini ayırt edip edemeyeceği belirlenmiştir. Gerekli hatlar LGC-Promochem (Wesel, Almanya) şirketinden temin edilmiştir.



- Çalışmada kullanılan hatlar RPMI 1640 (Sigma) besiyerinde % 10 FBS (fetüs bovin serum) (GIBCO) ve 100 ünite/mL penisilin kullanılarak süspansiyon kùltüre alınmıştır.
- Kanser çalışmalarında Tan ve arkadaşlarının geliştirdiği sgc8, sga16 ve sgc8c dizileri kullanılmıştır. Kullanılmak üzere seçilen aptamerlerin hedefe bağlanma afiniteleri son derece yüksek olup, bağlanma sabiti literatürde sırasıyla  $K_d=0.80\text{nM}$ ,  $K_d=5.0\text{nM}$ ,  $K_d=0.78\text{nM}$  olarak belirlenmiştir.
- Projenin ilk kısmında elde edilen sonuçlara göre oligonùkleotidlerin sabitlenmesinde seçilen en uygun yüzey ve gerekli heterobifonksiyonel krosbağlayıcı kimyasalları aptamer tabanlı sistemin geliştirilmesinde temel yapı olarak kullanılmıştır.
- Seçilen aptamerler tiyol eklenmiş olarak sentezlettirilerek aktif hale getirilmiş yüzeye sabitlenmiştir, artan aptamerler tampon çözelti ile yıkandıktan sonra hedef hücreler ortama eklenmiştir, aptamerin aktif olarak çalıştığı tampon çözeltide kısa bir süre bekletildikten sonra florasan, quantum parçacığı veya gümüş kaplı altın parçacıkları ile işaretlenmiş raportör ikincil aptamer ortama eklenmiş ve tekrar uygun tampon çözelti ile yıkanmıştır.
- Hedef ortamda olmadığı zaman raportörle işaretlenmiş aptamer bir yere bağlanmamasından dolayı ortamdaki yıkanacaktır böylece sinyal sadece hedef olduğu zaman alınacaktır.
- Deneyler hedef hücre tipi ve aptamerin bağlanmadığı kontrol hücreleriyle tekrarlanıp özgünlüğu ve hassasiyeti ortaya koyulmuştur. Yapılan biyosensörlerin data analizleri üniversitemiz bünyesinde bulunan merkezi laboratuvardaki konfokal mikroskop (Zeiss) kullanılarak yapılmıştır, florasan yoğunlukları görüntü analiz programı ile ölçülmüştür.
- Hücrelerin algılanması bu sistemle optimize edildikten sonra kullanılan aptamerlerin farklı varyasyonlarla yüzeye bağlanması ve raportör olarak kullanılması denenmiş ve uygun ikili seçilmiştir.

- Bunun için kullanılan aptamerler (sgc8, sga16 ve sgc8c) 5' ve 3' uçlarından farklı ikili varyasyonlar denenmiş yüzeyde ve raportör olarak kullanılmıştır (sgc8 yüzeyde-sga16 raportörlü, sga16 yüzeyde- sgc8c raportör gibi).
- Kullanılan aptamerlerin yüzeyle ve raportörle olan etkileşimlerinden dolayı üç boyutlu yapılarını kaybedip bağlanma özelliklerinin azalmasını engellemek için farklı aralayıcı kimyasallar kullanılmıştır. Bu aşamada aptamerlerin yüzeye ve raportöre bağlanacak bölümlerinin arasına etkileşimi azaltmak için Şekil 2 de verilen C3, Aralayıcı 9 ve Aralayıcı 18 isimli, ticari olarak üretilen aralayıcılar kullanılmıştır. Aralayıcılar oligonükleotid diziler üretilirken aktif gruplardan (tiol, florasan gibi) önce üretici firma tarafından eklenmiştir.



**Şekil C.** Aptamerleri yüzeye bağlayacak farklı aralayıcılar

### **Aptamer tabanlı protein bivosensörleri**

- Çalışmanın bu bölümünde trombin model protein olarak kullanılmıştır. Kullanılan 15 ve 29 baz çifti uzunluğundaki trombin aptamerleri IDTDNA tarafından sentezlenmiştir.
- Çalışmada BSA kontrol protein olarak kullanılmıştır. Hücre kısmında denenen bütün parametreler protein kısmında da tekrarlanmıştır.

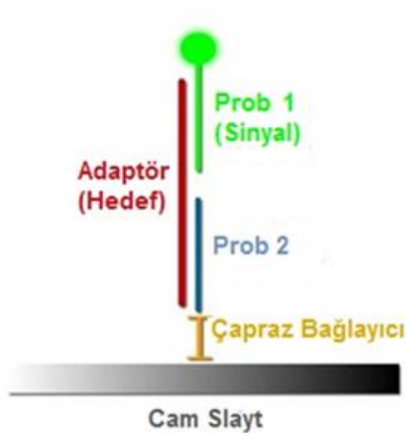
## **BULGULAR**

108M410 no'lu projemizin toplam 24 aylık dönemi için çalışma takviminde belirttiğimiz iş paketleri başarıyla tamamlamıştır. Yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular aşağıda detaylı olarak sunulmaktadır.

# 1. Floresan Oligonükleotid Tanıma Sistemiyle Sandviç Hibridizasyonunun Optimizasyonu

## 1.1. DNA Dizi Platformu

Daha önce de belirtildiği gibi proje kapsamında oluşturulan sistem sandviç formatına dayalı bir DNA dizi platformudur. Genel hatlarıyla platform, hedef DNA dizisi, cam slayt yüzeye çapraz bağlayıcılar yardımıyla immobilize edilmiş ve hedef DNA dizisinin bir kısmına eşlenik şekilde tasarlanmış Prob2 (P2) ve hedef DNA dizisinin diğer bir kısmına eşlenik ve sinyal molekülü taşıyan Prob1 (P1)'den oluşmaktadır.



Şekil 1.1. DNA dizi platformunda kullanılan sandviç formatı.

### 1.1.1 Oligonükleotidler

Çalışmada kullanılan oligonükleotidler Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

#### 1.1.1.1 Prob 2 (P2)

- Yüzeyle sabitlenen oligonükleotid prob 2 (P2) olarak adlandırılmıştır.
- P2'nin 5' ucu tiyol modifikasyonu taşımaktadır.

- Dizilim: 5'-/5ThioMC6-D/AAA AAA AAA GCA TCT TCA ACG ATG GCC TTT CCT TT -3'

#### 1.1.1.2 Adaptör (A)

- Tespit edilmesi amaçlanan oligonükleotid adaptör (A) olarak adlandırılmıştır. Adaptör optimize edilmiş platform tarafından tespiti amaçlanan DNA dizilimini temsil etmektedir.
- Dizilim: 5'- GCT CCT ACA AAT GCC ATC ATT GCG ATA AAG GAA AGG CCA TCG TTG AAG ATG C -3'

#### 1.1.1.3 Eşlenik Olmayan Adaptör (unA)

- Negatif kontrol olarak kullanılan ve P2 veya P1'e eşlenik olmayan oligonükleotid.
- Dizilim: 5'- ACC CTG TAA ACG ATC ATC CCC ATT TTT TAC GGC CAATTG GAG GCCTCC CAAT -3'

#### 1.1.1.4 Prob 1 (P1)

- Prob 2 tarafından yüzeyde tutulacak adaptöre eşlenik olan ve bir sinyal molekülü taşıyan oligonükleotid prob 1 (P1) olarak adlandırılmıştır.
- P1 3' ucunda floresan bir boya olan 6-karboksifloresin (6-FAM) molekülü taşımaktadır.
- Dizilim: 5'-TCG CAA TGA TGG CAT TTG TAG GAG CAA AAA AAA A/6-FAM/ -3'

Tasarlanan oligonükleotidler moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan yazılımlar kullanılarak

- Hedeflenen hibridizasyon (adaptor ile prob 2 ve prob 1 arasında),
- İstenmeyen hibridizasyon (prob 2 ve prob 1 arasında) ve

- İkincil yapı (secondary structure) ve saç tokası (hairpin) oluşumu açılardan test edilmiş ve dizilimden kaynaklanan herhangi bir problem ortaya çıkmamıştır.

### **1.1.2 Kontroller**

- Pozitif Kontrol: Yüzeğe sabitlenen P2'nin 3' ucunda 6-FAM sinyali taşıyan versiyonu kullanılmış ve yüzeğe prob immobilizasyonu ve sinyal tespiti için pozitif bir kontrol sağlanmıştır.
- Negatif kontroller: Yanlış sinyal (false positive) tespitine yol açacak P1-yüzey, P1-P2 ve P1-unA (eşlenik olmayan adaptör)-P2 etkileşimleri de deneylere dahil edilerek başarılı sonuç için alınan sinyalin sadece P2-A-P1 kompleksinden gelme koşulu kontrol edilmiştir.

### **1.1.3 Noktalama (Spotting)**

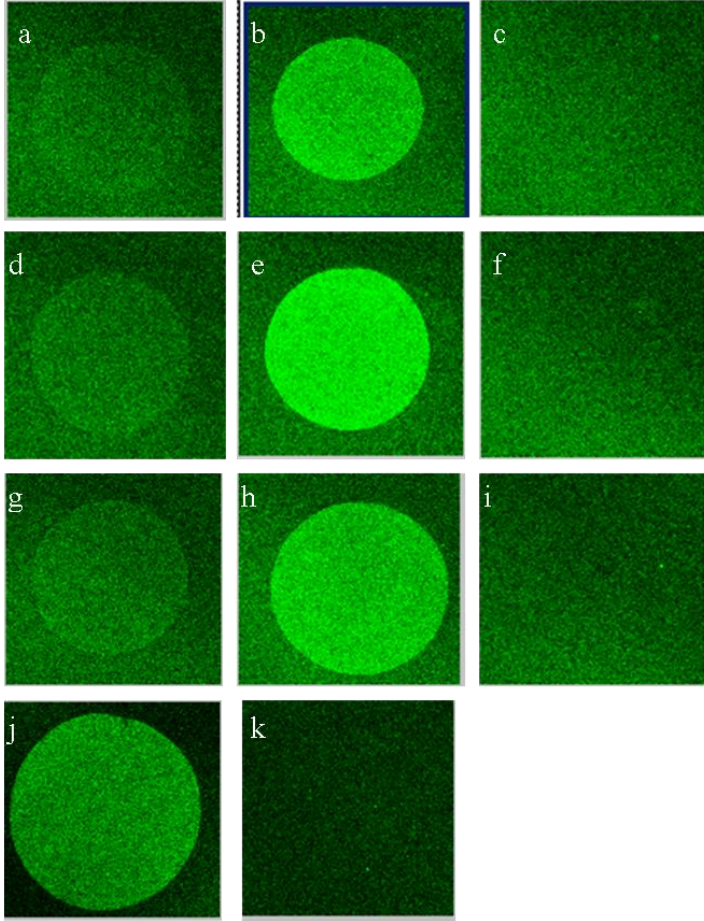
- P2 solüsyonu cam yüzeğe mikropipet yoluyla 0.5 µL olarak damlatılmıştır.
- Hibridizasyon aşamasında A ve P1 solüsyonu P2 üzerine mikropipet yoluyla 4 µL olarak damlatılmıştır.
- Noktalama sonrası slaytlar buharlaşmayı engellemek amacıyla nemlendirme haznesinde inkübe edilmişlerdir.

## **1.2 Aminosilan Kaplama**

Yüzeğe P2 immobilizasyonu için gerekli aktivasyon için literatürde oldukça sık kullanılan amino fonksiyonel grupları tercih edilmiştir. Bu kapsamda Isolab/Marienfeld marka cam slaytlar, pirana çözeltisi (Sülfürik asit:Hidrojen Peroksit, 3:1 ) ile organik maddelerden temizlenerek hidroksile edildikten sonra %1, %5 ve %10'luk 3-aminopropil-trimetoksisilan (3-APTMS) solüsyonuyla silanize edilmiştir.

### 1.3 Poli-L-Lizin Kaplama

Aminosilan çalışmalarına paralel olarak Thermo Scientific firmasından temin edilen Polysine marka poli-L-lizin kaplı cam slaytlar kullanılarak da sandviç platformları oluşturulmuştur. Gözlemlerimiz poli-L-lizin kaplamanın ömrünün, sinyal şiddeti, arkaplan (background) ve geçerli negatif kontroller açısından son derece önemli olduğuna işaret etmektedir. Slaytlar son kullanma tarihine yaklaştıkça sonuçlar da kötüleşmektedir. Öte yandan, aminosilan kaplı slaytlarla kıyaslandığında poli-L-lizin kaplamanın daha güçlü sinyal ve daha temiz bir arkaplan sağladığı gözlemlenmiştir (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Poli-L-lizin kaplı yüzeyde oluşturulan sandviç sistemi

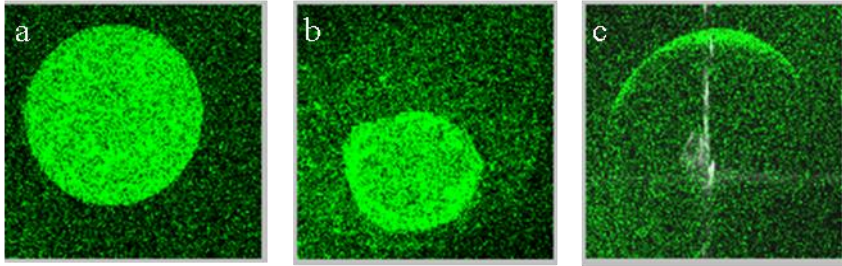
**a)** %1 3-APTMS) sandviç **b)** %1'lik 3-APTMS pozitif kontrol **c)** %1'lik 3-APTMS negatif kontrol **d)** %5'lik 3-APTMS sandviç **e)** %5'lik 3-APTMS pozitif kontrol **f)** %5'lik 3-APTMS negatif kontrol **g)** %10'luk 3-APTMS sandviç **h)** %10'luk 3-APTMS pozitif kontrol **i)** %10'luk 3-APTMS negatif kontrol **j)** Poli-L -lizin slayt sandviç **k)** Poli-L -lizin slayt negatif kontrol

#### 1.4 Isı Yoluyla İmmobilizasyon

Ekonomik bir sabitleme yöntemi olması sebebiyle öncelikli olarak tercih ettiğimiz ısıtma yöntemiyle aktive edilmiş cam yüzeylere tiyol modifiye oligonükleotidlerin sabitlenmesi, literatürde çeşitli örnekleri gösterilen bir metoddur. Aminosilan ve poli-L-lizin aktive edilmiş cam yüzeylere P2 noktalandıktan sonra slaytlar 1 saat boyunca 80°C derecede tutulmuştur.

Isı immobilizasyonunda karşımıza çıkan en önemli problem, negatif kontrollerde %50'yi aşan sinyal gözlemi olmuştur (Şekil 1.3). Buna ek olarak çapraz bağlayıcı metoduyla oluşturulan platformla kıyaslandığında ısı metodu daha zayıf sinyal ve daha kirli bir arkaplan oluşturmuştur.

Isıyla sabitleme metodunda yaşanan problemleri gidermek için iki ay kadar süren bir optimizasyon çalışması yapılmış ve yıkama solüsyonlarının konsantrasyonu ve yıkama süresi dereceli olarak artırılmıştır. Bu çalışmalar sonucu negatif kontrollerde yaşanan problem giderilememiş veya güçlü yıkama koşullarının denendiği durumlarda sandviç noktalarından alınan sinyal de kaybolmuştur.

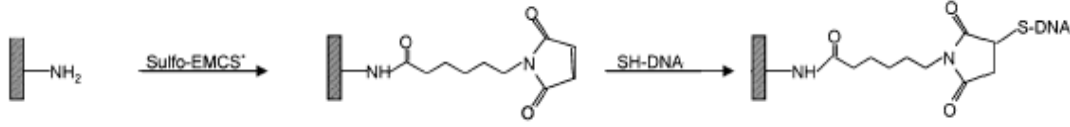


Şekil 1.3. Isı yoluyla P2 immobilizasyonu; a) sandviç, b ve c) negatif kontroller.

#### 1.5 Çapraz bağlayıcı (Crosslinker) Yoluyla İmmobilizasyon

Isı metoduna alternatif olarak cam yüzeydeki amino gruplarına tiyol modifiye oligonükleotidleri kovalent olarak tutturmak için heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar olan N-e-Maleimitokaproiloksi sulfosüksinimit ester (Sulfo EMCS) ve Süksinimidil-[N-maleimitopropiyon amido]-n etilenglikol ester (SMPEG<sub>n</sub>); n=2, 6, 12 kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcının (NHS) ester grubu pH 7-9'da birincil aminlerle reaksiyona girerek amid bağ

oluşmasını sağlar. Bununla birlikte, çapraz bağlayıcının diğer ucundaki maleimit grubu pH 6.5 - 7.5 aralığında sulfhidril gruplarla reaksiyona girerek stabil tiyoeter bağların oluşumunu sağlar. (Şekil 1.4)



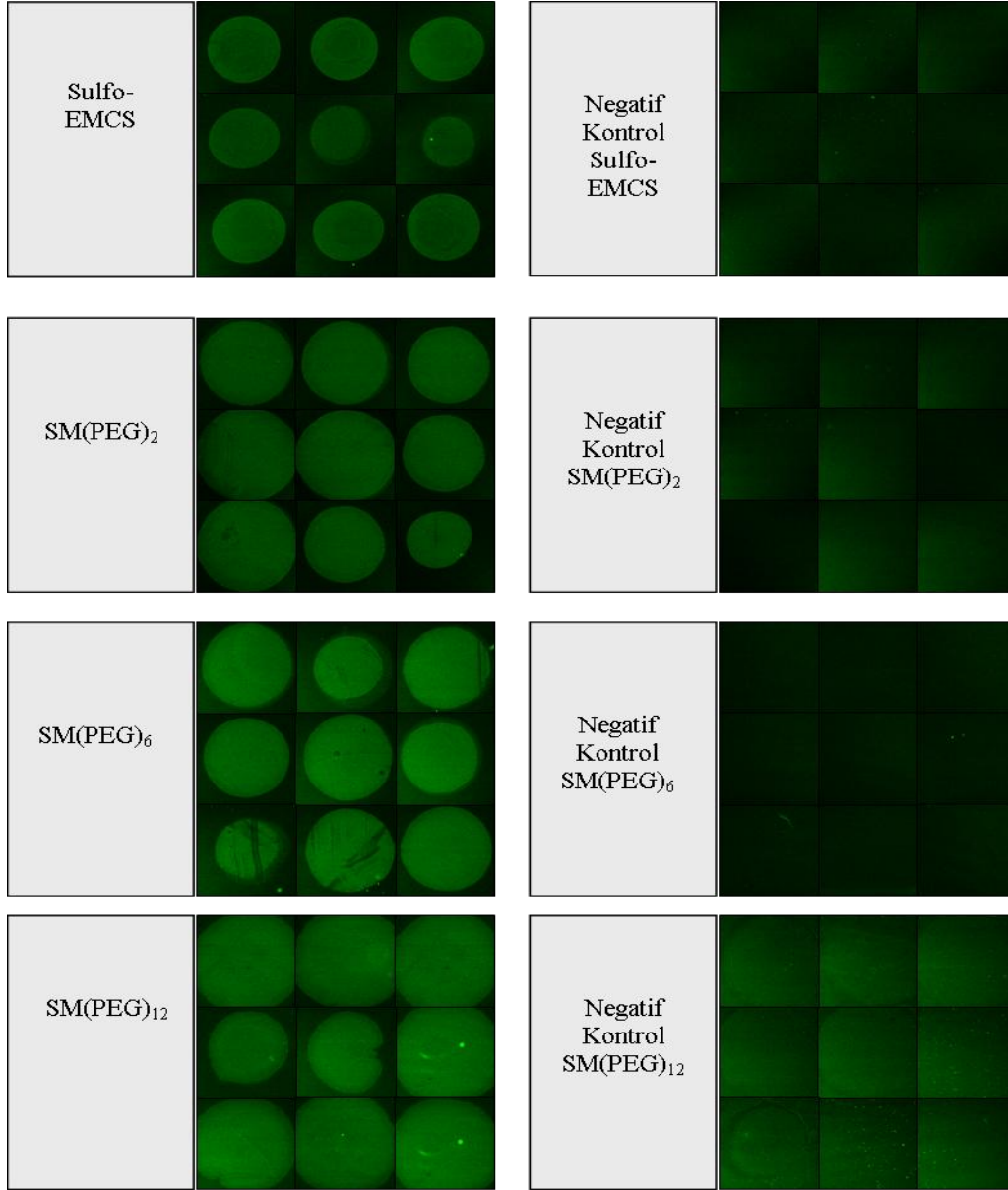
**Şekil 1.4.** Prob 2'nin Sulfo EMCS çapraz bağlayıcısı yoluyla cam yüzeye immobilizasyonu.

Elde edilen başarılı sonuçlar (Şekil 1.3) ışığında platform optimizasyonuna çapraz bağlayıcılar kullanılarak devam edilmiştir. Buna istinaden farklı uzunluklardaki çapraz bağlayıcılar da deney planına eklenerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Deneylerde kullanılan bağlayıcılar ve uzunlukları Tablo 1'de gösterilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda 32.5 Å uzunluğundaki çapraz bağlayıcı SM(PEG)<sub>6</sub>'nın sandviç sisteminde en iyi sinyali verdiği gözlemlenmiştir. Yüzeyden uzaklaştıkça sinyalin artması halihazırda yapılmış olan çalışmaların ışığında (Bajaj, 2000) beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmekle birlikte en uzun çapraz bağlayıcıyla oluşturulan sistemden daha az sinyal elde edilmesi sterik faktörlere bağlanmıştır.

**Tablo 1** Yüzey Probu (Prob2) immobilizasyonu için kullanılan farklı uzunluktaki çapraz bağlayıcılar

Çapraz Bağlayıcı İsmi	Aralayıcı Kimyasal Uzunluğu
N-e-Maleimitokaproiloksi sulfosüksinimit ester ( <b>Sulfo_EMCS</b> )	9.4 Å
Süksinimidil-[N-maleimitopropiyon amido]-2 etilenglikol ester <b>SM(PEG)</b>	17.6 Å
Süksinimidil-[N-maleimitopropiyon amido]-6 etilenglikol ester <b>SM(PEG)<sub>6</sub></b>	32.5 Å
Süksinimidil-[N-maleimitopropiyon amido]-12 etilenglikol ester ( <b>SM(PEG)<sub>12</sub></b> )	53.4 Å





**Şekil 1.5.** Farklı çapraz bağlayıcılar ile gerçekleştirilmiş sandviç hibridizasyonları

### 1.6 Bovin Serum Albümin (BSA) Konsantrasyonu

BSA, P2 yüzey immobilizasyonu sonrasında cam yüzeyde açıkta kalan reaktif amino gruplarını immobilizasyon öncesi bloklamak amacıyla %1 ve %2 olarak kullanılmış ve %1'lik konsantrasyonun nispeten daha temiz bir arka plan sağladığı gözlemlenmiştir.

## 1.7 Hibridizasyon Optimizasyonları

### 1.7.1 Lamel ve Lamelsiz Hibridizasyon

Hibridizasyon aşaması lamel kullanarak ve kullanmayarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Lamelsiz uygulamada her nokta için 4 µL hibridizasyon solüsyonu uygulanmıştır. Lamelli uygulamada ise 25 µL hibridizasyon solüsyonunu slayt üzerine uygulandıktan sonra yüzey lamel ile kapatılmıştır. Lamel uygulamasının arkaplan gürültüyü az miktarda artırmasına karşın başarısız negatif kontrol sonuçlarını azaldığı gözlemlenmiştir.

### 1.7.2 Hibridizasyon Sırası

P2 immobilize edilmiş yüzeye adaptör ve P1 aşağıdaki kombinasyonlarda uygulanmıştır:

- 1) Adaptör ve P1, 12 saat hibridizasyon sonrası yüzeydeki P2 ile 12 saat,
- 2) P2 ve adaptör, 12 saat hibridizasyon sonrası P1 ile 12 saat,
- 3) P2, P1 ve adaptör 24 saat

inkübe edilmiştir. En kuvvetli sinyal 1 numaralı kombinasyonda, (A+P1) + P2, tespit edilmiştir.

### 1.7.3 Hibridizasyon Süresi

2 saat süresince inkübe edilen adaptör ve P1 solüsyonunun P2 ile hibridizasyonu 2.5, 5, 12, ve 24 saatlik sürelerle çalışılmıştır. En yüksek sinyal ve en temiz arka plan 12 saatlik hibridizasyon süresi sonunda elde edilmiştir. 2.5 saat ve 5 saatlik inkübasyonların arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

### 1.7.4 Hibridizasyon Sıcaklığı

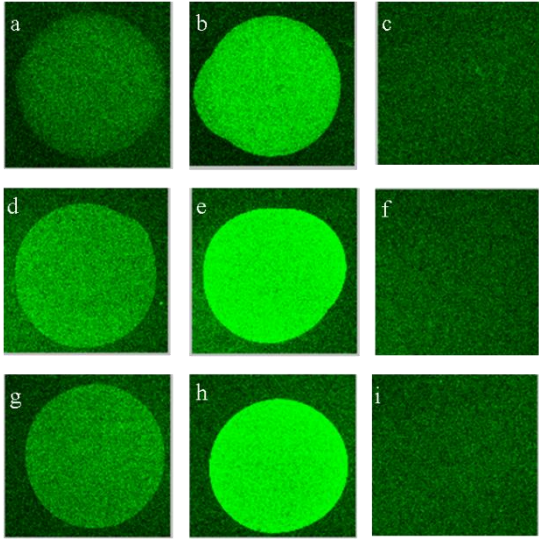
Bu madde altında ikili sarmal erime sıcaklığının ( $T_m$ ) altındaki 35°C ( $T_m-20$ ), 40°C ( $T_m-15$ ) ve 45°C ( $T_m-10$ ) sıcaklıklarda hibridizasyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir ve 35°C kontroller ve sinyal açısından en ideal sıcaklık olarak belirlenmiştir.

### 1.7.5 Hibridizasyon Sonrası Yıkama

Hibridizasyon sonrası yüzeye spesifik olmayan şekilde bağlanmış A ve P1'i uzaklaştırmak için tampon çözeltisi konsantrasyonu, yıkama süresi, yıkama sıcaklığı ve çalkalama hızı gibi parametreler optimize edilmiştir. 5 dakikalık 1X SSC (sodyum klorür sodyum sitrat) ve 0.1X SSC ardından ultra saf suyla yapılan yıkama optimal yıkama için yeterli bulunmuştur.

### 1.8 İmmobilize Prob Konsantrasyonu

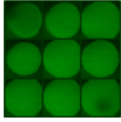
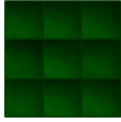
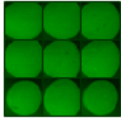
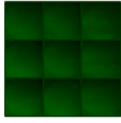
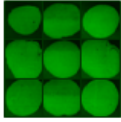
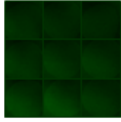
Cam yüzüye sabitlenen oligonükleotid (P2) miktarının alınan sinyale etkisi, noktalama solüsyonundaki P2 konsantrasyonunu 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ve 20  $\mu$ M olarak değiştirerek araştırılmış ve 10  $\mu$ M üstü konsantrasyonda gözle görülür bir iyileşme saptanmadığı için çalışmalara bu konsantrasyonda P2 solüsyonu kullanılarak devam edilmiştir (Şekil 1.6).



**Şekil 1.6.** İmmobilize prob konsantrasyonları **a)** 1  $\mu$ M P2 sandviç **b)** 1  $\mu$ M P2 pozitif kontrol **c)** 1  $\mu$ M P2 negatif kontrol **d)** 10  $\mu$ M P2 sandviç **e)** 10  $\mu$ M P2 pozitif kontrol **f)** 10  $\mu$ M P2 negatif kontrol **g)** 20  $\mu$ M P2 sandviç **h)** 20  $\mu$ M P2 pozitif kontrol **i)** 20  $\mu$ M P2 pozitif kontrol

## 1.9 Sinyal Probu (P1) Konsantrasyon Optimizasyonu

Bilindiği üzere sandviç hibridizasyon yöntemine dayalı DNA dizi platformumuzda, hedef diziye eşlenik, sinyal molekülünü taşıyan DNA dizisi Prob 1 (P1) olarak adlandırılmıştır. P1'in sistemdeki en optimum konsantrasyonunu belirleyebilmek için deneyler gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları Şekil 1.7'de gösterilmektedir.

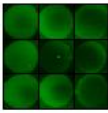
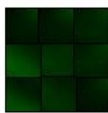
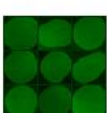

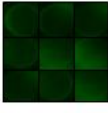
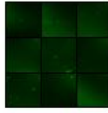
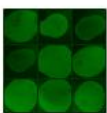

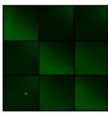
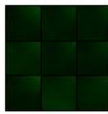
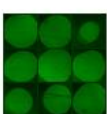

	Sandviç	Negatif Kontrol
20 $\mu$ M P1		
40 $\mu$ M P1		
50 $\mu$ M P1		

**Şekil 1.7.** 20, 40, 50  $\mu$ M P1 konsantrasyonları ve negatif kontrolleri. Deneyde 9 replika kullanılmıştır.

Tasarlanmış deneyde üç farklı konsantrasyondaki (20, 40, 50  $\mu$ M) P1, optimize edilmiş DNA dizi platformuna uygulanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Buna göre, en düşük konsantrasyon olan 20  $\mu$ M ve en yüksek konsantrasyon olan 50  $\mu$ M arasındaki farkın çok büyük olmaması nedeniyle çalışmalara literatürde de sıkça kullanılan bir değer olan 20  $\mu$ M P1 konsantrasyonu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

## 1.10 Hassasiyet Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizi Adaptör (A) ile gerçekleştirilen deneylerde, geliştirilen DNA dizi platformunun tespit edebileceği minimum adaptör konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan deney sonuçları Şekil 1.8’de gösterilmektedir.

	Sandviç	Negatif Kontrol		Sandviç	Negatif Kontrol
0.05 $\mu\text{M}$ Adaptör			0.1 $\mu\text{M}$ Adaptör		
0.01 $\mu\text{M}$ Adaptör			1 $\mu\text{M}$ Adaptör		
0.001 $\mu\text{M}$ Adaptör			10 $\mu\text{M}$ Adaptör		

**Şekil 1.8.** 0.001, 0.05, 0.01, 0,1, 1, 10  $\mu\text{M}$  Adaptör konsantrasyonu ile gerçekleştirilen deney sonuçları. Deneyde 9 replika kullanılmıştır.

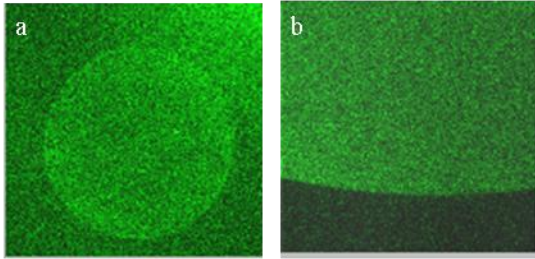
Deney sonuçlarına göre platformun sinyal verebileceği en düşük adaptör konsantrasyonu (hassasiyet) 0.01  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir.

## 1.11 Slayt Tarama ve Sinyal Analizi

Sonuç raporunda sunulan tüm sinyaller aksi belirtilmedikçe konfokal lazer tarama mikroskopunda 488 nm argon lazeriyle uyarı yapılarak, 4X büyütme objektif (numerik açıklık 0.1) ve uzun geçişli (long pass) LP505 filtre seti kullanılarak 1024x1024 çözünürlükte ve 12 bit olarak kaydedilmiştir.

Civa ark lambası, Yeşil Floresan Protein (YFP) filtre seti ve CCD sensör tipinde renkli bir kamera kullanılarak epi-floresans modunda alınan sinyal, çok daha güçlü bir uyarı kaynağı (lazer) ve daha hassas bir dökümantasyon sistemine (Fotoçoğaltıcı Tüp, PMT) sahip konfokal modunda alınan sinyal ile kıyaslandığında konfokal taramanın çok daha güçlü bir sinyal ve temiz bir arkaplan sağladığı görülmüştür.

Mikroskopla tarama metodunda kullandığımız 4X büyütme 0.1 numerik açıklığa sahip objektiften alınan sinyal, numerik açıklığı 0.5 olan 20X büyütme bir objektiften alınan sinyal ile kıyaslandığında (Şekil 1.9), numerik açıklığın sinyal/gürültü oranı açısından ne kadar önemli olduğu göze çarpmaktadır. Yüksek maliyetli ve nanolitre seviyelerinde noktalama yapabilen bir dizileme robotu (array robot) kullanma imkanımız olmadığı için mikropipetler yoluyla ancak mikrolitre seviyelerinde noktalama yapmaya kısıtlı kalındığından her bir nokta çapı 20X objektifin görme alanı dışına taşmaktadır. Homojen sinyal dağılımının olmadığı bazı durumlarda tüm nokta alanının kaydedilmesi gerektiği için çalışmalara 4X objektifle devam edilmiştir.



**Şekil 1.9.** a)Konfokal mikroskobuyla nokta taraması; a) 4X büyütme b) 20X büyütme.

## 1.12 Raf Ömrü

P2 immobilize edilmiş slaytlar adaptör ve P1 uygulanmadan önce bir ay saklanarak raf ömrü test edilmiştir. Bir aylık sürenin sonunda kullanılan slaytlarda çok yüksek oranda arkaplan gürültüsü ortaya çıkmıştır.

## **2.Kuantum Noktacıklarının (KN) DNA Dizi Sistemine Adaptasyonu**

### **2.1 Giriş**

Kuantum noktacıkları, bir başka deyişle yarı-iletken nanokristaller, büyüklükleri 5 ila 25 nanometre arasında değişen flüoresan nanoparçacıklardır. Yüksek kuantum verimine ve fotostabilitesine sahip bu parçacıklar, organik flüoresan boyalara kıyasla sağladıkları avantajlar sayesinde optik uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır.

Platform hedef DNA dizisi, cam slayt yüzeye çapraz bağlayıcılar yardımıyla immobilize edilmiş ve hedef DNA dizisinin bir kısmına eşlenik şekilde tasarlanmış Prob2 (P2) ve hedef DNA dizisinin diğer bir kısmına eşlenik ve Prob1-Biyotin (P1-B)'den oluşmaktadır. Sinyal, streptavidine bağlı kuantum noktacığının biyotin işaretli Prob 1'e bağlanması sonrası uygun şekilde uyarılarak emisyon sinyali alınması sonucu elde edilmektedir.

Çalışmalarda Invitrogen firmasından temin edilmiş Qdot® 565 ITK streptavidin konjüge (Q10131MP) kuantum noktacıkları kullanılmıştır. Bu noktacıklar yarı iletken kristal olan kadmiyum selenit (CdSe) çekirdek ve çekirdeği saran ve noktacıklara stabilite kazandıran çinko sülfür (ZnS) kabuktan sentezlenmiştir. En dış katman hidrofilik bir polimer ve bu polimere bağlanmış streptavidin moleküllerinden oluşmaktadır. Parçacıkların maksimum emisyon değeri 565 nm'de elde edilmektedir.

### **2.2.Kuantum Noktacıkları ile Mikrodizi Çalışmaları**

Oligonükleotid dizilerinin sekansları projenin daha önceki aşamalarında kullanılanlarla aynıdır. Setler arasındaki tek fark 5' ucunda 6-karboksil floresin (6-FAM) yerine biyotin taşıyan P1'dedir. Daha önce belirtildiği gibi yüzeye sabitlenen oligonükleotid, Prob 2 (P2) olarak adlandırılmıştır ve bu probun 5' ucu tiyol modifikasyonu taşımaktadır. Optimize edilmiş platform tarafından tespit edilmesi amaçlanan oligonükleotid, adaptör (A) olarak adlandırılmıştır. Prob 2 tarafından yüzeyde tutulacak adaptöre eşlenik olan ve 3' ucunda Biyotin ligandı taşıyan oligonükleotid Prob 1-Biyotin (P1-B) olarak adlandırılmıştır ve bu prob 3' ucunda biyotin ligandı taşımaktadır. Negatif kontrol olarak kullanılan ve P2 veya P1'e eşlenik olmayan oligonükleotid eşlenik olmayan adaptör (unA) olarak adlandırılmıştır.

Deneysel olarak kullanılan oligonükleotid dizileri kullanılan adaptörlerin uzunluğuna göre sınıflandırılmıştır. Oligonükleotid dizileri şu şekildedir:

52 baz uzunluğundaki adaptör için oligonükleotid dizileri:

**Yüzey probu: Prob 2 (P2)**

5'-/5ThioMC6-D/AAA AAA AAA GCA TCT TCA ACG ATG GCC TTT CCT TT -3'

**Adaptör**

5'- GCT CCT ACA AAT GCC ATC ATT GCG ATA AAG GAA AGG CCA TCG TTG  
AAG ATG C -3'

**Prob 1 Biotinli (P1-B)**

5'- TCG CAA TGA TGG CAT TTG TAG GAG CAA AAA AAA A/3Bio/ -3'

**Eşlenik Olmayan Adaptör (unA)**

5'- ACC CTG TAA ACG ATC ATC CCC ATT TTT TAC GGC CAATTG GAG GCCTCC  
CAAT -3'

72 baz uzunluğundaki adaptör için oligonükleotid dizileri:

**Yüzey probu: Prob 2 (P2)**

5'-/5ThioMC6-D/AAA AAA AAA GTC GGC AGA GGC ATC TTC AAC GAT GG -3'

**Adaptör**

5'- AAG GAA GGT GGC TCC TAC AAA TGC CAT CAT TGC GAT AAA GGA AAG  
GCC ATC GTT GAA GAT GCC TCT GCC GAC -3'

**Prob 1 Biotinli (P1-B)**

5'- TCG CAA TGA TGG CAT TTG TAG GAG CCA CCT TCC TTA AAA AAA AA/3Bio/  
-3'

**Eşlenik Olmayan Adaptör (unA)**

5'- TTC CTT CCA CCG AGG ATG TTT ACG GTA GTA ACG CTA TTT CCT TTC CGG  
TAG CAA CTT CTA CGG AGA CGG CTG -3'

92 baz uzunluğundaki adaptör için oligonükleotid dizileri:

**Yüzey probu: Prob 2 (P2)**

5'-/5ThioMC6-D/AAA AAA AAA TGG GAC CAC TGT CGG CAG AGG CAT CT -3'

**Adaptör**

5'- GAT AGT GGA AAA GGA AGG TGG CTC CTA CAA ATG CCA TCA TTG CGA  
TAA AGG AAA GGC CAT CGT TGA AGA TGC CTC TGC CGA CAG TGG TCC CA -3'



### **Prob 1 Biotinli (P1-B)**

5'- TCG CAA TGA TGG CAT TTG TAG GAG CCA CCT TCC TTT TCC ACT ATC AAA  
A/3Bio/ -3'

### **Eşlenik Olmayan Adaptör (unA)**

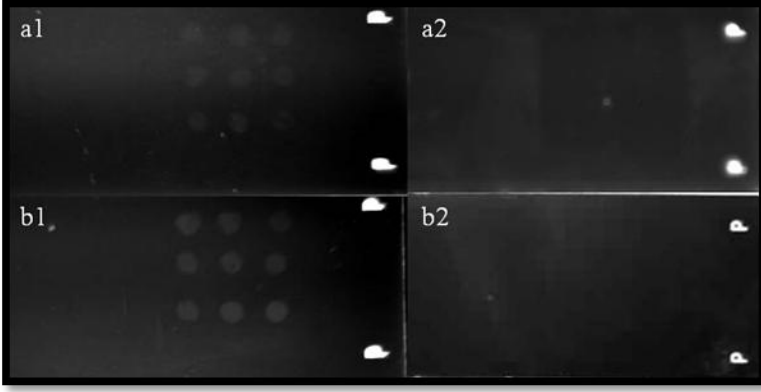
5'- CTA TCA CCT TTT CCT TCC ACC GAG GAT GTT TAC GGT AGT AAC GCT ATT  
TCC TTT CCG GTA GCA ACT TCT ACG GAG ACG GCT GTC ACC AGG GT -3'

Projede hedeflenen sandviç prensibine dayalı DNA makro dizi platformundan kuantum noktacılarıyla sinyal elde edilmesi çalışmaları aşağıda belirtilen temel aşamalara göre yapılmıştır:

- Yüzey probunun (P2) immobilizasyonu
- Inkübasyon
- Immobilizasyon sonrası yıkama
- Bloklama
- Bloklama sonrası yıkama
- Hibridizasyon
- Hibridizasyon sonrası yıkama
- Kuantum Noktacıklarının inkübasyonu
- Inkübasyon sonrası yıkama
- Görüntüleme

### **2.2.1 Yüzey Prob Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Sandviç hibridizasyonuna dayalı dizi çalışmalarında en kritik aşamalardan biride yüzey probunun başarılı bir şekilde immobilize olmasıdır (Zhou et al., 2004). Çalışmamızda iki farklı konsantrasyon denenmiştir: 5 ve 10  $\mu$ M. Bu konsantrasyonların üzerine çıkıldığında hibridizasyon veriminde düşüş gözlemlendiği daha önceden literatürde belirtildiği için (Southern et al., 1999) bu deneyde yüzey prob konsantrasyonu 5 ve 10  $\mu$ M iken sandviç sistemden elde edilen sinyal karşılaştırılmıştır.

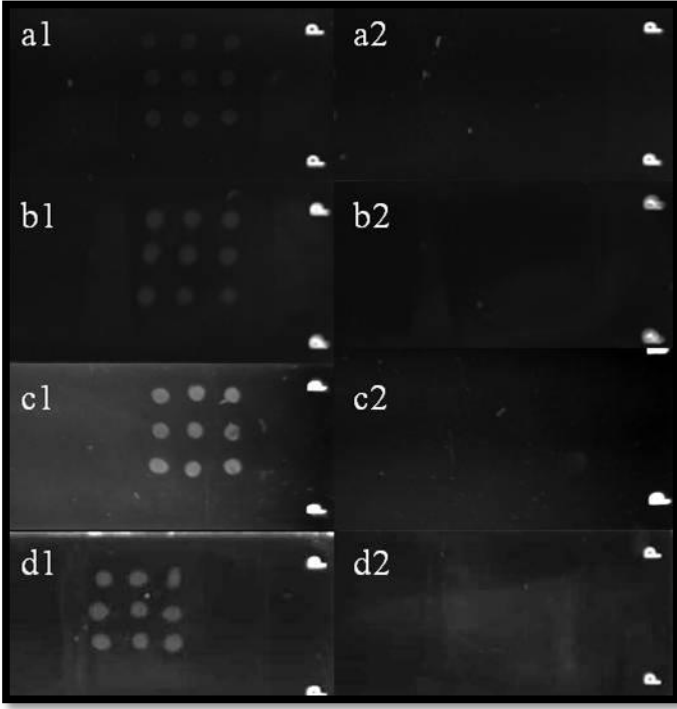


**Şekil 2.1.** İki farklı probe-2 konsantrasyonunun karşılaştırılması: (a1) 5 µM P2, (a2) negatif kontrol, (b1) 10 µM P2 ve (b2) negatif kontrol

Prob-2 konsantrasyonu 10 µM kullanıldığında spotlar daha parlak ve belirgin olduğu için bundan sonraki çalışmalarda P2 konsantrasyonu 10 µM olarak sabitlenmiştir.

### 2.2.2 Bloklama Süresinin Optimizasyonu

Prob-2 yüzeye sabitlendikten sonra, yüzeydeki reaktif amin gruplarının etkin bir şekilde bloklanması gerekmektedir. Bu sayede arka plandan spesifik olmayan sinyal miktarının önemli ölçüde azaltılması amaçlanmıştır. Bloklama ajanı olarak % 2 BSA kullanılmıştır. Çalışmamızda 4 farklı bloklama zamanı denenmiştir. Sonuçlar şu şekildedir:

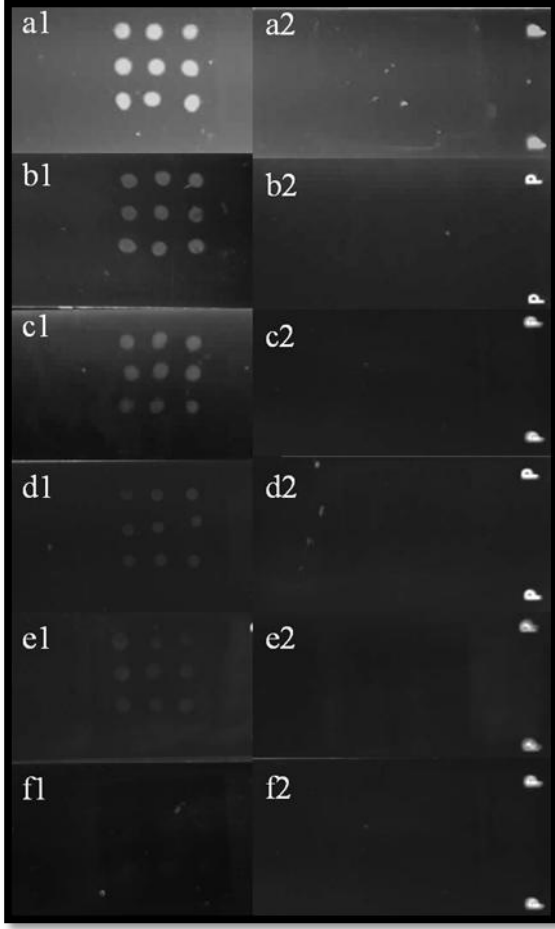


**Şekil 2.2.** Dört farklı bloklama süresinin karşılaştırılması: (a1) 15 dakika, (a2) negatif kontrol, (b1) 30 dakika, (b2)negatif kontrol, (c1) 60 dakika, (c2) negatif kontrol, (d1) 120 dakika ve (d2)negatif kontrol.

60 ve 120 dakikalık bloklama sürelerinde elde edilen sinyal 15 ve 30 dakikaya oranla daha fazladır. Ayrıca spotların şekilleri daha belirgindir. 60 ve 120 dakika bloklama süreleri kullanıldığında elde edilen sonuçlar arasında çok büyük bir fark olmaması nedeniyle ve deney süresini azaltmak amacıyla, bloklama süresi bundan sonraki çalışmalarda 60 dakika olarak sabitlenmiştir.

### **2.2.3 Adaptör Konsantrasyonunun ve Hassasiyetin Belirlenmesi**

Çalışmamızda 6 farklı adaptör konsantrasyonu denenmiştir. 0.001-20  $\mu$ M arasında değişen konsantrasyonlara ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.



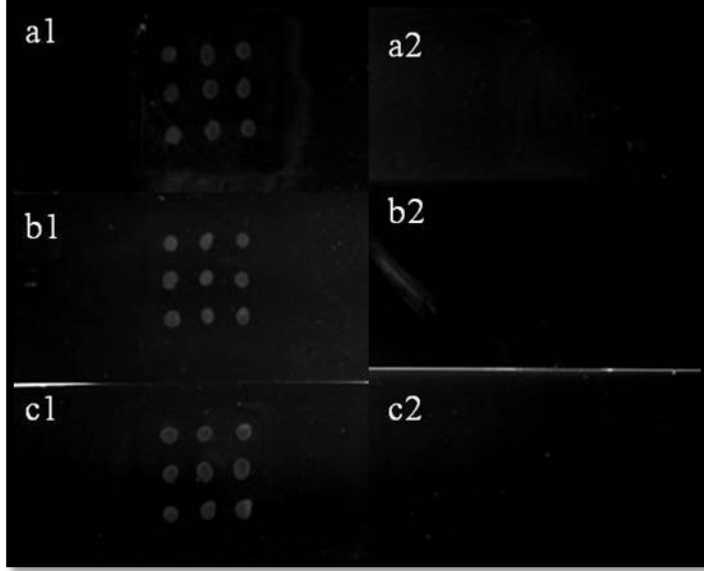
**Şekil 2.3.** Altı farklı adaptör konsantrasyonunun karşılaştırılması: (a1) 20  $\mu\text{M}$ , (a2) negatif kontrol, (b1) 10  $\mu\text{M}$ , (b2) negatif kontrol, (c1) 0.5  $\mu\text{M}$ , (c2) negatif kontrol, (d1) 0.1  $\mu\text{M}$ , (d2) negatif kontrol, (e1) 0.05  $\mu\text{M}$ , (e2) negatif kontrol, (f1) 0.001  $\mu\text{M}$  ve (f2) negatif kontrol

Sonuçlardan görüldüğü üzere her ne kadar spotlar düşük sinyal vermiş olsalar da (f1), 0.001  $\mu\text{M}$  konsantrasyondaki adaptör sandviç sistem ile tespit edilebilmektedir. Platformun hassasiyeti 0.001  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir.

En yüksek sinyal 20  $\mu\text{M}$  adaptör konsantrasyonunda elde edildiği için bundan sonraki aşamalarda adaptör konsantrasyonu 20  $\mu\text{M}$  olarak sabit tutulmuştur.

#### 2.2.4 Biotinli Prob 1 (P1-B) Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Platformdan elde edilen sinyalin gücünü etkileyen bir diğer önemli faktörde biotinli prob-1 konsantrasyonudur. Bu amaçla 3 farklı P1-B konsantrasyonu çalışılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki gibidir.

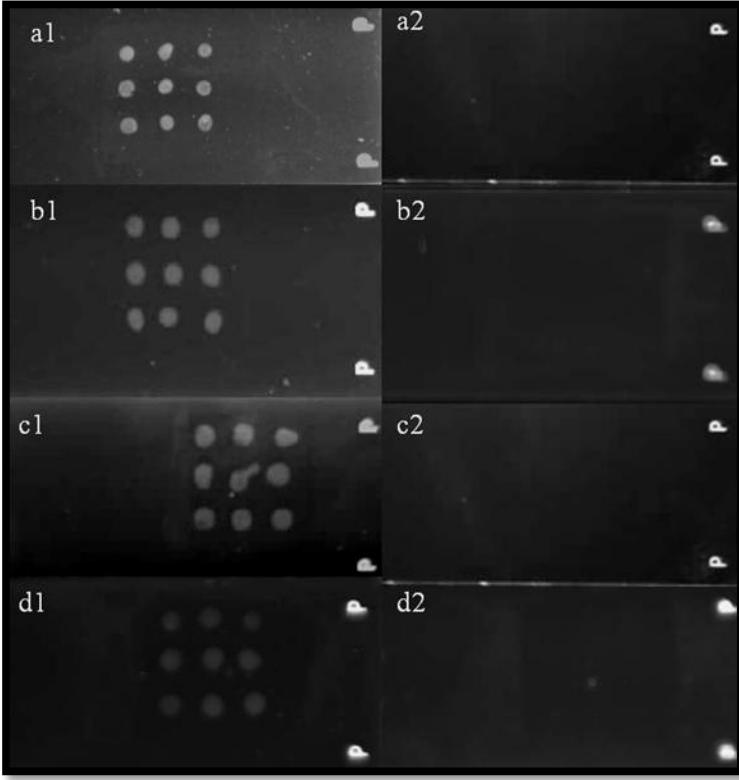


**Şekil 2.4.** Üç farklı P1-B konsantrasyonunun karşılaştırılması: (a1) 5  $\mu\text{M}$ , (a2) negatif kontrol, (b1) 20  $\mu\text{M}$ , (b2)negatif kontrol, (c1) 40  $\mu\text{M}$  ve (c2) negatif kontrol.

20  $\mu\text{M}$  (b1) ve 40  $\mu\text{M}$  (c1) P1-B konsantrasyonu 5  $\mu\text{M}$ ' a göre daha parlak sinyal vermiştir. Fakat 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  P1-B konsantrasyonunu karşılaştırdığımızda çok büyük bir fark gözlemlenmediği için geliştirdiğimiz platform sisteminde P1-B konsantrasyonu 20  $\mu\text{M}$  olarak seçilmiştir.

#### 2.2.5 Hibridizasyon Süresinin Belirlenmesi

Hibridizasyon solüsyonundaki adaptör-P1-B kompleksinin platformda sabitlenen P2'ye bağlanmasında hibridizasyon süresinin büyük bir etkisi vardır. Çalışmamızda bu etkiyi gözlemlmek için 4 farklı hibridizasyon süresi çalışılmıştır.

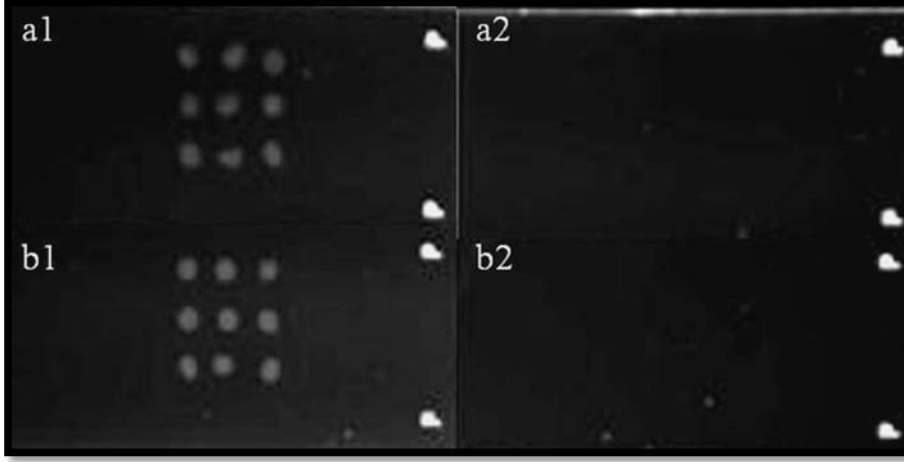


**Şekil 2.5.** Dört farklı hibridizasyon süresinin karşılaştırılması: (a1) 5 saat, (a2) negatif kontrol, (b1) 2.5 saat, (b2) negatif kontrol, (c1) 1 saat, (c2) negatif kontrol, (d1) 0.5 saat ve (d2) negatif kontrol.

En güçlü sinyal 5 saatlik hibridizasyon sonucu elde edilmiştir (a1). Fakat bu 5 saatlik hibridizasyon bir deneyin toplam süresini uzattığı için tercih edilmemiştir. Ayrıca 0.5 saatlik hibridizasyonda ise spotlar düşük sinyal verdikleri için bu hibridizasyon süresi çok kısa kabul edilmiştir. 2.5 ve 1 saatlik hibridizasyon sürelerini karşılaştırdığımızda 5 saatlik hibridizasyon sonucunda elde edilen sinyale çok yakın olduğu ve 0.5 saatlik hibridizasyon süresinden daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Bu her iki süre arasında çok büyük bir fark olmadığı ve deney süresinin kısılması için 1 saatlik hibridizasyon süresi ilerleyen deneylerde kullanılmıştır.

### 2.2.6 Hibridizasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Hibridizasyon sıcaklığı önce 30 °C ile başlamıştır. Fakat spotlar çok iyi sinyal vermediği için 35 ve 40 °C’de hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Aşağıda 35 ve 40°C’ ye ait sandviç hibridizasyonuna ait sonuçlar gösterilmektedir.

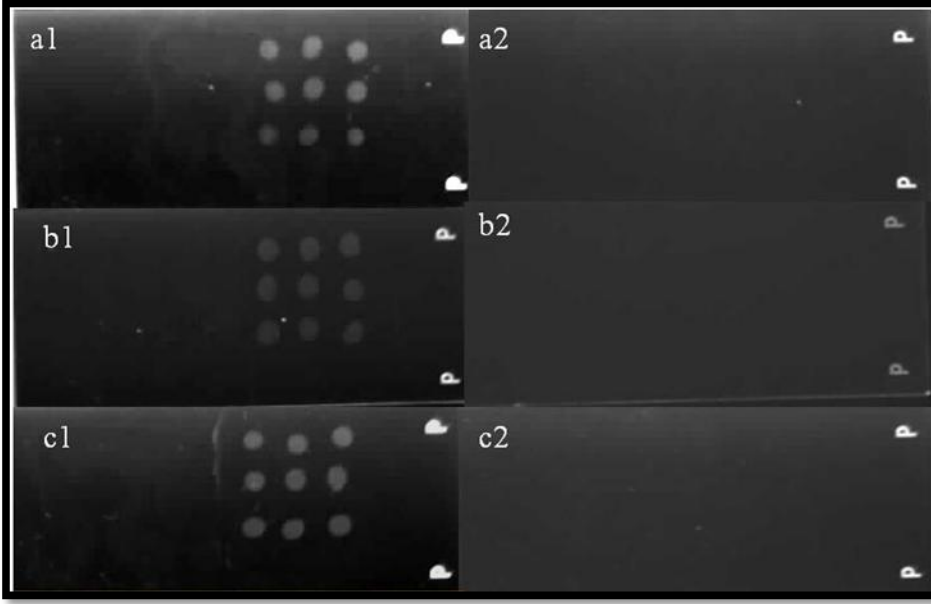


**Şekil 2.6.** İki farklı hibridizasyon sıcaklığının karşılaştırılması: (a1) 35 °C, (a2) negatif kontrol, (b1) 40 °C ve (b2)negatif kontrol.

40 °C hibridizasyon sıcaklığı nispeten 35 °C’ye göre daha iyi olduğu için hibridizasyon sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir.

### 2.2.7 Farklı Uzunluktaki Adaptörlerin Sandviç DNA Dizi Sistemine Adaptasyonu

52 baz uzunluğundaki adaptöre ek olarak 72 ve 92 baz uzunluğundaki adaptörlerin sisteme adaptasyonu çalışılmıştır. Bu adaptörlere eşlenik P1-B ve P2 problemleri kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibidir.



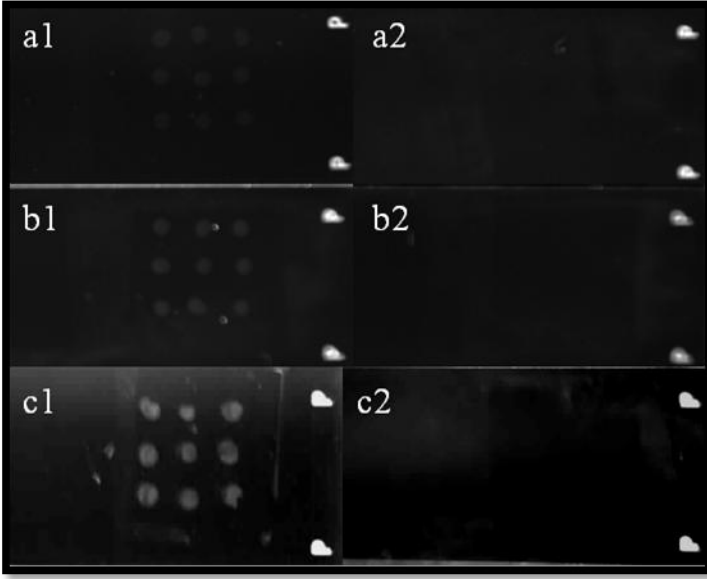
**Şekil 2.7.** Üç farklı uzunluktaki adaptörün sandviç dizi platformuna entegrasyonu: (a1) 52 baz, (a2) negatif kontrol, (b1) 72 baz, (b2) negatif kontrol, (c1) 92 baz ve (c2) negatif kontrol.

72 ve 92 baz uzunluğundaki adaptörlerden sandviç sisteminde kuantum noktacıları ile sinyal alınarak bu platformun farklı hedef adaptörlerin tespitinde kullanılabileceği ispat edilmiştir.

### **2.2.8 Kuantum Noktacıklarının İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi**

30 °C' de KN hibridizasyon sıcaklığı sabit tutularak inkübasyon süresi için 60 dakika, 15 dakika ve 5 dakikalık inkübasyon süreleri çalışılmıştır. Bu inkübasyonlar sonucu elde edilen sandviç platform görüntüleri aşağıdaki gibidir.





**Şekil 2.8** Kuantum noktacıklarının üç farklı inkübasyon sürelerinin karşılaştırılması: (a1) 5 dakika, (a2) negatif kontrol, (b1) 15 dakika, (b2) negatif kontrol, (c1) 60 dakika ve (c2) negatif kontrol.

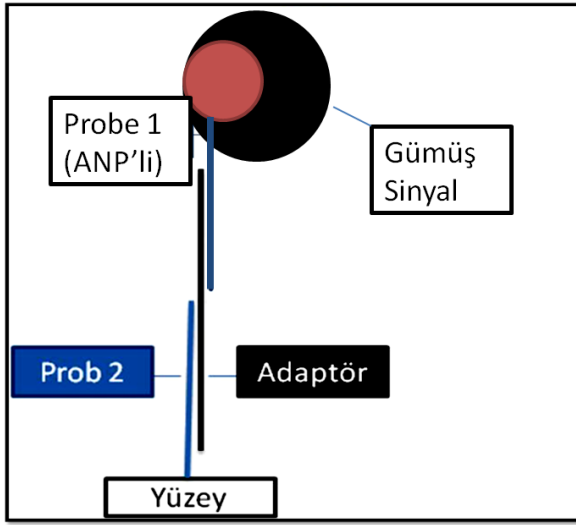
Sonuçlardan görüldüğü gibi KN inkübasyon süresi oldukça önemli bir parametredir. 5 ve 15 dakika gibi kısa sürelerde KN' nin sandviç sisteme entegrasyonu az olduğu için düşük sinyal elde edilmiştir. Fakat inkübasyon süresi 60 dakikaya çıkarıldığında platformdan oldukça yüksek sinyal alınmıştır. Bu yüzden sandviç dizi platformunda KN inkübasyon süresi 60 dakika (1 saat) olarak belirlenmiştir.

### 3. Altın Nanoparçacıkların DNA Dizi Sistemine Adaptasyonu

#### 3.1 Giriş

ANP'ler üretim kolaylığı, kullanım çeşitliliği ve farklı yüzeylere bağlanabilme özelliklerinden dolayı son yılların en sık kullanılan metalik nanoparçacıklardandır. Yüzeylerine istenilen fonksiyonel oligo parçası veya polipeptit bağlanabilen ANP'lerin tespiti için tercih edilen en yaygın yöntem imünohistokimya da sıklıkla kullanılan “gümüş zenginleştirmesidir” (silver enhancing). Bu yöntemde kolloid altın parçacıkları, gümüş iyonlarını metalik gümüş indirgeyen bir katalist görevi görür ve metalik gümüş de gözle görülebilecek kadar belirgindir.

Projemizin amaçlarından birisi de altın nanoparçacıkların (ANP) kullanıldığı bir sinyal stratejisi geliştirilmektedir. Bu platformda ANP'lere bağlanmış sinyal probundan gümüş zenginleştirilmesi yoluyla çıplak gözle de görülebilecek bir sinyal elde edilmesi hedeflenmiştir. Sandviç prensibine dayalı ve altın nanoparçacıkları ile sinyal vermesi planlanan platformun şeması Şekil 3.1'deki gibidir.



**Şekil 3.1** Sandviç prensibine dayalı ve altın nanoparçacıkları ile sinyal vermesi planlanan platformun şeması

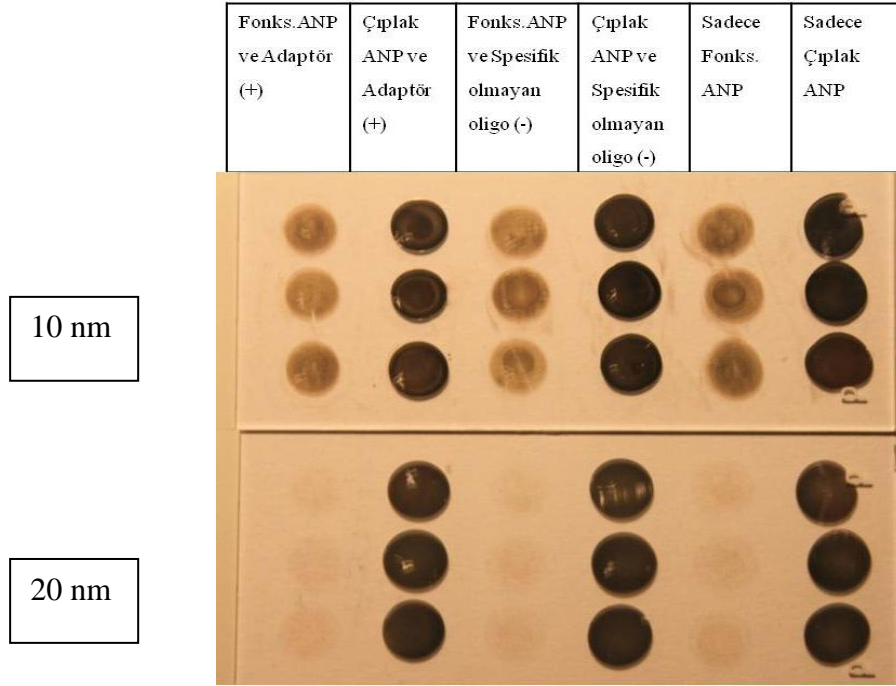
### 3.2 ANP'lerin İşlevselleştirilmesi

Boyutları 10 ve 20 nm olan iki farklı ANP'ye fonksiyonel (tiyol gruplu) oligo parçacıkları bağlanır. Bu kısım da kullanılan P1 ve P2, projenin diğer kısımlarında kullanılan P1 ve P2 ile aynıdır.

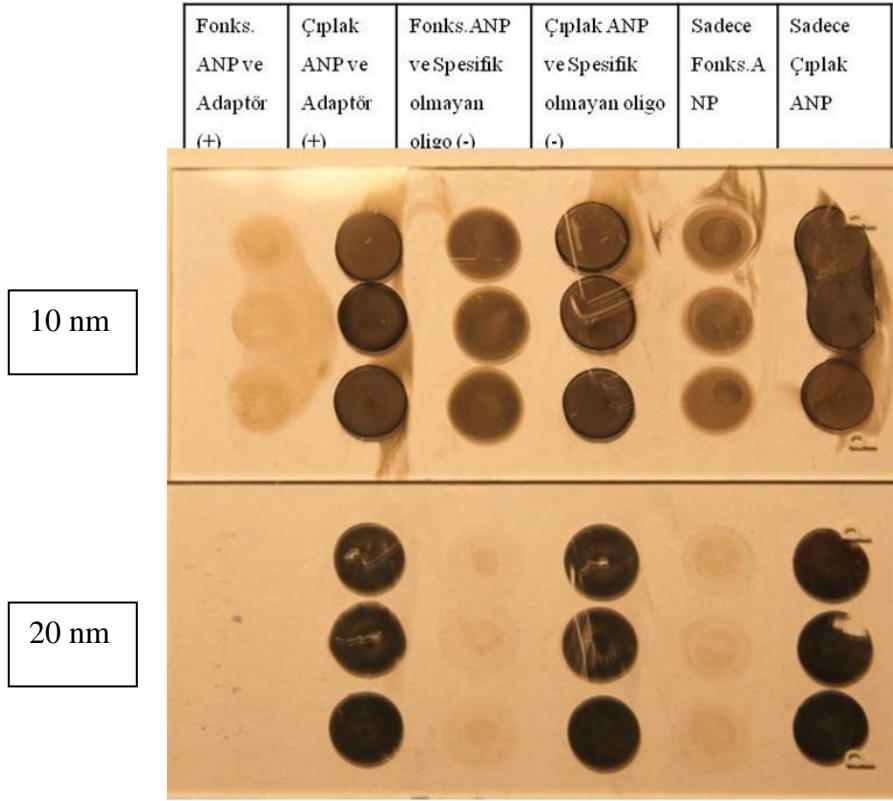
### 3.3 Farklı Yüzeylerde ANP'li Sandviç Geliştirilmesi ve Gümüş Sinyal Eldesi

Projemizde gerçekleştirilen çalışmalarda, ANP'lerin Poli-L-lizin slaytlar ile spesifik olmayan etkileşime girdiği gösterilmiştir. Dolayısıyla Poli-L-lizin slaytların bu sistem için uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için Prob 2 yüzeye bağlanmış ve

kurutulmaya bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak ise daha önceden uyguladığımız nem odacıkları kullanılmıştır.



**Şekil 3.2** Poli-L-Lizin slaytlarda, Prob 2 kurutulduktan sonra, 10 nm (üst panel) ve 20 nm ANP kullanılarak yapılan sandviç ve gümüş zenginleştirme denemesi.



**Şekil 3.3** Poli-L-Lizin slaytlarda, Prob 2 kurutulmadan, 10 nm ve 20 nm ANP kullanılarak yapılan sandviç ve gümüş zenginleştirme denemesi.

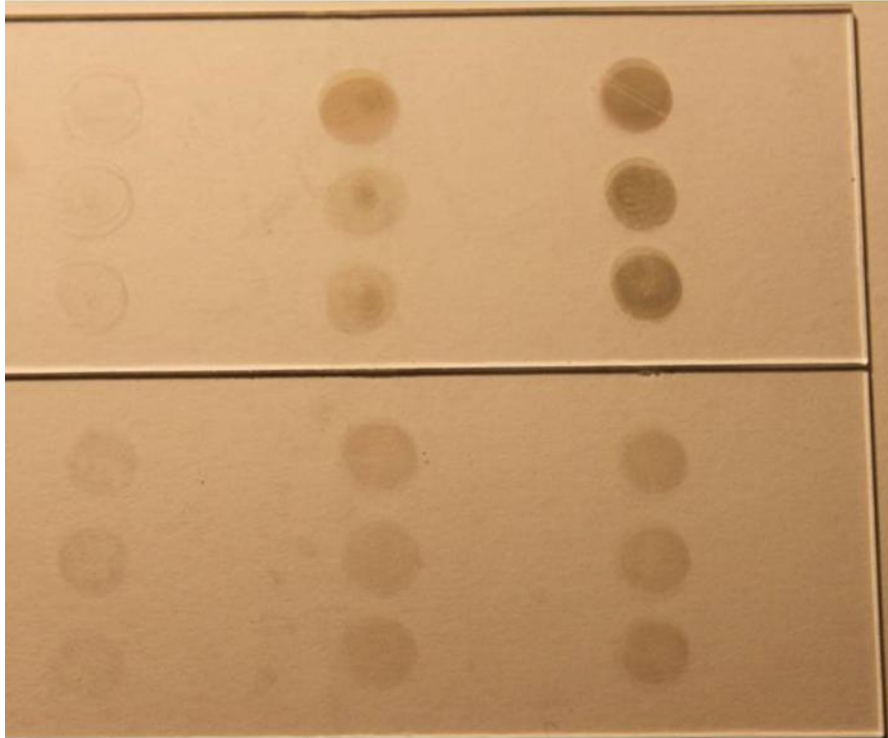
Şekil 3.3’de görüldüğü gibi, Prob 2 kurutulmadan, adaptör ve Prob 1 bağlı ANP’ler ile hibridizasyona koyulduğunda, kontrol grupları olan spesifik olmayan oligolu veya adaptörsüz Prob 1 bağlı ANP uygulamasından farklı olduğu görülmüştür. Fakat burada görülen, istenenin aksine, gümüş sinyalinin diğer kontrol gruplarından az olduğudur. Tüm slaytlarda görünen “çıplak” ANP’ler, işlevselleştirilmemiş yani üzerlerinde fonksiyonel gruplu herhangi bir oligo bağlanmamış ANP’lerdir. Şekillerde görüldüğü gibi, çıplak ANP’ler poli-L-lizin slaytlar ile, istemediğimiz bir şekilde bağlanmaktadır. Çalışmalarımızda denenen bir çok farklı yıkama ve bloklama yöntemi bu spesifik olmayan bağlanmayı engelleyememiştir.

Şekil 3.2 ile Şekil 3.3 kıyaslandığında, Prob 2’nin kurutulması hibridizasyonun oluşmasını engellemektedir. Şekil 3.2’de görüldüğü gibi, Prob 1 bağlı ANP’lerin pozitif kontrol olan adaptör ile negatif kontroller olan spesifik olmayan adaptör ve adaptör olmayan uygulamalarında gözle görülür bir sinyal farkı yoktur.

Her iki denemede, 10 nm ile 20 nm ANP karşılaştırıldığında ise, 10 nm ANP’lerdeki sinyalin daha kuvvetli olduğunu, yani yüzeye daha güçlü bağlandıkları görülmüştür. Bu fark literatürde daha önce gözlemlenmemiş bir sonuçtur.

Hazır temin edilen, yüzeyi epoksi kaplı slaytlar ile platformda sandviç sistemi denenmiştir. Yine 10 nm ve 20 nm boyutunda iki farklı ANP seti kullanılmıştır. Üzerlerinde oligo bağlı, işlevsellendirilmiş ANP’lerin yanında kontrol amaçlı olarak “çıplak” ANP’ler epoksi yüzeylerde de denenmiştir. Şekil 3.4’de görüldüğü gibi, daha önceki poli-L-lizin slaytlardaki, spesifik olmayan bağlanma, epoksi slaytlarda gözlenmemiştir.

Sadece Fonks. ANP	Sadece Çıplak ANP	Fonks. ANP ve Spesifik olmayan oligo (-)	Çıplak ANP ve Spesifik olmayan oligo (-)	Fonks. ANP ve Adaptör (+)	Çıplak ANP ve Adaptör (+)
-------------------	-------------------	--	--	---------------------------	---------------------------



**Şekil 3.4** Epoksi slaytlarda elde edilen sinyaller. 10 nm (üst panel) ve 20 nm (alt panel).

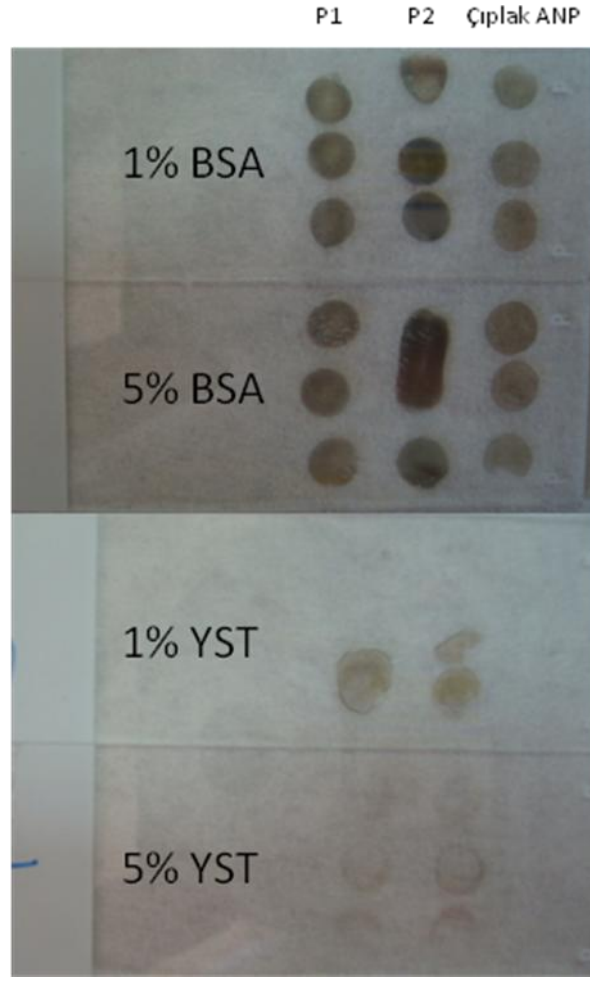
Çıplak ANP’lerin hiç bir uygulamasında, 10 nm ve 20 nm olarak her iki boyutta da gümüş sinyal tespit edilememiştir. Bu yöntemde, daha önceki poli-L-lizin slaytlarında gözlemlenen en etkili bloklama yöntemi olarak %1’lik Yağsız Süt Tozu (YST) kullanılmıştır.

10 nm'lik ANP ile yapılan hibridizasyon deneyinde adaptör ile sandviç sistemi başarıyla oluşturulmuştur. Fakat negatif kontrol olarak kullanılan, spesifik olmayan oligo ve adaptör kullanılmadan yapılan hibridizasyonda da, adaptörün sinyaline kıyasla az da olsa sinyal elde edilmiştir. Fakat yapılacak bloklama ve yıkama optimizasyonu ile bu düşük negatif sinyalin engellenmesi hedeflenmektedir. Epoksi slaytlarda denenen 20 nm'lik ANP'lerde ise pozitif kontrol olarak yapılan adaptörlü hibridizasyonun sinyal gücü 10 nm'ye kıyasla daha düşüktür. Ayrıca negatif kontroller ile adaptörlü hibridizasyon arasında gözle görülür bir kontrol farkı yoktur. Hibridizasyonun olmaması gereken, böylece sinyal oluşması beklenmeyen negatif kontrollerde, 10nm'de olduğu gibi düşük sinyaller görülmüştür.

### **3.4 ANP Bağlanacak Yüzeylerin Bloklanması**

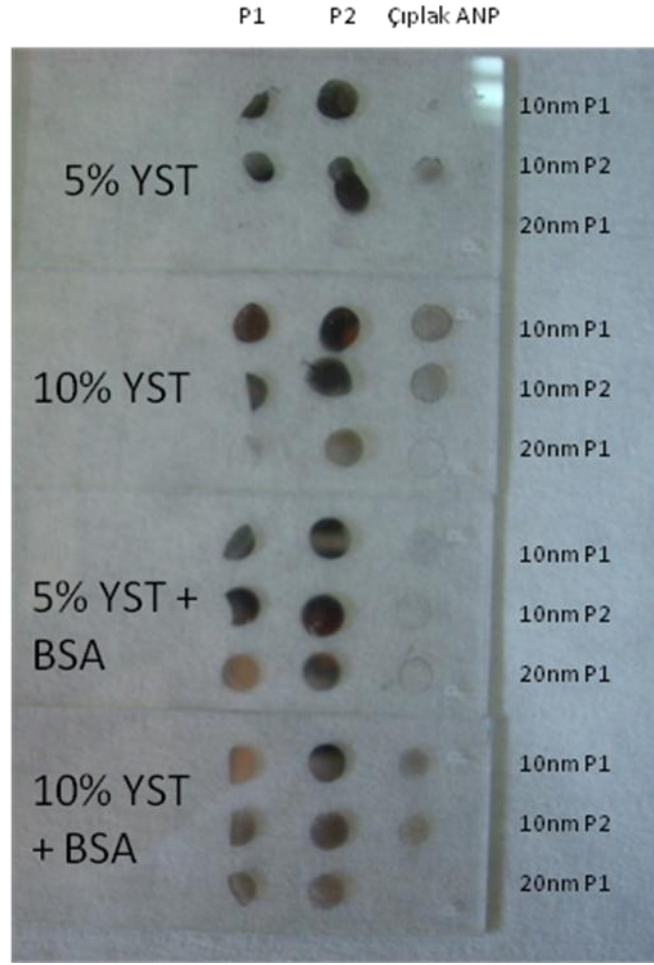
ANP çalışmalarında en önemli problem tercih ettiğimiz yüzey kimyası olan poli-L-lizin ile ANP ler arasındaki etkileşim olarak ortaya çıkmıştır. Çözüm için iki tip bloklama stratejisi denenmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla sıklıkla kullanılan kimyasallar BSA (Bovine Serum Albumin), yağsız süt tozu (Skim Milk) ve bunların karışımı farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

Uzunluğu aynı fakat baz dizisi farklı olan sekansların (P1 ve P2) yüzey bağlanmasında bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 3.5). Yağsız süt tozu ile yapılan bloklama, BSA'ya göre daha etkili olmuştur. BSA, çıplak ANP'lerin bağlanmasına engel olamamıştır. YST ile yapılan bloklama da gümüş sinyal düşük alınmıştır. Görüntüler stereomikroskopa bağlı dijital bir fotoğraf makinesi ile elde edilmiştir.



**Şekil 3.5** Farklı konsantrasyonlarda BSA (Bovine Serum Albumin) ve YST (Yağsız süt tozu) kullanılarak yapılan bloklama ile elde edilen gümüş sinyal sonuçları. Her bir noktacık 20 nm ANP'ler ile üçlü tekrardır.

Yapılan diğer deneylerde farklı boyuttaki ANP'lerin yüzey interaksiyonlarında farklar olduğu görülmüştür (Şekil 3.6). 20nm'lik ANP'ler 10nm'lik olanlara göre bloklanmış yüzeylere daha az bağlanmışlardır. En iyi sonuç 5% yağsız süt tozu ve BSA karışımından (1:1) elde edilmiş olsa da yüzey-ANP etkileşimleri tam olarak engellenememiştir.



**Şekil 3.6.** Farklı bloklama ve ANP boyutları (10 ve 20 nm) ile yapılan gümüş sinyal sonuçları.

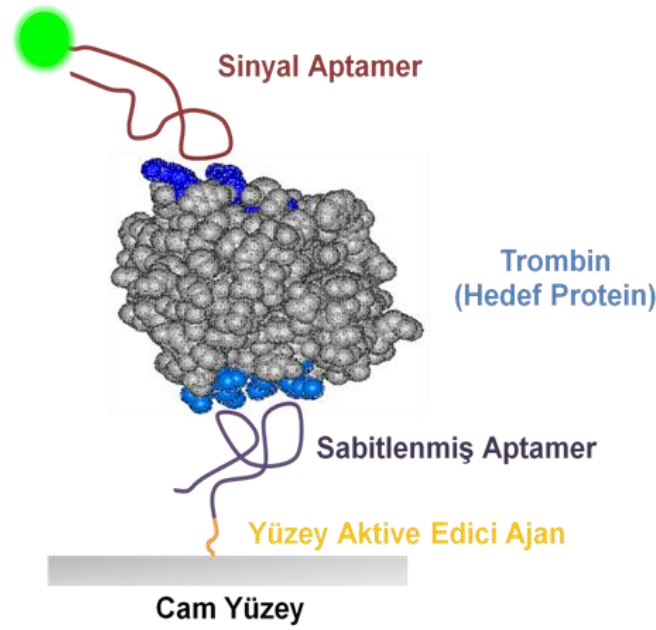
Bu çalışmalarda oligo prob bağlı olmayan çıplak ANP'lerin, prob bağlı ANP'ler kadar olmasa da yüzeyle etkileşimde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak projemizde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda hedeflendiği gibi sandviç hibridizasyon array platformunda ANP'ler kullanılarak gözle görülebilir sinyaller oluşturulmuştur. Bu görüntüleme yönteminin platformda kullanılabilmesi için geri planda oluşan özgün olmayan sinyallerin giderilmesi gerekmektedir.



## 4. Aptamer Tabanlı Sandviç Dizi Platformu Çalışmaları

### 4.1 Giriş

Aptamerler bir hedef moleküle yüksek bir afinite ve özgüllük gösteren nükleik asit ya da peptit molekülleridir. Sekansları, aptamerlere özgül bir üç boyutlu yapı kazandırır ve bu üç boyutlu yapı bağlanacakları moleküle karşı özgüllüğünü belirleyen etkindir. Bir molekül birden fazla aptamere bağlanma bölgesi içerebilir. Literatürdeki aptamer çalışmalarında sıkça kullanılan trombin proteininin heparin ve fibrinojen bağlanma bölgeleri için iki farklı aptamer ve daha güçlü bağlanma amacıyla sekans değişiklikleri yapılmış varyasyonları bulunmaktadır. Projenin aptamer uygulamasını içeren bu kısımda hedef molekül olan trombin proteininin tespiti ve miktarının ölçülmesi için sandviç modeli kullanılmıştır (Şekil 4.1). Bu sistemde trombinin iki aptamerinden bir tanesi “sabitlenmiş aptamer”, diğeri ise “sinyal aptamer” olarak kullanılmıştır. Yapılan ilk deneylerde öncelikle poli-L-lizin kaplı slayt yüzeyi bir ucunda amino grupları ile diğeri ucunda sülfidril grupları ile reaksiyona girip kovalent bağ oluşturan heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılarla aktive edilmiştir. Ardından, 15 baz çifti uzunluğundaki tiyol modifiyeli trombin aptameri bu aktif hale getirilmiş cam yüzeye sabitlenmiş ve tampon çözelti ile yıkanarak yüzeye bağlanmamış aptamerler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Ardından ortama trombin eklenmiş ve proteinin sabitlenmiş aptamer ile etkileşmesi için uygun ortamda inkübasyon yapılmıştır. Flüoresan işaretlenmiş olan 29 baz çifti uzunluğundaki ikinci trombin aptameri ise sinyal aptamer olarak kullanılmıştır.



**Şekil 4.1.** Aptamer sandviç sistemi. Yüzeyle sabitlenmiş aptamer trombin'e bağlanır. Trombin varlığı ise ikinci bir sinyal aptamerin ortamda kalıp kalmamasına göre tespit edilir.

#### 4.1.1 Aptamerler

Çalışmada kullanılan oligonükleotidler Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Aptamer 1 (15 mer, Apt1-SH)

- Aptamer 1 yüzeyle tutturulduğu için yüzeyle sabitlenmiş aptamer olarak isimlendirilebilir. Bu aptamer 15 baz uzunluğundadır ve 5' ucundan -SH grubu modifiyelidir. Aktive edilmiş yüzeyle bu -SH grubu ile bağlanmaktadır.
- Dizilim: 5'-SH-GGT TGG TGT GGT TGG-3'

Aptamer 2 (29 mer- Apt2-FAM)

- Hedef molekül ile ya da hedef molekülün ardından yüzeyle uygulanan 29 baz uzunluğundaki sinyal aptameridir. 5' ucunda 6-FAM sinyal molekülü vardır.
- Dizilim: 5'- FAM-AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TAG CT-3'

Aptamerler, Ikebukuro et al. (2005), çalışması baz alınarak belirlenmiştir.

Hedef Molekül, Sigma Aldrich firmasından temin edilen insan trombini heparin ve fibrinojen bağlanma bölgelerine bağlanan iki farklı aptamer için hedef molekül olarak kullanılmaktadır.

#### 4.1.2 Poli-L-Lizin Kaplı Slaytlar

Thermo Scientific firmasından temin edilen Polysine marka poli-L-lizin kaplı cam slaytlar kullanılarak sandviç platform için uygun kimyasal yüzey sağlanmıştır.

#### Kontroller

- Pozitif Kontrol: Yüzeyle sabitlenen aptamer 1'in 5' ucu -SH, 3' ucu ise 6-FAM modifiye edilmiştir. Böylelikle yüzeyle aptamer immobilizasyonu ve sinyal tespiti için pozitif bir kontrol sağlanmıştır.
- Negatif kontroller: Aktif hale getirilmiş cam yüzeyle sadece trombin uygulanarak trombinin özgül olmayan ve istenilmeyen bağlanmalarının olup olmadığı test edilmiştir. Ayrıca aktif yüzeyle sadece florosanlı sinyal aptameri uygulanmış ve özgül olmayan bağlanmalar test edilmiştir.

#### 4.1.3 Noktalama

- Immobilizasyon Aşaması: 15 mer-Apt1-SH solüsyonu cam yüzeyle mikropipet yoluyla 0.5 µL olarak damlatılmıştır.
- Bağlanma Aşaması (Aptamer 1-Trombin-Aptamer 2 Sandviç): Bu aşamada iki uygulama denenmiştir;
  - Thrombin ve 29 mer-Apt2-FAM beraber hazırlanıp, birlikte cam yüzeyle sabitlenen 15 mer-Apt1-SH noktalarının üzerine 4 uL olarak damlatılmıştır.
  - Öncelikle thrombin solüsyonu 2 µL olarak 15 mer-Apt1-SH noktalarının üzerine damlatılmış, ardından 29 mer-Apt2-FAM 2 µL olarak damlatılmıştır.
- Noktalama sonrası slaytlar buharlaşmayı engellemek amacıyla nemlendirme haznesinde inkübe edilmiştir.

#### 4.1.4 Çapraz Bağlama Ajanının Yüzeğe Uygulanma Şeklinin Karşılaştırılması

Çapraz bağlama ajanının Apt1-SH moleküllerini yüzeğe bağlamadaki etkisi test edilmiştir. Yapılan birinci deneyde çapraz bağlama ajanı FAM işaretli Apt1-SH ile yüzeğe beraber uygulanırken ikinci deneyde yüzeğe önce çapraz bağlama ajanı ile aktive edilmiş, ardından FAM işaretli Apt1-SH aktive edilmiş yüzeğe uygulanmıştır. Sonuç olarak Apt1-SH ile çapraz bağlama ajanının beraber uygulanmasının daha etkin prob immobilizasyonu sağladığı bulunmuştur.

#### 4.1.5 Yüzeğe-Sinyal Probu Etkileşim Problemi

Prensip ve bileşenleri açısından daha önce oluşturduğumuz hibridizasyona dayalı oligonükleotid sandviç platformuna oldukça benzerlik gösteren aptamer platformunun en önemli farkı oluşturulan sandviçin hibridizasyon yerine moleküler yapıya dayalı spesifik aptamer-hedef molekül (trombin) etkileşimlerine dayalı olmasıdır. Bu nedenle bileşenlerin moleküler yapılarının korunması (stabilite) son derece önemlidir.

Aptamer deneylerinde ortaya çıkan en büyük problem altın nanoparçacıklarda yaşadığımız benzeri bir spesifik olmayan yüzeğe-sinyal probu (FAM işaretli aptamer) bağlanması sonucunda ortaya çıkan yanlış sinyal olmuştur. Bu yüzeğe-oligo bağlanmasının temelinde, en ekonomik yüzeğe kaplama kimyası olması açısından tercih ettiğimiz poli-L-lizin yüzeğlerdeki pozitif yük ile negatif yüke sahip DNA molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimlerin olması güçlü bir ihtimaldir. Bu problem hibridizasyona dayalı sandviç sisteminde SDS gibi güçlü bir deterjan kullanarak çözülmüş fakat SDS'in moleküler yapıları denatüre edici özelliği yüzünden aynı çözüm aptamer sisteminde uygulanamamıştır. Çözüme yönelik alternatif bloklama ve yıkama kimyasalları kullanılan çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

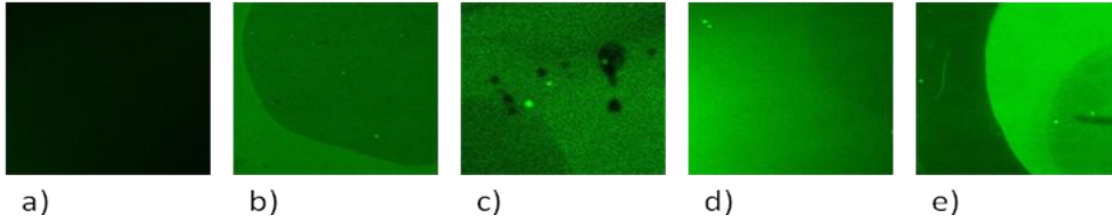
#### 4.1.6 Yüzeğe Bloklaması

Farklı konsantrasyonlarda BSA (Bovine Serum Albumin) blokmasına ek olarak  $\beta$ -merkaptoetanol ve yağsız süt tozu (skim milk) da alternatif ajanlar olarak test edilmiştir. En

iyi sonuçlar BSA ile elde edilmiş olmasına karşın yüzey-sinyal probu etkileşimleri tam olarak engellenememiştir.

#### 4.1.7 Yıkama Ajanları ve Koşulları

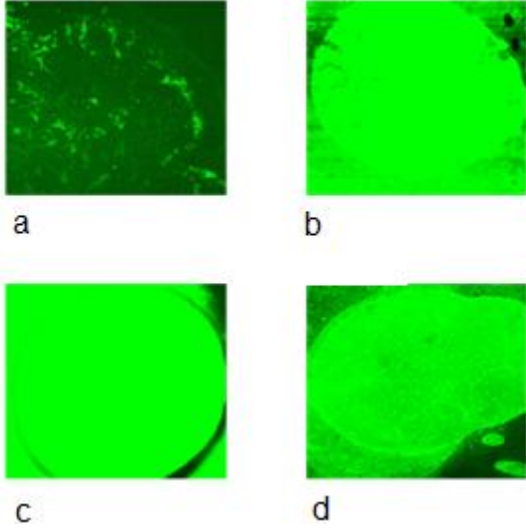
Literatürde sıkça kullanılan farklı yıkama ajanlarının poli-L-lizin yüzeye doğrudan uygulanmış FAM işaretli aptameri uzaklaştırabilme potansiyellerini kıyaslanmıştır. Sodyumdedosil sülfat (SDS) pozitif kontrol olarak kullanılmış ve Triton-X100, Tween 20 ve gliserol yıkamaları denenmiştir (Şekil 4.2). Tek olumlu sonuç SDS'ten alınabilmiştir. Her ajan için 24-37 °C arası yıkama sıcaklıkları, farklı sallama hızları ile farklı kademe ve konsantrasyonlardan oluşan 5 ila 60 dakika arası yıkama süreleri test edilmiştir.



**Şekil 4.2.** Farklı yıkama ajanları ile alınan sonuçlar. a) SDS, b) Triton X-100, c) Tween 20, pH: 7.2 d) Tween 20 pH: 9.3 ve e) Gliserol.

#### 4.1.8 Aldehid Yüzey Kaplaması

Bloklama ve yıkama optimizasyon çalışmaları DNA-amino yüzey interaksyonlarının ancak SDS türü güçlü bir deterjan ile uzaklaştırılabileceğine işaret ettiği için farklı yüzey kimyasalları denenmiştir. Bu bağlamda glutaraldehit kullanılarak cam slaytlar aldehit grupları ile kaplanmış ve DNA-yüzey etkileşimleri test edilmiştir (Şekil 4.3). Sonuçlar DNA-yüzey etkileşim probleminin bu koşullarla da devam ettiğini göstermiştir.



**Şekil 4.3.** Aldehid kaplamanın DNA-yüzey etkileşimlerine etkisi. Her durumda yüzeye 0.5  $\mu$ L 10 uM FAM işaretli aptamer damlatılmış ve yıkama sonrası slaytlar taranmıştır. a) Kaplanmamış cam slayt, b) Amino silan üzerine glutaraldehit kaplama, c) Poli-L-lizin slayt, d) Poli-L-lizin slayt üzerine glutaraldehit kaplama.

## 4.2. Trombin Aptameri Mikrodizi Çalışmaları

### 4.2.1. Trombin Aktivitesi ve Aptameriyle Bağlanımını Gösteren Çalışmalar

Proje kapsamında optimize edilen sandviç platformu trombin proteininin tanı çalışmalarında kullanılmış ve bazı problemlerle karşılaşmıştır. Bu nedenle aktivite testiyle trombin proteininin aktivitesi test edilmiş ardından trombin proteininin trombin aptamerlerine bağlandığını sıvı ortamda göstermek için Elektroforetik Mobilite Flift Testi (EMSA) yapılmıştır. Bulgular aşağıda verilmektedir.

#### a) Trombin Aktivite Analizi

Bu analiz, Hussein and Hassan, 1987 (Journal of Experimental Medicine) ile Sigma firmasının hazırlamış olduğu prosedürler referans alınarak yapılmıştır.

1/9 oranında insan kan plasması ve PBS tampon çözeltisi içeriğinden 360  $\mu$ L alınarak 40  $\mu$ L thrombin eklenmiştir (son trombin konsantrasyonu = 0.5 unite). Reaksiyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir. 400 nm'deki absorbans artışı pıhtı oluşumunun başlangıç hız değerini

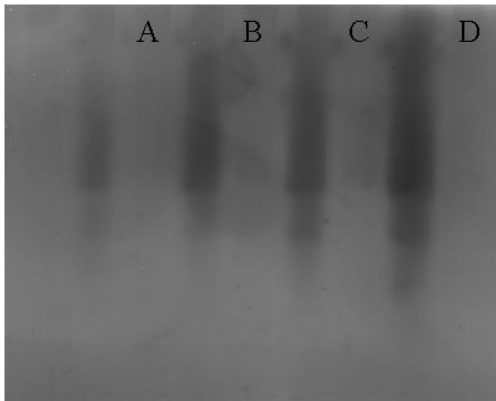
vermiştir. Elde edilen sonuçlara göre elimizde mevcut bulunan thrombinin fibrinogeni fibrine dönüştüren enzimatif aktivitesinin korunduğu gözlemlenmiştir.

b) Elektroforetik Mobilite Shift Testi (EMSA)

Çalışmamızın bu aşamasında trombin proteini ile trombin aptamerlerinin bağlanma testleri yapılmıştır. DNA aptamerin hedef proteine bağlandığını göstermek için elektroforetik mobilite shift testinden yararlanılmıştır. Böylece platform deneylerine geçilmeden önce trombinin solüsyon içerisinde aptamere bağlanıp bağlanmadığı araştırılmıştır.

Elektroforetik Mobilite Shift Testi (Electrophoresis mobility shift assay (EMSA)) nükleik asit ve protein arasındaki ilişkiyi kalitatif ve kantitatif sonuçlarla gösteren temel tekniklerden biridir.

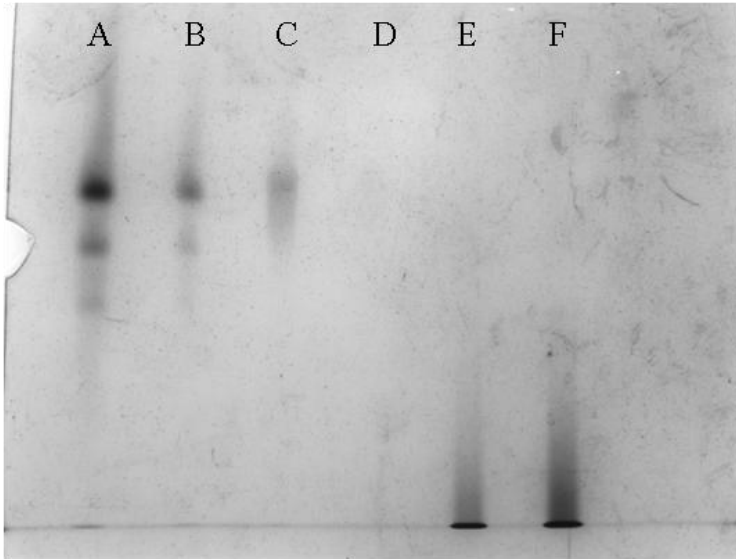
Trombin proteini ile aptamerin bağlanmasını EMSA yöntemiyle göstermeden önce başka proteinlerle poliakrilamid jel elektroforez deneyleri yapılmıştır. Bu deneylerin amacı trombin ve aptamerler kullanılmadan önce poliakrilamid jelin hazırlanma, yürütülme ve boyanma optimizasyonlarının yapılması ve böylece pahalı ve sınırlı miktardaki aptamer ve trombin stoklarının optimize edilmiş koşullarda verimli bir şekilde kullanılmasıdır. İlk olarak karbonik anhidraz (29kDa) proteini farklı konsantrasyonlarda %7.5'lik poliakrilamid jele yüklenmiş ve 18°C' de 180 voltta 1.5 saat yürütülmüştür. Yürütülen jel gümüş boyama tekniğiyle boyanmış ve görüntüsü alınmıştır.



**Şekil 4.4** Farklı konsantrasyonlardaki karbonik anhidraz ın %7.5lik Poliakrilamid jel görüntüsü. A. 0.25uM, B. 0.5uM, C. 1.0uM, D. 2.0uM

Şekil 4.4'te de görüldüğü gibi örnekler yaygın bantlar vermiştir. Bu durumun olası nedenleri jelin her yerinde düzenli bir şekilde polimerize olmaması ya da yürütülmesi esnasında jelin fazlasıyla ısınması olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla bundan sonraki deneylerde jelin hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar taze olarak hazırlanmış ve jeller 4°C'de yürütülmüştür.

Yapılan ikinci deneyde karbonik anhidraz proteininin yanı sıra poliakrilamid jel elektroforez deneyi konalbümin (75kDa) ve ovalbümin (44kDa) proteinleriyle de denenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bu 3 protein %7.5'lik poliakrilamid gele yüklenmiş ve 4°C'de 160 voltta 4 saat yürütülmüştür. 4 saatin sonunda gel gümüş boyama tekniği ile boyanmış ve jelin görüntüsü alınmıştır.

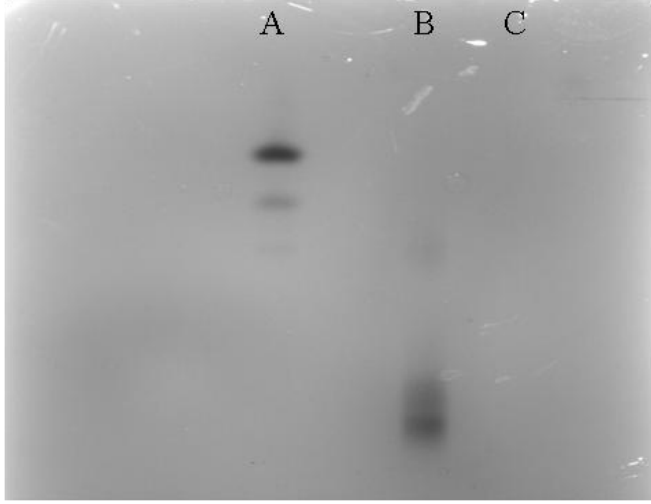


**Şekil 4.5** Farklı konsantrasyonlardaki carbonic anhydrase, conalbumin ve ovalbumin in %7.5lik Poliakrilamid jel görüntüsü. A. 0.25 uM karbonik anhidraz, B. 1.0uM Karbonik anhidraz, C. 0.25 uM Konalbümin, D. 1.0 uM Konalbümin, E. 0.25 uM Ovalbümin, F. 1.0 uM Ovalbümin.

Şekil 4.5' de görüldüğü gibi farklı moleküler ağırlıklara sahip proteinlerden Karbonik anhidrazın (29kDa) iki farklı konsantrasyondaki örnekleri jelde görülürken Konalbümin proteininin (75kDa) sadece düşük konsantrasyondaki örneği jelde görüntülenmiştir. Ovalbümin proteininin (44kDa) ise bantları jelde görüntülenememiştir. Dolayısıyla bundan



sonraki deneyde jele yüklenen örneklerin konsantrasyonlarını gözarda edilerek eşit miktarlarda jele yüklenmeleri denemiştir. Ayrıca jelde gümüş boyama tekniğinden kaynaklı yaygın bantların oluşmasını engellemek için Coomassie boyama tekniği uygulanmıştır.



**Şekil 4.6** Eşit miktarda karbonik anhidraz, conalbumin ve ovalbumin'in %7.5'lik poliakrilamid jel görüntüsü. A. 5.0 µg karbonik anhidraz B. Konalbümin 5µg C. 5.0µg ovalbümin.

Yapılan poliakrilamid jel optimizasyon deneylerinden sonra trombin ve aptamerlerin bağlanma deneylerine geçilmiş ve EMSA metodu uygulanmıştır. Bu deneyde yedi farklı örnek hazırlanmış ve %7.5lik poliakrilamid jele yüklenerek 100 mA akımda 4°C'de 3 saat yürütülmüştür. Yaygın bantların oluşmasını engellemek amacıyla jel Coomassie boyama yöntemiyle boyanmıştır. Örnekler aşağıdaki listede belirtildiği gibi hazırlanmış ve jele yüklenmeden önce trombin ve aptamerlerin bağlanmalarını sağlamak amacıyla 4°C derecede 1 saat inkübe edilmiştir.

Jele yüklenen örnekler:

Örnek 1: trombin

Bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 3 µM trombin

Örnek 2: trombin+ apt1(F)

Bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 3 µM trombin ve 50 µM florasanla işaretli birincil trombin aptameri

Örnek 3: trombin

Bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 3  $\mu$ M trombin

Örnek 4: trombin+ apt2(F)

Bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 3  $\mu$ M trombin ve 50  $\mu$ M florasanla işaretli ikincil trombin aptameri

Örnek 5: trombin+ apt1(F)+apt2(F)

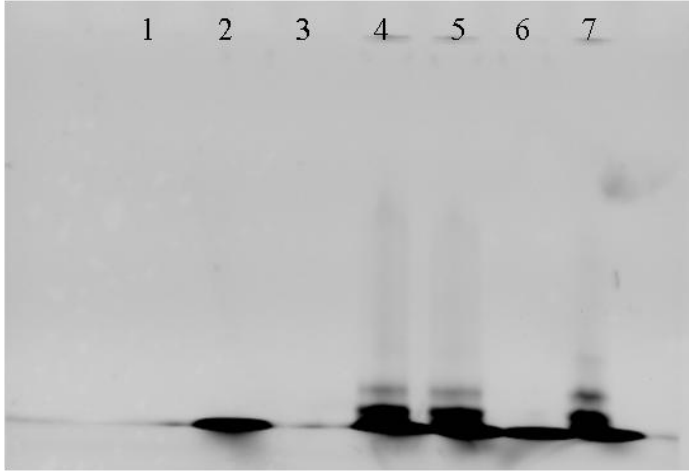
Bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 3  $\mu$ M trombin ve 50  $\mu$ M florasanla işaretli birincil ve ikincil trombin aptameri

Örnek 6: apt1(F)

Bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 50  $\mu$ M florasanla işaretli birincil trombin aptameri

Örnek 7: apt2(F)

Bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 50  $\mu$ M florasanla işaretli ikincil trombin aptameri

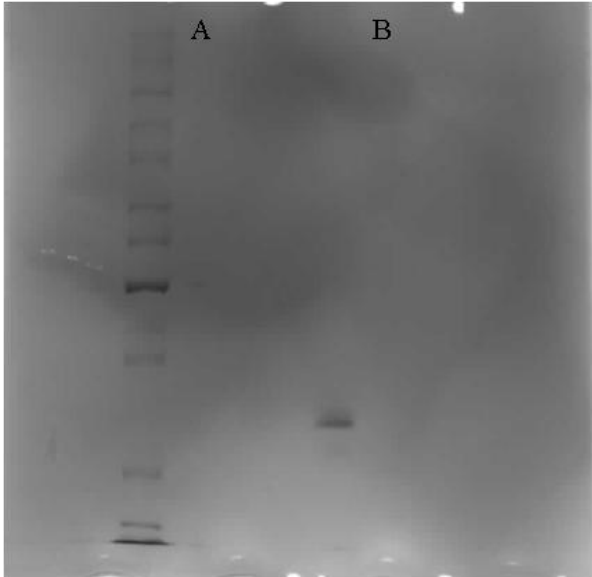


**Şekil 4.7** Trombin ve aptamerlerin %7.5'lik poliakrilamid jel görüntüsü. A. Örnek 1, B. Örnek 2, C. Örnek 3, D. Örnek 4, E. Örnek 5, F. Örnek 6, G. Örnek 7.

Şekil 4.7'de de görüldüğü gibi bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 3  $\mu$ M trombin yüklenen kuyucuklarda bant görünmezken, bağlanma tampon çözeltisi içinde hazırlanan 3  $\mu$ M trombin ve 50  $\mu$ M florasanla işaretli ikincil trombin aptameri ve sadece ikincil aptamerlerin yüklendiği kuyucuklarda bantlar görülmüştür. Bunun yanı sıra görünen bu

bantlar trombin aptamerlerinin trombine bağlanıp bağlanmadığı hakkında bilgiyi vermemektedir.

Sonuç olarak yapılan poliakrilamid jel elektroforez ve EMSA deneylerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda aptamer ve proteinin solüsyon içerisinde bağlanmaları gösterilememiştir. Bunun nedeni olarak trombin proteinin yapısında değişiklik olabileceği yada aktivitesini kaybetmiş olabileceği ve böylece aptamerin trombine bağlanamadığı düşünülmüştür. Bunun ışığında ilk olarak trombin SDS poliakrilamid jelde yürütülmüştür (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8** Trombin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi jel görüntüsü. A. Moleküler ağırlık işaretçi protein karışımı, B. Trombin protein örneği

Elde edilen veri ışığında (Şekil 4.8) trombin proteinin yapısında bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Elimizde var olan trombin proteiniyle sandviç sistemi çalışmaları yürütülmüş aşağıda belirtilen sonuçlar alınmıştır.

#### **4.2.2 Mikrodizi Platformu**

Deney prosedüründeki temel aşamalar aşağıda belirtilmektedir :

- AP1-SH yüzey immobilizasyonu
- İnkübasyon
- Immobilizasyon sonrası yıkama
- Bloklama
- Bloklama sonrası yıkama
- Bağlanma
- Bağlanma sonrası yıkama
- Görüntüleme

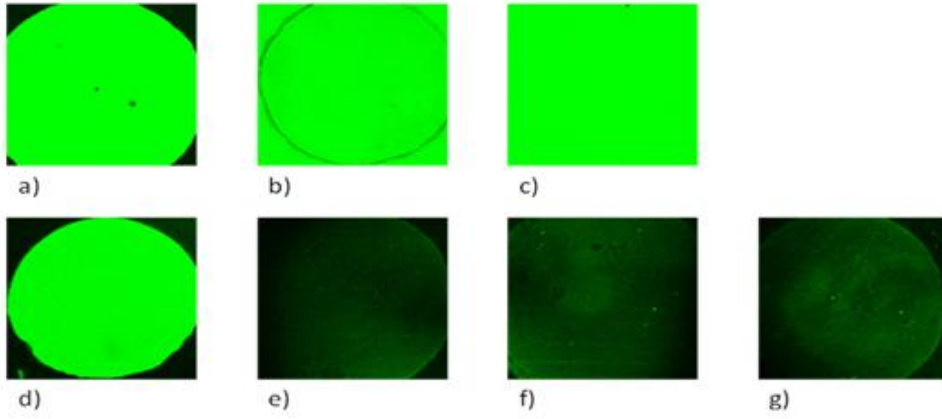
#### **4.2.2.1 Temel Aşamalardaki Farklı Uygulamalar**

##### **4.2.2.1.1 Çapraz Bağlama Ajanının Yüzeğe Uygulanma Şeklinin Karşılaştırılması**

Bu aşamada çapraz bağlama ajanının Apt1-SH moleküllerini yüzeğe bağlamadaki etkisi test edilmiştir. Yapılan birinci deneyde çapraz bağlama ajanı Apt1-SH ile yüzeğe beraber uygulanırken ikinci deneyde yüzey önce çapraz bağlama ajanı ile aktive edilmiş, ardından Apt1-SH aktive edilmiş yüzeğe uygulanmıştır. Sonuç olarak Apt1-SH ile çapraz bağlama ajanının beraber uygulanmasının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiş ve ilerleyen deneylerde bu yöntem kullanılmıştır.

##### **4.2.2.1.2 Trombin ve FAM'lı Aptamer Uygulanma Sırasının Denenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında bağlanma sırasının sinyal üzerindeki etkisi test edilmiştir. Yapılan ilk deneylerde trombin ve Apt2-FAM platforma beraber uygulanırken, ikinci aşamadaki deneylerde Apt1-SH noktalarının üzerine önce trombin ardından Apt2-FAM uygulanmıştır. Sonuç olarak, Apt2-FAM'ın trombinden sonra uygulanmasının daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu durumun olası nedenin birinci aptamerin ve ikinci aptamerin trombine önce ya da sonra bağlanmalarına göre bağlanma kinetiklerindeki değişim olduğu düşünülmektedir. Bağlanma inkübasyonları 37 °C 30 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmalarda ise 1 saat 4 °C inkübasyon yapılmış ve bağlanma tampon çözeltisi içeriği değiştirilmiştir.



**Şekil 4.9** Aptamer 2-FAM ve trombinin bağlanma için uygulanma sıralarının karşılaştırılması: a,d)Pozitif kontroller. b,c)Trombin ve Apt2-FAM'ın aynı anda uygulanması. e,f,g) Önce trambinin ardından Apt2-FAM'ın uygulanması.

#### 4.2.2.1.3 Epoksi Kaplı Yüzey Kullanımı

Hali hazırda kullanılan Poli-l-Lisin (PLL) kaplı yüzeyde karşılaştığımız spesifik olmayan yüzey-sinyal probu etkileşimleri problemlerinden kurtulmak amacıyla, deneylerde epoksi kaplı slaytlar kullanılmıştır. Deney prosedüründeki temel aşamalar 3.2.2' de belirtildiği gibidir.

Temel prensipte önceki yaptığımız deneylerle örtüşen ancak epoksi yüzey için baştan uyarlanmış dizayn ve FAM yerine Kuantum Noktacıkları (KN) kullanarak sinyal elde edilmesi ile yapılan deneylerde istediğimiz sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada platform olarak epoksi kaplı mikroskop camı kullanılmıştır. Bu deneylerde kullanılan aptamerlerin sekansları şu şekildedir:

#### **Yüzey aptameri (Apt-1): 19 baz aminolu:**

5'-/5AmMC6/ATA GGT TGG TGT GGG TTG G-3'

#### **Sinyal aptameri (Apt-2): 34 baz biyotinli**

5' - /5Biosg/CTA TCA GTC CGT GGT AGG GCA GGT TGG GGT GAC T-3'

**-Kontrol aptameri: 19 baz amino ve biyotinli**

5'-/5AmMC6/ATA GGT TGG TGT GGG TTG G/3Bio/-3'

**Aptamer referansı:** Aptamerler Liqing ve ark., çalışması baz alınarak belirlenmiştir (Wang et al., 2009).

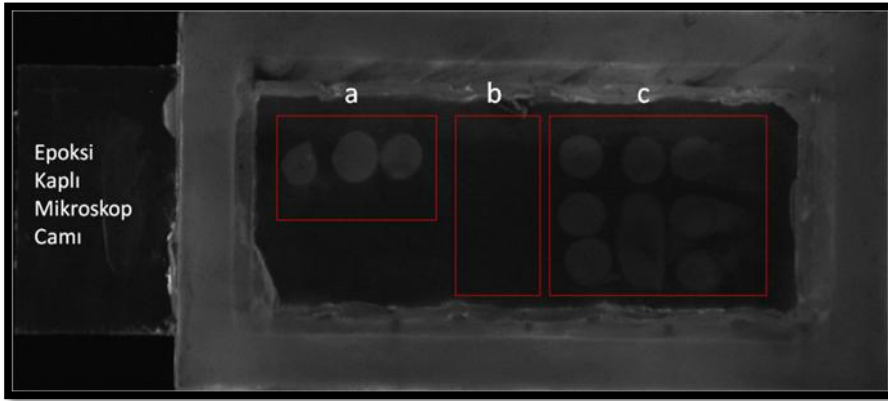
Tek bir platform üstünde üç farklı kontrol denenmiştir:

Kontrol (a): Sandviç sistem içermemektedir. Tiyol ve biyotin modifiye yüzey aptameri (Apt-1) ve kuantum noktacığının bağlanması sonucu elde edilen sinyal.

Negatif kontrol (b): Sandviç sistem kurulmuştur fakat hedef trombin proteini yerine BSA proteini negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Beklenildiği gibi sinyal gözlemlenmemiştir.

Pozitif kontrol (c): Sandviç sistem trombin proteini kullanılarak kurulmuştur. Oluşan sandviç sistem sayesinde olumlu sinyal elde edilmiştir.

Çalışmada cam üzerinde silikon yapıştırıcı yardımıyla bir havuzcuk oluşturulmuş ve sandviç sistem kontrolleri bu havuzcuğun içinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

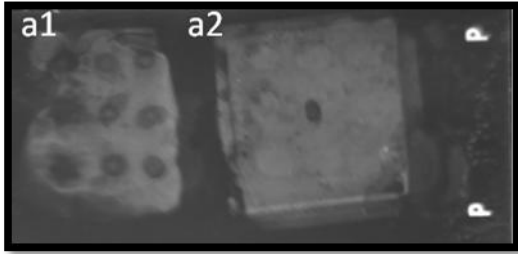


**Şekil 4.10** Tek bir epoksi platformu üzerinde üç ayrı kontrol: (a) Tiyol ve biyotin modifiye aptamer + kuantum noktacığı, (b) Apt-1+BSA+Apt-2. (c) Apt-1+Trombin+Apt-2

#### 4.2.2.1.4 PLL Kaplı Yüzey Kullanımı

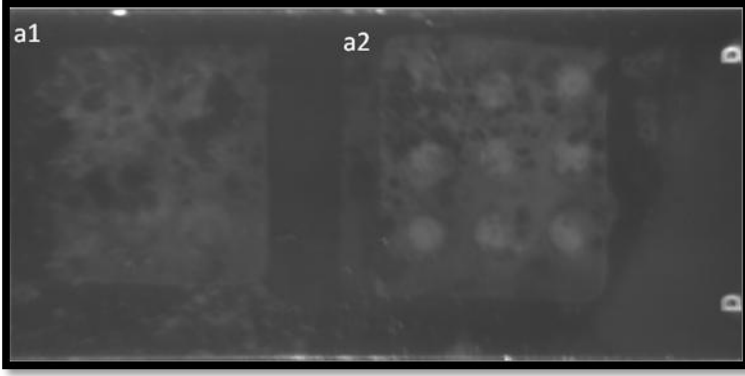
Çalışmada kullanılan aptamer dizileri bir önceki epoksi kaplı yüzeyde kullanılan dizilerin aynısıdır. Deney prosedüründeki temel aşamalar 4.2.2' de belirtildiği gibidir.

Bir önceki deneyde bloklama işleminde etanolamin solüsyonu kullanıldığı için aynı işlem bu deneyde de tekrar edilmiştir. Bu deneyde silikon ile havuzcuk oluşturmak yerine hibridizasyon ve kuantum noktacığ uygulaması sırasında lamel kullanılarak sandviç sistem oluşturulmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlardan görüldüğü üzere Apt-2 yüzeye yapıştığı için beklenmeyen sinyal elde edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibidir.



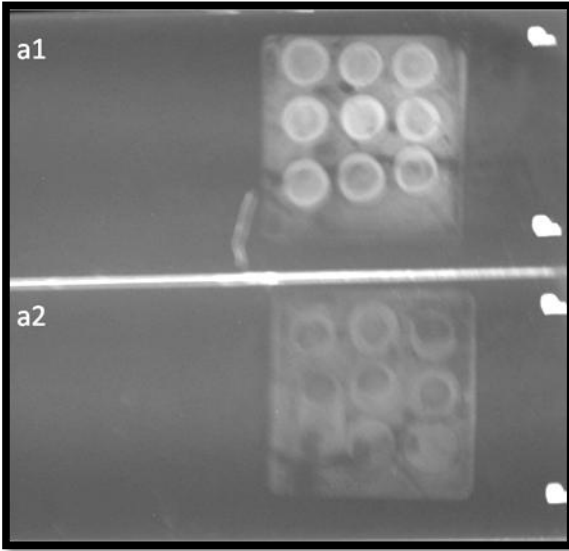
**Şekil 4.11** Trombin sandviç sisteminin PLL yüzeyde denenmesi: (a1) Apt-1+BSA+Apt-2 (negatif kontrol) ve (a2) Apt-1+trombin+Apt-2 (pozitif kontrol).

Sandviç sistemin kurulduğu tarafta (a2) hem spotlardan hem de çevresinden yoğun miktarda sinyal alınmıştır. Fakat negatif kontrolde BSA kullanıldığı için sandviç sistem kurulamamış ve spotlardan sinyal alınamamıştır. Yine aynı şekilde Apt-2 etanolamin ile bloklanmış yüzeye yapıştığı için spotların çevresinden sinyal alınmıştır. Bu duruma etanolamin bloklama işleminin neden olduğunu düşündüğümüz için bir sonraki çalışmada PLL kaplı cam yüzey % 2' lik BSA solüsyonu ile kaplanmıştır.



**Şekil 4.12** Trombin sandviç sisteminin PLL yüzeyde denenmesi: (a1) Apt-1+BSA+Apt-2 (negatif kontrol) ve (a2) Apt-1+trombin+Apt-2 (pozitif kontrol).

Bu çalışmada Apt-2' nin yüzeye yapışıp beklenmeyen sinyal vermesi önemli ölçüde azaltılmıştır. Bu yüzden PLL yüzeyde aptamer tabanlı sandviç sisteminin kurulmasında BSA bloklama işleminin daha uygun olduğu görüşüne varılmıştır. Deney bir kez daha tekrar edilmiştir. Sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.



**Şekil 4.13** Trombin sandviç sisteminin PLL yüzeyde denenmesi:(a1) Apt-1+trombin+Apt-2 (pozitif kontrol) ve (a2) Apt-1+BSA+Apt-2 (negatif kontrol).

Görüldüğü üzere Apt-2' nin yüzeye yapışıp beklenmeyen sinyal vermesi minimize edilmiştir. Deneylede pozitif ve negatif kontrol arasındaki sinyal farkından aptamer tabanlı sandviç



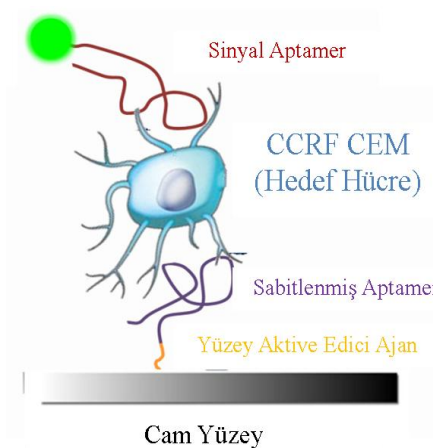
dizinin oluşturulup trombinin tespit edilebildiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla projemizde öngördüğümüz aptamer dizileri ile farklı proteinlerin belirlenebilmesi ile ilgili konsept doğrulama çalışmaları başarı ile sonuçlandırılmıştır.

## 5. Lösemi Hücresi Aptamer Çalışmaları

### 5.1 Giriş

Lösemi kan yapımında görevli organlarda oluşan hematolojik bozukluklardan kaynaklanan ve kan hücrelerinin özellikle de lökositlerin normalin üzerinde çoğalması ile kendini gösteren bir kanser türüdür. Akut lenfoid lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML) ve kronik lenfoid lösemi (KLL) olmak üzere dört çeşidi vardır (Kasteng, 2007).

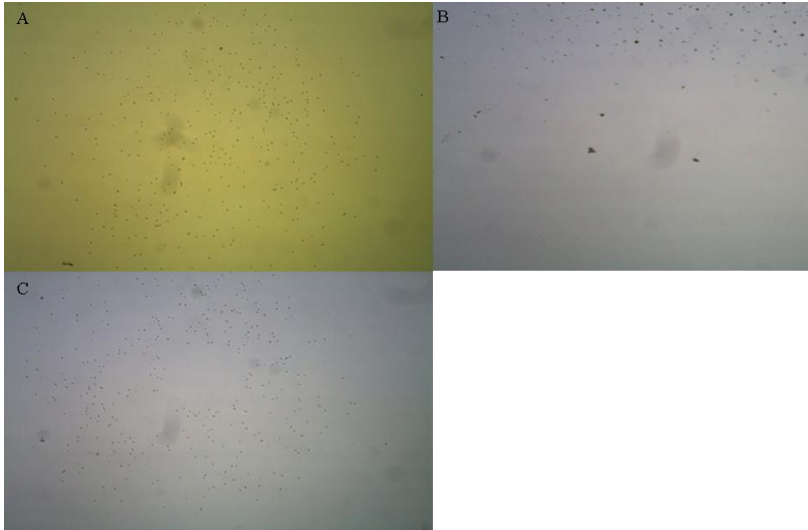
Daha önce de belirtildiği gibi literatürde Sgc8, CCRF-CEM isimli akut lenfoid lösemi hattı kullanılarak seçilmiş bir DNA aptamerdir. Üretilen bu aptamer ALL örneklerinde denenmiş ve hastalığı içeren hücreleri kontrol gruplarından başarı ile ayırdığı gösterilmiştir. Bu yüzden projenin hücre tanı sandviç sistemi kısmında CCRF-CEM adlı lösemi hücre hattı ve sgc8 aptameri kullanılmıştır. Proje kapsamında geliştirilen sistemin şematik gösterimi Şekil 5.1.de verilmektedir.



**Şekil 5.1** Aptamer sandviç sistemi. Yüzeye sabitlenmiş aptamer CEM lösemi hücrelerine bağlanır. CEM varlığı ise ikinci bir sinyal aptamerinin hedef hücreye bağlanıp bağlanmamasına göre tespit edilir.

İlk olarak lösemi hücre tanısı için sandviç platformu oluşturmak amacıyla projenin ilk altı aylık kısmında yapılan çalışmalar sonucunda optimize edilen sandviç platformu denenmiştir. Hücre ile aptamer arasındaki etkileşimi bozmamak için yıkama ve inkübasyon aşamaları yıkama ve bağlanma tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Poli-L-lisin kaplı cam yüzeye tiyol modifiyeli sgc8 aptamer immobilize edilmiş ve spesifik olmayan bağlanmalar engellemek için yıkama işlemleri yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye spesifik olamayan bağlanalarını engellemek için BSA proteini ile bloklama işlemi yapılmış ve CCRF-CEM isimli bir akut lenfoid lösemi hattı noktacık şeklinde aptamer immobilize edilmiş yüzeye uygulanmıştır. Aptamerlerin hedefe spesifik olduğunu kanıtlamak için CCRF-CEM isimli akut lenfoid lösemi hattına bağlanmayan tdo5 aptameri kontrol olarak yüzeye immobilize edilmiş ve aynı şekilde lösemi hücresi üzerine uygulanmıştır. Bu aşamada amacımız aptamerin yüzeye immobilize edildiği ve spesifik hücrelerin aptamere bağlandığını göstermek olduğu için floresan işaretli ikincil aptamer kullanılmamış, bunun yerine aptamer immobilize edilen ve üzerine hücre uygulanmış cam yüzey mikroskop altında gözlemlenmiştir.

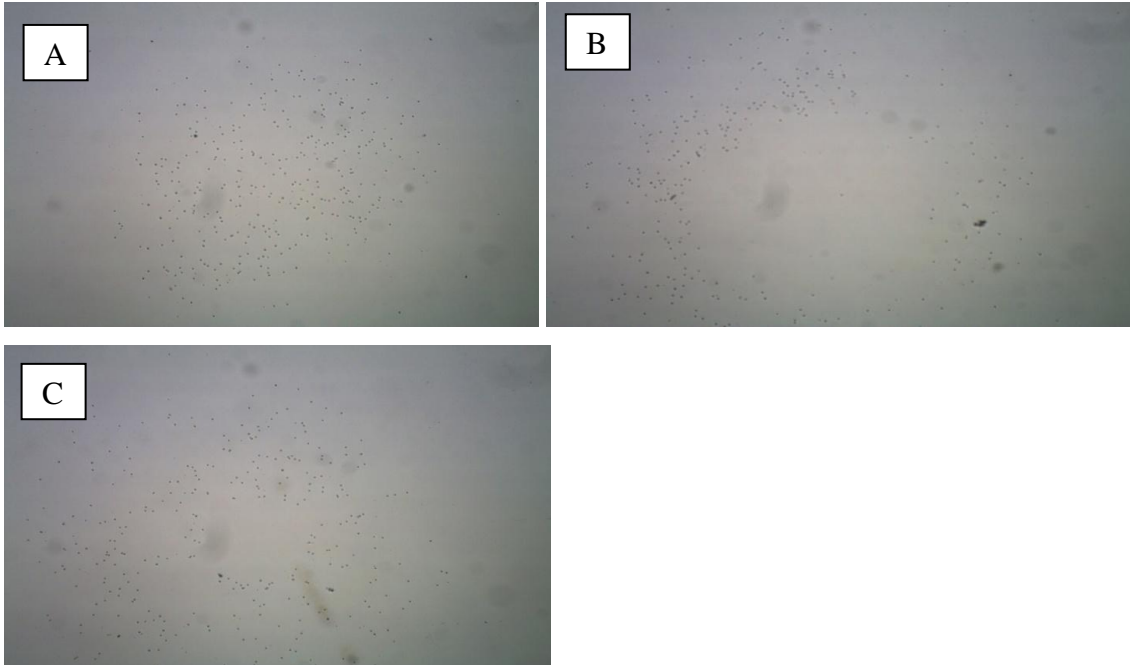


**Şekil 5.2** CEM lösemi hücresi ile inkübe edilen yüzeyin mikroskop görüntüsü (4X). A.  $10\mu\text{M}$  sgc8 aptameri immobilize edilmiş yüzeye uygulanan hücre B.  $10\mu\text{M}$  tdo5 aptameri immobilize edilmiş yüzeye uygulanan hücre C. Aptamer immobilize edilmemiş yüzeye uygulanan hücre.

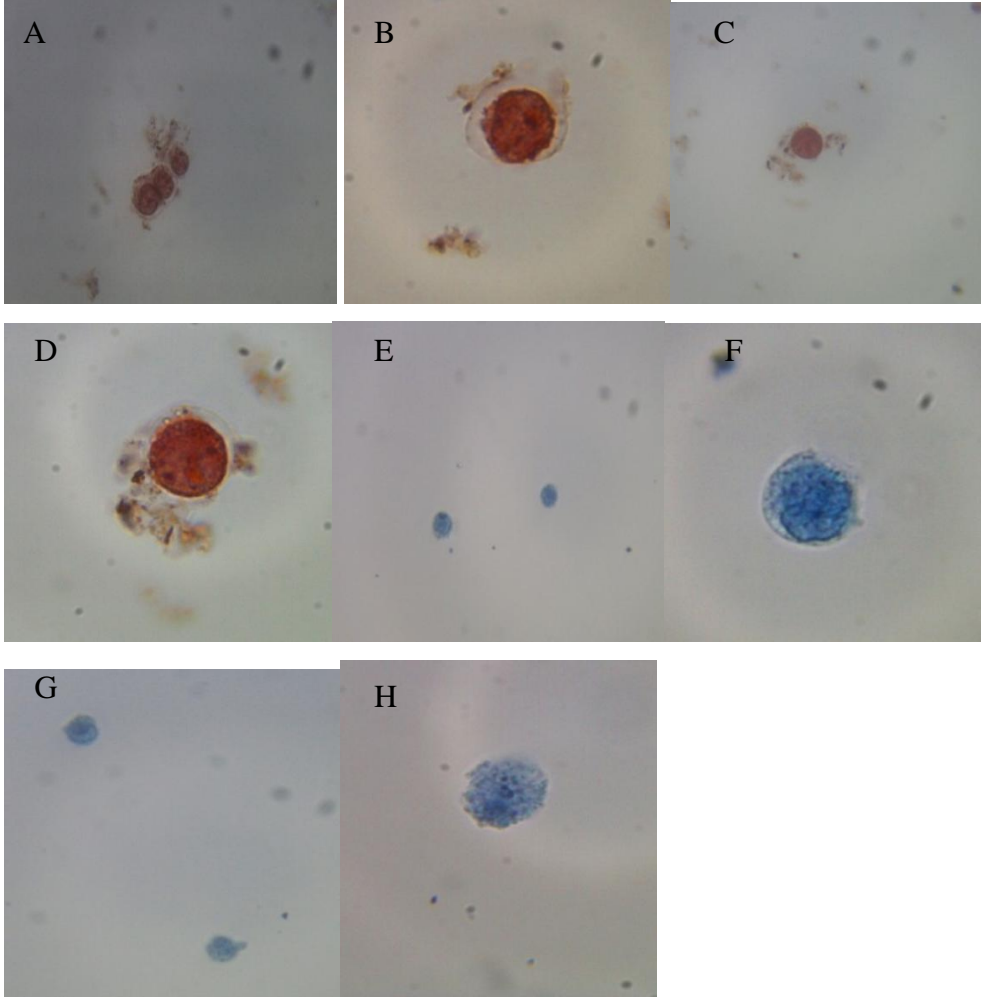
Şekil 5.2 A' da görüldüğü gibi CEM lösemi hücresine karşı seçilen sgc8 aptamerinin yüzeye immobilize edildiği noktalarda lösemi hücresi bağlanmıştır. Fakat CCRF-CEM hücre hattına spesifik olmayan tdo5 aptamerinin olduğu bölgelerde (Şekil 5.2 B) ve ayrıca hiçbir aptamerin olmadığı bölgelerde de CEM hücresinin spesifik olmayan bağlanmaları gözlemlenmiştir (Şekil 5.2 C).

İlk denemeler sonucunda elde edilen CEM hücresinin spesifik olmayan bağlanmalarından kurtulmak amacıyla cam yüzeyler yıkama tampon çözeltisi ile 10 dakika 4°C' de yıkanmış ve mikroskop görüntüleri alınmıştır. Şekil 5.3'de görüldüğü gibi CEM hücresinin spesifik olmayan bağlanmaları yıkama sonrasında bile yüzeyde görülmektedir.

Ayrıca kullanılan hücre hattının poli-L-lisin kaplı bloklanmamış cam yüzeye spesifik olmayan bağlanması aptamer kullanılmadan sadece hücrelerin yüzeye inkübe edilmesiyle de gösterilmiştir. Poli-L-lisin kaplı yüzeye CEM ve negatif kontrol olarak kullanılması düşünülen RAMOS lösemi hücreleri uygulanmış ve inkübasyon süresi sonunda yıkama tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Cam slaytlar nötral kırmızı ve nil mavisi boyama solüsyonlarıyla ayrı ayrı boyanmış, mikroskop altında görüntüleri alınmıştır. (Şekil 5.4).



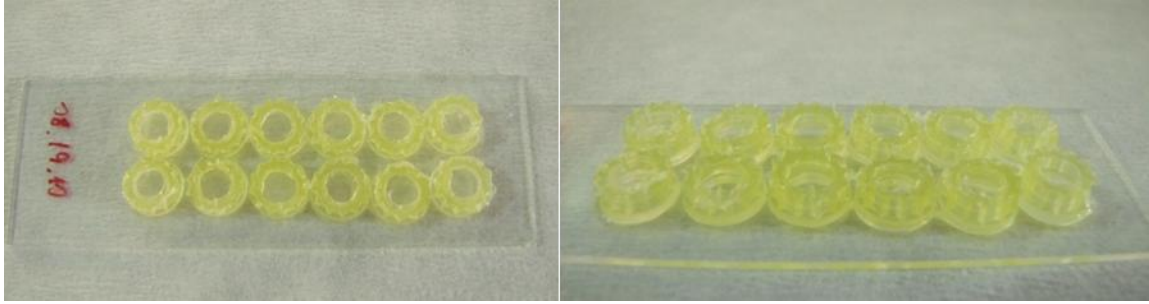
**Şekil 5.3** CEM lösemi hücresi ile inkübe edilen yüzeyin yıkama işleminden sonraki mikroskop görüntüsü (4X). A.10uM sgc8 aptameri immobilize edilmiş yüzeye uygulanan hücre B. 10uM tdo5 aptameri immobilize edilmiş yüzeye uygulanan hücre C. Aptamer immobilize edilmemiş yüzeye uygulanan hücre.



**Şekil 5.4** Neutral red ile boyanmış CEM hücrelerinin poli-L-lisin kaplı yüzeyde A. 40X mikroskop görüntüsü, B. 100X mikroskop görüntüsü, Neutral red ile boyanmış RAMOS hücrelerinin poli-L-lisin kaplı yüzeyde C. 40X mikroskop görüntüsü, D. 100X mikroskop görüntüsü, Nile blue ile boyanmış CEM hücrelerinin poli-L-lisin kaplı yüzeyde E. 40X mikroskop görüntüsü, F. 100X mikroskop görüntüsü, Nile blue ile boyanmış RAMOS hücrelerinin poli-L-lisin kaplı yüzeyde G. 40X mikroskop görüntüsü, H. 100X mikroskop görüntüsü

Şekil 5.3 ve 5.4’ de de görüldüğü gibi kullanılan CEM lösemi hücresi poli-L-lizin kaplı yüzeye spesifik olmayan bağlanma göstermiştir. Bu sebeple projenin devamında bu spesifik olmayan hücre bağlanmalarını engellemek ve sandviç platformunu oluşturmak için yıkama işleminin tekrarı, hız ve süresinin artırılmasına ve bloklama işleminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yapılan deneylerde farklı bloklama çeşitleri, farklı yıkama hız ve süreleri kullanılmasına rağmen spesifik olmayan bağlanma engellenememiştir. Sorunun yıkama ve solüsyon değiştirme sırasında kuruyan slaytlara hücrelerin adsorbsiyonu olduğu düşünülerek deneyleri solüsyon ortamda yapılabilecek slaytlar dizayn edilmiştir. Ayrıca poli-L-lizin kaplı yüzeye hücrelerin daha kolay bağlanmasından dolayı deneylerin kalan kısmına epoksi kaplı slaytlar kullanılarak devam edilmiştir. Şekil 5.5’de görüldüğü gibi epoksi kaplı slaytlar üzerine pipet uçlarının alt kısımları kesilerek yine epoksi yapıştırıcı kullanılarak yapıştırılmış ve slayt üzerinde sızdırmaz bölmeler oluşturulmuştur. Deney süresince farklı örnekler bu bölmelerde birbirinden ayrı uygulamalara tabi tutulmuş ve bu işlemler sırasında bölmenin solüsyon halinde kalması sağlanmış bu sayede istenmeyen (özgün olmayan) hücre yüzey etkileşimleri engellenmiştir.

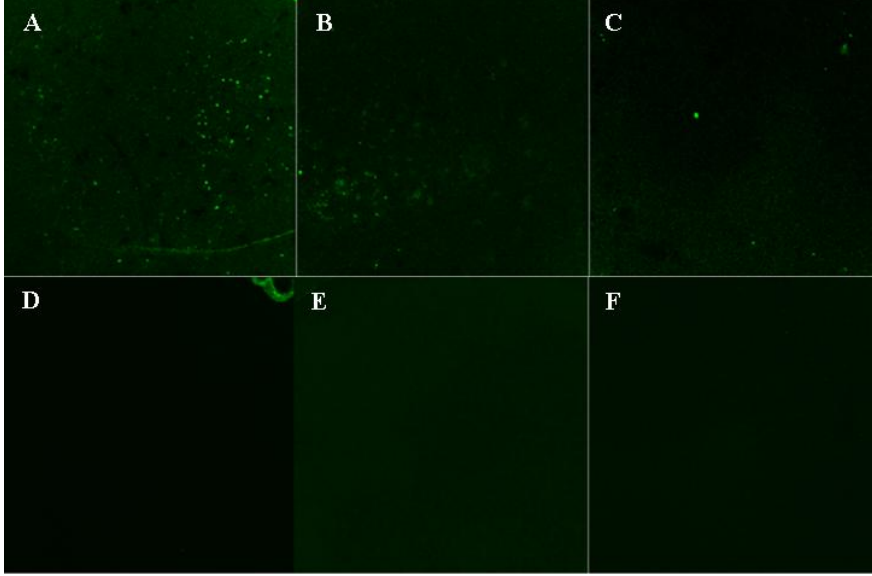


**Şekil 5.5** Epoksi slaytların üzerine pipet uçlarının taban kısmının epoksi yapıştırıcı ile yapıştırılmasıyla oluşturulan slayt dizaynı.

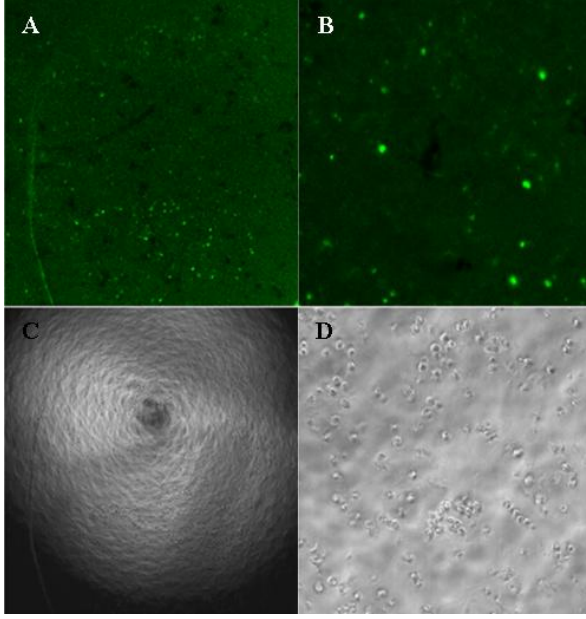
Yeni dizayn edilen epoksi kaplı slaytlarda yaşanan problemler çözülmüş hedef hücrenin yüzeye özgün olmayan bağlanması engellenmiştir. Yapılan deneylerde yüzeye amino modifiye edilmiş 10 $\mu$ M, 5 $\mu$ M ve 1 $\mu$ M sgc8c aptameri immobilize edilmiş, hedef hücre ile inkübe edildikten sonra sinyal olarak FAM işaretli sgc8c aptameri kullanılmıştır. Deneylerde negatif kontrol olarak aptamer bağlanmamış yüzey, spesifik olmayan DNA dizisi ve hedef hücre uygulanmamış bölmeler kullanılmıştır.

Şekil 5.6’ da farklı aptamer konsantrasyonların uygulandığı yüzeyde hedef hücre ve sinyal aptamerin bağlanmasıyla elde edilen sinyalin karşılaştırması görülmektedir.

Yüzeye 10 $\mu$ M (A), 5 $\mu$ M (B) ve 1 $\mu$ M (C) aptamer bağlanmış bölmelerde artan konsantrasyonla daha çok hücre yakalanması sağlandığı için 10 $\mu$ M sinyal aptameri (FAM modifiyeli) uygulandığında yine artan bir oranda sinyal floresan görülmüştür. Ayrıca hedef hücrenin uygulanmadığı bölümde (D), aptamerin sabitlenmediği yüzeyde (E) ve tdo5 isimli hedef hücreye bağlanmayan DNA dizisi kullanıldığında (F) floresan sinyal saptanamamıştır.



**Şekil 5.6** 10 $\mu$ M (A), 5 $\mu$ M (B) ve 1 $\mu$ M (C) sgc8c aptamer sabitlenmiş epoksi yüzeyde CCRF-CEM hücrelerinin 10 $\mu$ M floresan modifiyeli aptamer ile konfokal floresan mikroskop görüntüsü. Negatif kontrollerde: hücresiz bölmede (D), aptamer bağlanmamış yüzeyde (E) ve tdo5 isimli hedef hücreye bağlanmayan DNA dizisi (F) kullanıldığında floresan sinyal saptanamamıştır.



**Şekil 5.7** 10  $\mu$ M sgc8c aptamer sabitlenmiş yüzeyde CCRF-CEM hücrelerinin floresanlı aptamer ile 4X (A,C) ve 40X (B,D) floresan (A,B) ve ışık (C,D) görüntüsü.

Elde edilen veriler sonucunda projede hedeflenen sandviç sisteminin hedef hücre tanısındaki uygulamasının başarıyla oluşturulduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak proje kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda aptamer diziler ile hücre algılama konusunda hedeflenen konsept doğrulama çalışmalarında başarıya ulaşılmıştır.

## SONUÇ

Projemiz kapsamında nükleik asit (DNA), protein ve hücre olmak üzere farklı moleküllerin tayininde kullanılabilecek dizi (array) platformlarının geliştirilmesi önerilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda proje müracaatında öngörülen tüm çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yine bu bağlamda öngörülen hedeflerin tümüne ulaşılmış ve bahsi geçen dizi platformlarının tümü için konsept doğrulama çalışmaları başarı ile sonuçlandırılmıştır.

Projede geliştirmiş olduğumuz FAM ve kuantum noktacıklarla görüntü oluşturulan platformlardan yüksek tekrarlanabilirlik ve çok düşük geri plan oranlarına ulaşılmıştır. Platformların performanslarının birden çok prob ve adaptör ile doğrulanması ile ilgili

çalışmaların gerçekleştirilmesinde fayda olacaktır. Altın noktacıklarla görüntü oluşturulması konusunda da proje kapsamında olumlu sonuçlar alınmış ancak geri plan ve negatif kontrollerdeki sinyal oluşumu konularında iyileştirme çalışmaları gerekmektedir.

Aptamer sandviç dizileri konusunda öngördüğümüz gibi konsept doğrulama çalışmaları sonuçlandırılmış olup sistemin geri plan sinyal seviyelerinde iyileştirmeye yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi ve sistemin en az diğer bir aptamer-protein çifti ile çalışılmasında fayda olacaktır. Bunu takiben birden çok aptamer ile oluşturulmuş dizilerde çalışmaların gerçekleştirilmesi gereklidir.

Hücrelerin algılanması ile ilgili biyosensör geliştirme çalışmalarında ümitvar sonuçlara ulaşılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda platformun mikro veya makro seviyede oluşturulacak kanallar ile akışkan bir formata çevrilmesinde fayda olacağı gözlenmiştir. Bu platformun özellikle sıcaklık kontrolü ve yıkama açısından esneklik getireceği ve bu sayede sistemin daha fazla parametre ile çalışılmasının mümkün olacağı gözlenmektedir. Bu sayede hem farklı aptamerlerin hem de farklı hücre tiplerinin algılanmasına yönelik platformların geliştirilmesinin mümkün olabileceği değerlendirilmektedir.

Projemiz kapsamında ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji anabilim dalına bağlı iki yüksek lisan tez çalışması tamamlanmıştır. Çalışmalar aynı enstitüde yürütülmekte olan iki doktora tez çalışmasında belirli bölümlerini oluşturacaktır.

Proje çalışmaları sonucunda ulaşılan nokta laboratuvarlarımızda yukarıda belirtilen öneriler çerçevesinde yeni Ar-Ge faaliyetlerini başlatacak niteliktedir ve bu konudaki çalışmalarımız devam etmektedir.



## REFERANSLAR

- BAJAJ M.G., DNA Hybridization: Fundamental Studies and Applications in Directed Assembly. In Chemical Engineering (Cambridge, Massachusetts Institute of Technology). (2000).
- BANG G. S., Cho S., Kim B.-G., A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 863–870, (2005).
- BERGVELD P., Thirty years of ISFETOLOGY<sup>\*1</sup>: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years, *Sens. Actuators B*, 88, 1-20, (2003).
- BOCK L. C., Griffin L. C., Latham J. A., Vermaas H. E., Toole J. J., Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, 355, 564–566, (1992).
- BURMEISTER P. E., Lewis S. D., Silva R. F., Preiss J. R., Horwitz L. R., Pendergrast P. S., McCauley T. G., Kurz J. C., Epstein D. M., Wilson C., Keefe A. D., Direct In Vitro Selection of a 2'-O-Methyl Aptamer to VEGF, *Chemistry & Biology*, 12, 25–33, (2005).
- CHRISEY L. A., Lee G. U., O'Ferrall C. E., Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films, *Nucleic Acid Research*, 24, 15, 3031-3039, (1996).
- DANG C., Jayasena S. D., Oligonucleotide Inhibitors of Taq DNA Polymerase Facilitate Detection of Low Copy Number Targets by PCR, *Journal of Molecular Biology*, 264, 2, 268-278, (1996).
- DEMERS L. M., Mirkin C. A., Mucic R. C., Reynolds R. A., Letsinger R. L., Elghanian R., Viswanadham G., Fluorescence-Based Method for Determining the Surface Coverage and Hybridization Efficiency of Thiol-Capped Oligonucleotides Bound to Gold Thin Films and Nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 72, 5535-5541, (2000).
- DOUGANA H., Weitz J. I., Stafford A. R., Gillespie K.D., Klement P., Hobbs J. B., Lyster D. M., Evaluation of DNA aptamers directed to thrombin as potential thrombus imaging agents, *Nuclear Medicine and Biology*, 30, 61–72, (2003).
- DZYADEVYCH S., Soldatkin A., El'skaya A., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors. *Anal. Chim. Acta*, 568, 248–258, (2006).
- ELLINGTON A. D., Szostak J. W., In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 346, 6287, 818-822, (1990).

FAMULOK M., Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder, *Journal of the American Chemical Society*, 116, 5, 1698-706, (1994).

FANG X., Goldys E.M., The effect of size of Au-core Ag-shell nanoparticles on their enhancement of fluorescence, *Nanoscience and Nanotechnology*, 2006. *ICONNapos; 06.International Conference*, (2006).

FREDRIKSSON S., Gullberg M., Jarvius J., Olsson C., Pietras K., Gústafsdóttir S. M., Östman A., Landegren U., Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays, *Nature Biotechnology*, 20, 473 – 477, (2002).

FRITZ J., Cooper E. B., Gaudet S., Sorger P. K., Manalis S. R., Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge, *PNAS*, 99, 22, 14142-14146, (2002).

HALLIWELL C. M., Cass A. E. G., A Factorial Analysis of Silanization Conditions for the Immobilization of Oligonucleotides on Glass Surfaces, *Anal Chem*, 73, 11, 2476–2483, (2001).

HAN X., Buerro-Ramos C. E., Advances in pathological diagnosis and biology of acute lymphoblastic leukemia, *Anal of Diagnostic Pathology*, 9, (2005).

HERMANDEZ-RODRIGUEZ N.A., Correa E., Contreras-Paredes A., Thrombin: A new useful factor in the early diagnosis of pulmonary metastasis, *Rev.Inst.Nal.Cancerol.*, 43, 65–75, (1997).

HUANG C., Huang Y., Cao Z., Tan W., Chang H., Aptamer-Modified Gold Nanoparticles for Colorimetric Determination of Platelet-Derived Growth Factors and Their Receptors, *Anal. Chem.* 77, 5735-5741, (2005).

IKEBUKURO K., Kiyohara C., Sode K., Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 10, 2168–2172, (2005).

JERONIMO P. C., Montenegro B., Optical sensors and biosensors based on sol-gel films, *Talanta*, 72, 13-27, (2007).

KASTENG F., Sobocki P., Svedman C., Lundkvist J., Economic evaluations of leukemia: A review of the literature, *IntJournTechAssesst Health Care*, 23, 1, 43-53, (2007).

PUI C., Robison L. L., Look A. T., Acute lymphoblastic leukemia, *Lancet*, 371, 1030-1043, (2008).

KIM D., Jeong Y., Park H., Shin J., Choi P., Lee J., Lim G., An FET-type charge sensor for highly sensitive detection of DNA sequence, *Biosens. Bioelectron.*, 20, 69–74, (2004).

KONCKI R., Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis, *Anal Chimica Acta*, 599, 7-15, (2007).

LIU J., Lu Y., Accelerated Color Change of Gold Nanoparticles Assembled by DNAzymes for Simple and Fast Colorimetric Pb<sup>2+</sup> Detection, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 12298-12305, (2004).

LIU J., Lee J. H., Lu Y., Quantum Dot Encoding of Aptamer-Linked Nanostructures for One-Pot Simultaneous Detection of Multiple Analytes, *Anal Chem*, 79, 4120-4125, (2007).

LZACKA O., Munoz F. X., Pathogen Detection: A Perspective of traditional methods and biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1205-1217, (2007).

MAIRAL T., Özalp V. C., Sanchez P. L., Mir M., Katakis I., O'Sullivan C. K., Aptamers: molecular tools for analytical applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 989-1007, (2008).

MARRAS S.A.E., Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes, *Methods in Molecular Biology: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols*, ed: V.V. Didenko, Humana Press Inc., Totowa, NJ, Pp: 3, (2006).

MEDLEY C. D., Smith J. E, Tang Z., Wu Y., Bamnangsap S., Tan W., Gold nanoparticles-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells, 80, 1067-1072, (2008).

MINUNNI M., Tombelli S., Gullotto A., Luzi E., Mascini M., Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein, *Biosens. Bioelectron.*, 20, 1149-1156, (2004).

MIR M., Vreeke M., Katakis I., Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor, *Electrochemistry Communications* , 8, 505-511, (2006).

NAKAMURA T., Electrochemical Biosensors in Nonaqueous Solutions and their Applications, *Analytical Sciences*, 23, 253-259, (2007).

NUGEN S. R., Leonard B., Baeumner A. J., Application of a unique server-based oligonucleotide probe selection tool toward a novel biosensor for the detection of *Streptococcus pyogenes*, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 11, 2442-2448, (2007).

OKTEM H. A., Bayramoglu G., Ozalp V. C., Arica M. Y., Single-Step Purification of Recombinant *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Using DNA-Aptamer Immobilized Novel Affinity Magnetic Beads, *Biotechnol. Prog.*, 23, 146-154, (2007).

PROSKE D., Blank M., Buhmann R., Resch A., Aptamers- basic research, drug development, and clinical applications, *Applied Microbial Biotechnology*, 69, 367-374, (2005).

RAUTIO J., Barken K. B., Lahdenperä J., Breitenstein A., Molin S., Neubauer P., Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNAs in crude cell lysates, *Microbial Cell Factories*, 2, 1, 4, (2003).

ROBETSON D. L., Joyce J. F., Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA, *Nature*, 344, 6265, 467-468, (1990).

RODRIGUEZ M. C., Kawde A.-N., Wang J., Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge, *Chem. Commun.*, 4267–4269, (2005).

SAKATA T., Miyahara Y., Detection of DNA recognition events using multi-well field effect devices, *Biosens. Bioelectron.*, 21, 827–832, (2005).

SCHÖNING M. J., Poghossian A., Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs), *Analyst*, 127, 1137-1151, (2002).

SCHÖNING M. J., Poghossian A., Bio FEDs (Field-Effect Devices): State-of-the-Art and New Directions *Electroanalysis* 18, 19, 20, 1893-1900, (2006).

SHANGGUAN D., Li Y., Tang Z., Cao Z., Tan W., Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study, *PNAS*, 103, 11838-11843, (2006).

SHANGGUAN D., Tang Z., Mallikaratchy P., Xiao Z., Tan W., Optimization and modification of aptamers selected from live cancer lines, *ChemBioChem*, 8, 603-606, (2007).

SHIN J.-K., Kim D.-S., Park H.-J., Lim G., Detection of DNA and Protein Molecules Using an FET-Type Biosensor with Gold as a Gate Metal, *Electroanalysis*, 16, 22, 1912-1918, (2004).

SO H.M., Won K., Kim Y. H., Kim B.K., Ryu B. H., Na P. S., Kim H., Lee J.O., Single-Walled Carbon Nanotube Biosensors Using Aptamers as Molecular Recognition Elements, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 11 906-11907, (2005).

SONG S., Wang L., Li J., Zhao J., Fan C., Aptamer-based biosensors, *Trends in Analytical Chemistry*, 27,2, (2008).

SOUTHERN E., Mir K., Shchepinov M., Molecular interactions on microarrays, *Nature Genetic*, 21, 5-9, (1999).

STORHOFF J. J., Elghanian R., Mucic R. C., Mirkin C. A., Letsinger R. L., One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probe, *J Am Chem Soc.*, 120, 1959, (1998).

TOMBELLI S., Minunni M., Luzi E., Mascini M., Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein, *Bioelectrochemistry*, 67, 2, 135-141, (2005).

TUERK C., Gold L., Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, 249, 4968, 505-510, (1990).

USLU F., Ingebrandt S., Mayer D., Böcker-Meffert S., Odenthal M., Offenhäuser A., Label-free fully electronic nucleic acid detection system based on a field-effect transistor device, *Biosens. Bioelectron.* 19, 1723–1731, (2004).

WANG X., Zhou J., Yun W., Xiao S., Chang Z., He P., Fang Y., Detection of thrombin using electrogenerated chemiluminescence based on Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-doped silica nanoparticle aptasensor via target protein-induced strand displacement, *Analytica Chimica Acta*, 598, 242–248, (2007).

WANG L.Q., Li L.Y., Xu Y., Cheng G.F., He P.A., Fang Y. Z., Simultaneously fluorescence detecting thrombin and lysozyme based on magnetic nanoparticle condensation, *Talanta*, 79, 557-561, (2009).

WILLNER I., Zayats M., Electronic aptamer-Based Sensors, *Angew.Chem. Int. Ed.*, 46, 6408-6418, (2007).

XIAO Y., Lubin A. A., Heeger A. J., Plaxco K. W., Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 44, 34, 5456–5459, (2005).

YAKIMOVICH O.Y., Alekseev Y.I., Maksimenko A.V., Voronina O.L., Lunin V.G., Influence of DNA Aptamer Structure on the Specificity of Binding to Taq DNA Polymerase, *Biochemistry (Moscow)*, 68, 2, 228-235, (2003).

ZHAO W., Chiuman W., Brook M. A., Li Y., Simple and Rapid Colorimetric Biosensors Based on DNA Aptamer and Noncrosslinking Gold Nanoparticle Aggregation, *ChemBioChem*, 8, 727 – 731, (2007).

ZHOU, X.C., Wu, L.Y., and Zhou, J.Z., Fabrication of DNA microarrays on nanoengineered polymeric ultrathin film prepared by self-assembly of polyelectrolyte multilayers, *Langmuir* 20, 8877-8885, (2004).

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 108M410
<b>Proje Başlığı:</b> Çip Formatında Oligonükleotid ve Aptamer Tabanlı Biyosensör Platformunun Geliştirilmesi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof.Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM - Proje Yürütücüsü, Yrd.Doç. Can ÖZEN – Araştırmacı Abdullah Tahir Bayraç (Bursiyer) Taner Tuncer Ceren Karakaş Sena Cansız (Bursiyer) Fatma Kılback(Bursiyer)
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Binası Kat 2 Laboratuvar No 209, 06531 Ankara
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Yoktur.
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01.11.2008- 30.10.2010
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Projemiz üç farklı hedef moleküle karşı oluşturulmuş sandviç sistemine dayalı çip platformunun geliştirilmesini kapsamaktadır. Oligonükleotid tabanlı hedef DNA tanı sistemi için üç farklı sinyal stratejisi uygulanmıştır. Floresans, altın ve kuantum parçacık işaretli sinyal probunun hedef DNA dizisine hibridlenmesiyle oluşan sandviç sisteminden başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntemle optimize edilen mikrodizi platformu hedefe özgü aptamerler kullanılarak trombin proteini ve lösemi hücre hattının tanısı gerçekleştirilmiş ve sistemin bu hedef moleküller üzerindeki yeterliliği gösterilmiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Sandviç sistemi, nükleik asit, aptamer, hibridizasyon
<b><a href="#">Fikri Ürün Bildirim Formu</a> Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> ERCAN O, Altas B, Cansiz S, Karakas C, Bayrac T, Yildiz L, Tuncer T, Gul F, Uzun Z, Özen C, Öktem HA. Development of a Sandwich Aptamer Assay. BIOTECH METU 2009. International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, ODTÜ, Ankara (2009).

CANSIZ S, Özen C, Bayraç T, Tuncer T, Karakaş C, Kılbacak F, Şenyurt Ö, Kavruk M, Altaş B, Öktem HA., Development of a Sandwich Type DNA Array Platform. 15. International Biomedical Science and Technology Symposium. Güzelyurt, KTTC. (2009).

CANSIZ, S.(2010). *Development of a Sandwich-type DNA Array Platform for the detection of label-free oligonucleotide Targets.* (Yüksek Lisans Tezi) ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2010).

GÜL, F. (2010). Development of an Oligonucleotide based Sandwich Array Platform for the detection of Transgenic Elements from Plant Sources using label-free PCR Products. (Yüksek Lisans Tezi) ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2010).