

TNF- α TAYİNİ İÇİN REFLEKTOMETRİK İNTERFERANS SPEKTROSKOPİSİ TEMELLİ SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Sibel Emir DİLTEMİZ¹, Ayça Atılır ÖZCAN¹, Özlem YALÇINKAYA¹

ÖZ

Bu çalışmada, TNF- α biyomolekülünü seçici olarak tanıyan ve bağlayabilen reflektometrik interferans spektroskopisi temelli sensör sistemi hazırlanmıştır. Bu amaçla, reflektometrik interferans spektroskopisi temelli ve karboksimetildekstran kaplı sensör sistemleri TNF- α antibadının uygun yönelimli bağlanabilmesi amacıyla aktive edilmiş, ardından uygun derişimdeki anti-TNF- α antibadi aktive yüzeylere bağlanmış ve hazırlanan sensörlerin TNF- α molekülünü bağlama etkinlikleri incelemeye, bağlanma sabitleri hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler : TNF- α , Reflektometrik interferans spektroskopisi, Biyosensör sistemleri.

DEVELOPMENT OF SENSOR BASED ON REFLECTOMETRIC INTERFERENCE SPECTROSCOPY FOR DETERMINATION OF TNF- α

ABSTRACT

In this work, sensor system based on reflectometric interference spectroscopy has been prepared for selective recognition and binding of TNF- α biomolecules. For this purpose, carboxymethyl dextran coated and reflectometric interference spectroscopy based sensor systems have been activated for binding of suitable orientated antibody. Then, anti-TNF- α antibody has been bound on the surface and binding efficiency and binding constants of prepared sensors have been investigated.

Keywords: TNF- α , Reflectometric interference spectroscopy, Biosensor systems.

1. GİRİŞ

Endüstri, çevre mühendisliği ve ilaç alanındaki gelişmeler, her geçen gün yeni metodlar ve yüksek hassasiyet gerektiren yöntemlere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Bu yeni metodlardan birisi de yüksek seçiciliğe sahip sensörlerin kullanılmasıdır (Pearson vd., 2000). Genel anlamda sensörler, kimya, biyoloji, fizik, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanıp moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin birleştirilmesiyle geliştirilen analitik cihazlar olarak tanımlanabilir (Yagiuda vd., 1996, Scheller vd., 2001). Sensörler analiz edilen madde ile

seçimli bir şekilde etkileşime giren aktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu oluşturulur (Wang vd., 1997, Sharma vd., 2003, Jacobs vd., 2010).

Tümör nekrozis faktör- α , (TNF- α), apoptozun yanı sıra hücre regülasyonu, proliferasyonu inflamasyon, bağışıklık, sepsis, şeker hastalığı, kanser, osteoporoz, multiple skleroz, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve vasküler cevaplar da yüksek stimüle edici potansiyeli olan polipeptid yapıda bir sitokindir ve insan hastalıklarının çok geniş bir spekturu-

¹Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü.

munda temel aracı molekül olarak görev alır (Dana vd., 1991; Tiina vd., 2001; Chen ve Goeddel 2002). Tümör nekroz faktör (TNF), birçok hücre tipi tarafından salgılanan ve kanserli hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir (Old 1985). Bu nedenle kanser hastalıklarının tayini ve tedavisi amacıyla üzerinde oldukça yoğun çalışılan bir protein grubudur. Genel olarak TNF- α nın normal hücreler tarafından üretilmediği düşünülmektedir, fakat endoplastik, iltehaplı ve bulaşıcı hastalıklarda istilacılar tarafından tetiklenmesine ihtiyaç duyulur. Bu nedenle makrofaj ve monositlerin bakteriyel, viral ve parazitik organizmalar ve ürünleri karşısında lokal ve sistemik TNF- α cevap oluşturmasının payı olduğu ispatlanmıştır (Mehdi ve ark. 2001).

Proinflamatuvar ajanı olarak pek çok hastalıkta TNF- α miktarı belirteç olarak kullanılmaktadır (Ping vd., 1996). Yıllardır TNF- α nın miktarının belirlenmesi için yapılan biyolojik çalışmalar fare fibroblastlarında sitotoksik ölçümleri içermektedir. Fakat TNF- α nın sahip olduğu pek çok biyolojik özellikler sonucu etkilemekteydi. Bu nedenle gelişmiş bioassay ve immünoassay yöntemlerle bu özellikler hesaba katılabilir hale getirilmiştir. Çeşitli enzim immünoassay yöntemleri pek çok analitin tayini için farklı duyarlılığa sahiptir (Srinivasan vd., 2004). Enzim immünoassay sistemlerinin en önemli uygulaması biotin-streptavidin uygulamalarıdır. Bu sistemin esaslarına dayanarak ELISA metodu geliştirilmiştir. Bu sayede hızlı ve duyarlı ölçümler yapılarak hTNF- α miktarı hücre kültür ortamı gibi vücut sıvılarında saptanabilmektedir (Kittigul vd., 2000; Wanachawanawin vd., 1999). Bu yöntemlerden bir diğeri ise serum örneklerinde TNF- α miktarının saptanması için biotin-streptavidin sistemi kullanılarak (BS-ELISA) bir modifiye sandviç enzim-bağımlı immünosorbent assay dir. Yapılan çalışmalar BS-ELISA yönteminin serum örneklerinde ki TNF- α tayini için çok duyarlı bir yol olduğunu göstermiştir (Kittigul vd., 2000).

Bu çalışmada, canlılar için oldukça önemli olan TNF- α tayini için yeni bir sensör sistemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda çalışma kapsamında geliştirilen TNF- α biyomolekülünü tanıyan reflektometrik interferans spektroskopisi temelli yeni nesil sensör bazlı çalışma biyosensör ve biyoayırma içerikli literatürde hiç yer almamaktadır.

2. DENEYSEL

2.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

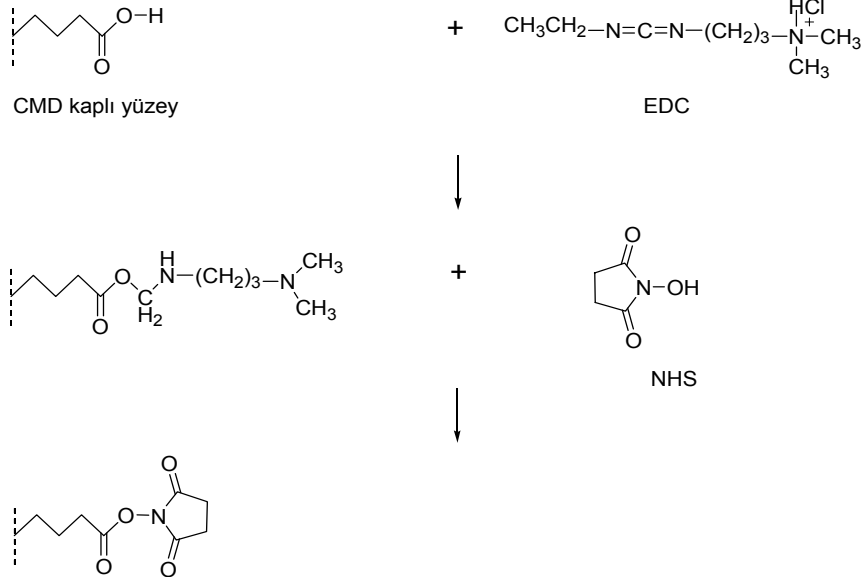
TNF- α , N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid, 0.1 M N-Hidroksisüksinimid Aldrich (Milwaukee, WI, ABD) firmasından temin edilmiştir. Diğer bütün kimyasallar ve biyokimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

pH ölçümleri WTW Series InoLab pH730 model pHmetre ile, fiber optik spektroskopisi ölçümleri Avantes marka, AvaSpec-1024, Eerbeek, Hollanda model spektrofotometre ile, reflektometrik interferans spektroskopisi ölçümleri Analytic Jena marka, Biaffinity, Jena, Almanya model spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. AFM görüntüleri Q-Scope 250, Quesant Instruments, CA, USA cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

2.2 Karboksimetildekstran Kaplı Reflektometrik Sensörlerin NHS/EDC ile Aktivasyonu

Bu amaçla reflektometrik interferans spektroskopisi cihazına uyumlu ve Analytic Jena firmasından satın alınan karboksimetildekstran (CMD) polimer tabakası ile kaplı çipler cihaza takılarak HBS pH:7.4 (HEPES:NaCl:EDTA) tampon sistemi kullanılarak yıkanmış ve 0,1 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 0,1 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) çözeltileri ile aktive edilmiştir (Şekil 1). Sensör yüzeylerinin NHS/EDC ile aktivasyonu sonucunda yüzey morfolojisinin değişmesi ışığın kırınım açısını değiştirdiği için sensorgram sinyalinde artma ile belirlenmiştir. Ayrıca sensör yüzeylerinin NHS/EDC ile aktivasyonundan sonra yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ile incelenmiştir.



Şekil 1. CMD kaplı sensörlerin aktivasyon şeması

2.3 TNF- α İmmunoassay Amacıyla Sensörlere Anti TNF- α -Antibadi Bağlanması

Sensör yüzeyinde uygun geometriye sahip antibadi yönelmesi sağlamak üzere modifiye edilen reflektometrik sensörler yüzeyinden HEPES pH:7,4 tamponunda hazırlanan 10 mgL^{-1} derişimdeki anti TNF- α -antibadi çözeltisi geçirilerek, sensör yüzeylerine TNF- α antibadının bağlanması sağlanmış ve örneklerden TNF- α tayini için sensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan sensör yüzeyleri TNF- α antibadi immobilizasyonundan sonra AFM cihazı ile incelenmiştir.

2.3 Hazırlanan Sensörlerin TNF- α Tayini İçin Kullanılması

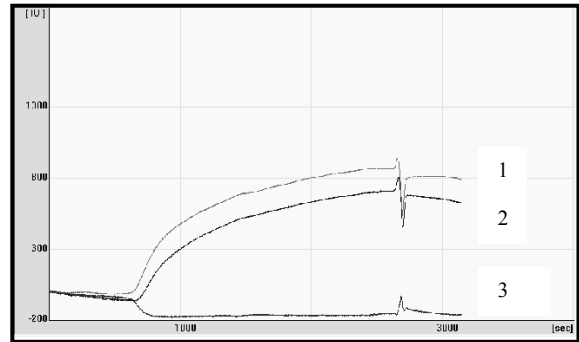
Uygun yönelimli antibadi immobilizasyonu gerçekleştirilmiş karboksimetil dekstran kaplı sensörler BIAffinity cihazı kullanılarak farklı derişimlerde (HEPES pH:7,4 tamponunda hazırlanan $10, 25$ ve 50 ngmL^{-1}) TNF- α çözeltileri ile etkileştirilmiş ve antibadi ile TNF- α molekülü arasında bağlanma incelenmiştir. Glisin-HCl tampon sistemi kullanılarak TNF- α molekülü yüzeyden uzaklaştırılmış ve çip yüzeyi rejenere edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Karboksimetildekstran Kaplı Reflektometrik Sensörlerin NHS/EDC ile Aktivasyonunun İncelenmesi

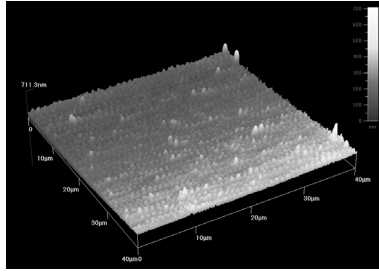
Sensör yüzeylerinin NHS/EDC ile aktivasyonu sonucunda yüzey morfolojisinin değişmesi

ışığın kırınım açısını değiştirdiği için sensorgram sinyalinde artma meydana gelmiştir (Şekil 2). Sensorgramlarda 1 ile belirtilen sinyal, spesifik bağlanmayı, 3 ile verilen sinyal spesifik olmayan bağlanmayı ve 2 ile verilen sinyal aradaki farkı göstermektedir. Sensorgramdaki artış etkileşimin gerçekleştiğinin bir göstergesidir.

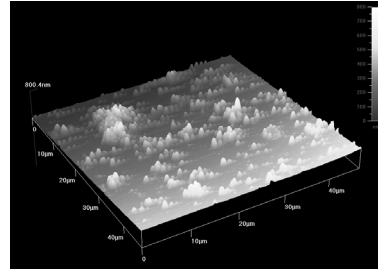


Şekil 2. CMD kaplı sensörlerin aktivasyonuna ait sensorgram

Sensör yüzeylerinin NHS/EDC ile aktivasyonundan sonra yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ile incelenmiştir. Şekil 2 de görüldüğü gibi aktivasyon sonrası sensör yüzeylerinin homojenitesi ve bağlanmadan dolayı yüzey yüksekliği değişmiştir. Bu durum aktivasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.



(a)

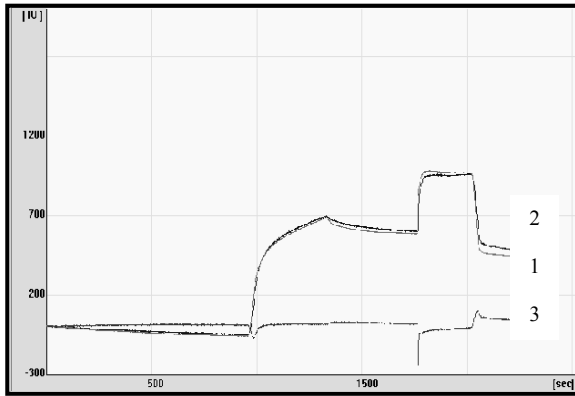


(b)

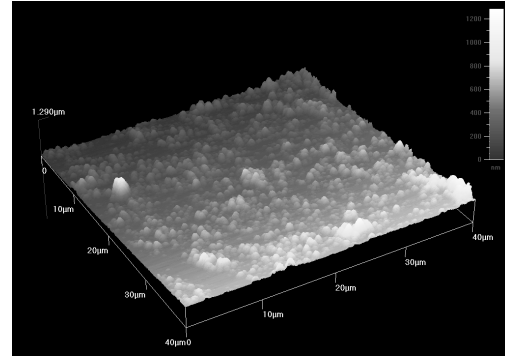
Şekil 3. (a)CMD kaplı sensörlerin aktivasyon öncesi ve (b) aktivasyon sonrası AFM görüntüsü

3.2 Karboksimetildekstran Kaplı Reflektometrik Sensörlere Antibadi İmmobilizasyonunun Belirlenmesi

Yapılan ölçümler sonucunda sensör yüzeylerine bağlanacak uygun antibadi derişimi 10 mgL^{-1} olarak belirlenmiştir. Antibadi bağlanması sonucunda elde edilen sensorgram Şekil 3'de gösterilmiştir. Sensör yüzeyine TNF- α antibadi bağlanması sonucunda sinyalde artış olmuş ve bağlanma bölgelerinin tamamlanmasına kadar artma devam etmiştir.

Şekil 3.3 Aktive edilmiş sensör yüzeylerine 10 mgL^{-1} 'lik anti-TNF- α immobilizasyonuna ait sensorgram

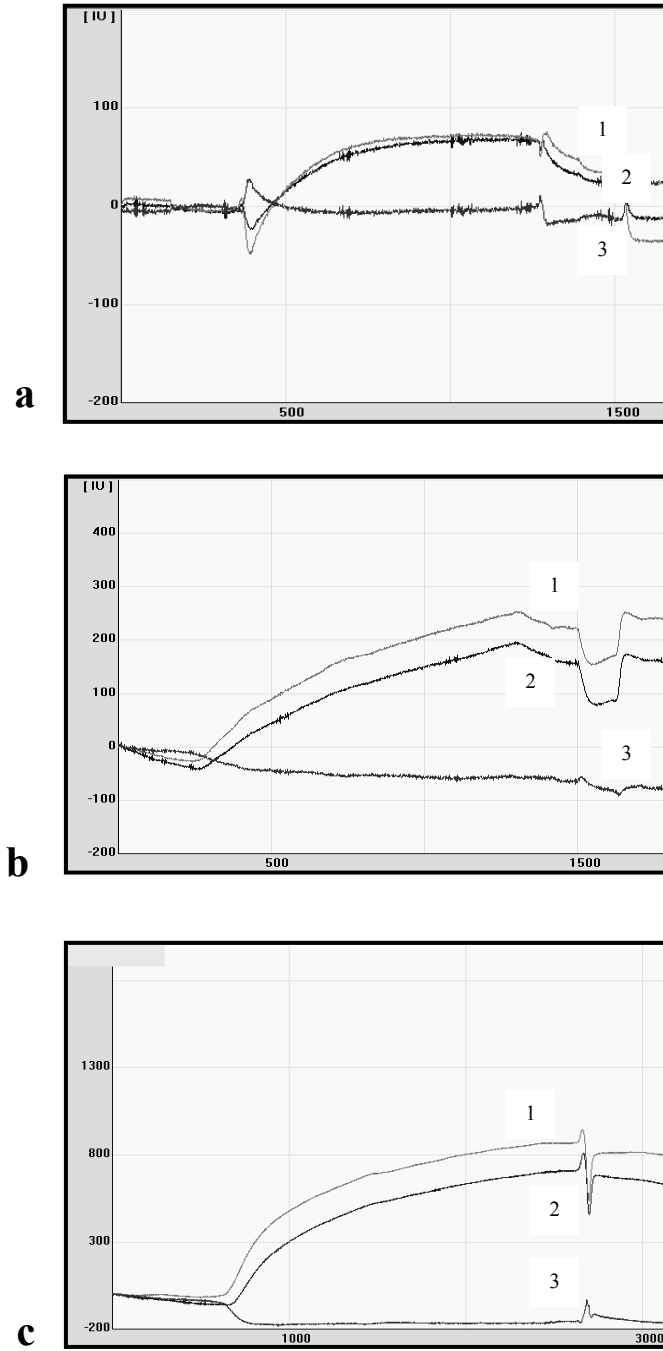
Sensör yüzeylerine 10 mgL^{-1} 'lik anti-TNF- α immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisi AFM ile incelenmiştir. Şekil 4 de görüldüğü gibi immobilizasyon sonrası sensör yüzeylerinin homojenitesi değişmiştir. Ayrıca yüzey yüksekliği $800 \mu\text{m}$ den $1290 \mu\text{m}$ ye artmıştır ki bu da sensör yüzeyine anti-TNF- α immobilizasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir.

Şekil 4. CMD kaplı sensörlerin anti-TNF- α immobilizasyonundan sonra AFM görüntüsü

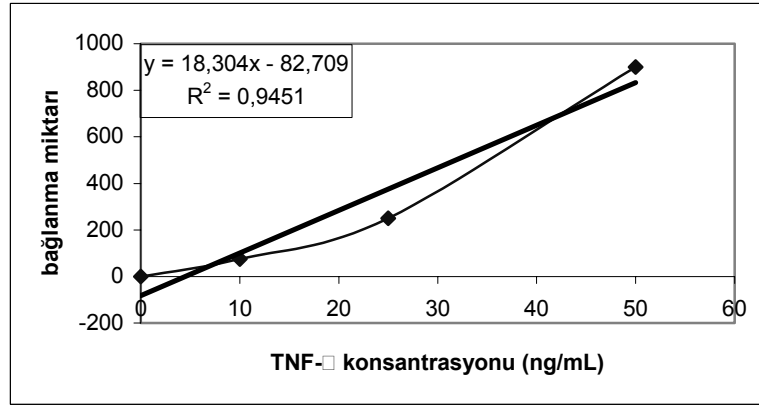
3.3 Antibadi İmmobilize Sensörlerin TNF- α Tayini İçin Kullanılması

HEPES pH:7,4 tamponunda hazırlanan 10 , 25 ve 50 ngmL^{-1} derişimdeki TNF- α çözeltilerinin sensör yüzeyinden geçirilmesinden sonra elde edilen sensorgramlar Şekil 5'de verilmiştir. Sensorgramlardan da görüldüğü gibi artan TNF- α derişimi ile bağlanma sinyalinde de artış olmuştur.

Derişim ve sinyaldeki artış arasındaki ilişkiyi yararlanılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş hazırlanan sensör sistemlerinin TNF- α tayinin de kullanılabilirlikleri ve bağlanma sabitleri belirlenmiştir (Şekil 6). Deneyler üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95 tutulmuştur.



Şekil 5. 10 ngmL^{-1} (a), 25 ngmL^{-1} (b) ve 50 ngmL^{-1} (c) için TNF- α bağlanmasına ait sensorgram



Şekil 6. TNF-α için kalibrasyon grafiği

Sensör yüzeyi ve TNF-α arasındaki bağlanma etkileşimleri Langmuir adsorpsiyon izotermi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla Eşitlik 1.1'de verilen Langmuir adsorpsiyon denklemi kullanılmıştır.

$$\frac{1}{R_{denge}} = \frac{1}{R_{maks} K_A} \frac{1}{C} + \frac{1}{R_{maks}} \quad (1.1)$$

Bu eşitlikte;

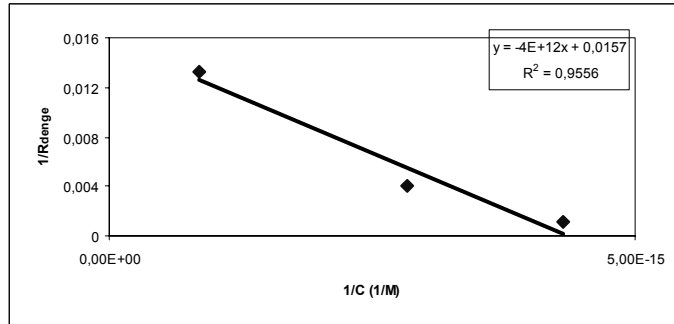
R_{denge} : TNF-α enjeksiyonundan sonra sinyal

C : TNF-α derişimi

R_{maks} : Sonsuz TNF-α derişimindeki denge sinyali

K_A : Afinite sabiti

Şekil 3.7'de verilen Langmuir grafiği kullanılarak anti-TNF-α immobilize edilmiş sensörün TNF-α bağlanması için afinite sabiti (K_A) $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur



Şekil 7. TNF-α tayini için Langmuir grafiği

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen çalışmada, biyolojik olarak oldukça önemli bir biyokimyasal olan TNF-α'nın tayin ve teşhisine yönelik reflektometrik interferans spektroskopisi temelli sistemler geliştirilmiştir. Reflektometrik interferans spektroskopisinin sensör yüzeyi NHS/EDC ile aktive edilmiş ve anti-TNF-α antibadi sensör yüzeyine immobilize edilmiştir. Elde edilen pikler immobilizasyonun düzgün bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sonuç anti-TNF-α'nın bağlanma bölgesi aktif olarak etkileşime gire-

bileceğini göstermiştir. Reflektometrik interferans spektroskopisinin anti-TNF-α immobilize edilmiş sensör yüzeyinden farklı derişimlerdeki TNF-α çözeltileri geçirildiğinde, birbirleriyle olan etkileşimleri sonucu meydana gelen pik, anti-TNF-α'nın etkinliğini koruduğunu ve anti-jen bağlama bölgesi ile TNF-α'yı doğal reseptörlere yakın bir bağlanma sabiti ile ($2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) bağladığını göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Anadolu Üniversitesi Proje Birimi tarafından kabul edilen "07 10 11 nolu" proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Chen, G. ve Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Tularik Inc.* 296, 1634-1635.
- Dana, L.D. ve Russell, C.J. (1991). In Vitro and In Vivo Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha by *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 60(3) 1109-1113.
- Jacobs, C.B., Peairs, M.J. ve Venton, B.J. (2010). Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Analytica Chimica Acta* 662, (2, 10), 105-127.
- Kittigul, L., Temprom, W., Sujirarat, D. ve Kittigul, C. (2000). A modified sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using biotin-streptavidin system (BS-ELISA) was developed to determine levels of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Virological Methods* 90, 51-57.
- Mehdi, H., Razieh, Y., ve Fereidoun, A. (2001). Determination of Human Tumor Necrosis Factor a by a Highly Sensitive Enzyme Immunoassay. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 295-298.
- Old, L.J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230 630-632.
- Pearson, J.E., Gill, A. ve Vadgama, P. (2000). Analytical aspects of biosensors. *Ann. Clin. Biochem.* 37 119-145.
- Ping, T., Mien-Chie, H. and Jim, K. (1996). Human pro-Tumor Necrosis Factor is a Homotrimer. *Biochemistry* 35, 8216-8225.
- Scheller, F.W., Wollenberger, U., Warsinke, A. and Lisdat, F. (2001). Research and development in biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* 12 35-40.
- Sharma, S.K., Sehgal, N. ve Kumar, A. (2003). Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics* 3(2-3), 307-316.
- Srinivasan, N. and Kilburn, J.D. (2004). Combinatorial approaches to synthetic receptors. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 305-310.
- Tiina, S., Olli, C., Marja-Liisa, K., Anders, P., Ursula, T., Markku, K. ve Perttu, J.L. (2001). Evolution of Cerebral Tumor Necrosis Factor-a Production During Human Ischemic Stroke. *Stroke* 32, 1750-1758.
- Yagiuda, K., Hemmi, A. ve Ito, S. ve ark. (1996). Development of a conductivity-based immunosensor for sensitive detection of methamphetamine (stimulant drug) in human urine. *Biosens Bioelectron* 11, 703-707.
- Wanachiwanawin, W., Wiener, E., Siripanyaphinyo, U., Chinprasertsuk, S., Mawas, F., Fucharoen, S., Wickramasinghe, S.N., Pootrakul, P. ve Visudhiphan, S. (1999). Serum Levels of Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin-1, and Interferon-gamma in beta-Thalassemia/HbE and Their Clinical Significance. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 19, 105-111.
- Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandez, J.R., Grant, D., Ozsoz, M., Begleiter, A. ve Mowat, M. (1997). Mismatch sensitive hybridization detection by PNA immobilized on QCM. *Anal. Chem.* 69, 5200-5202.

