

ÖZET

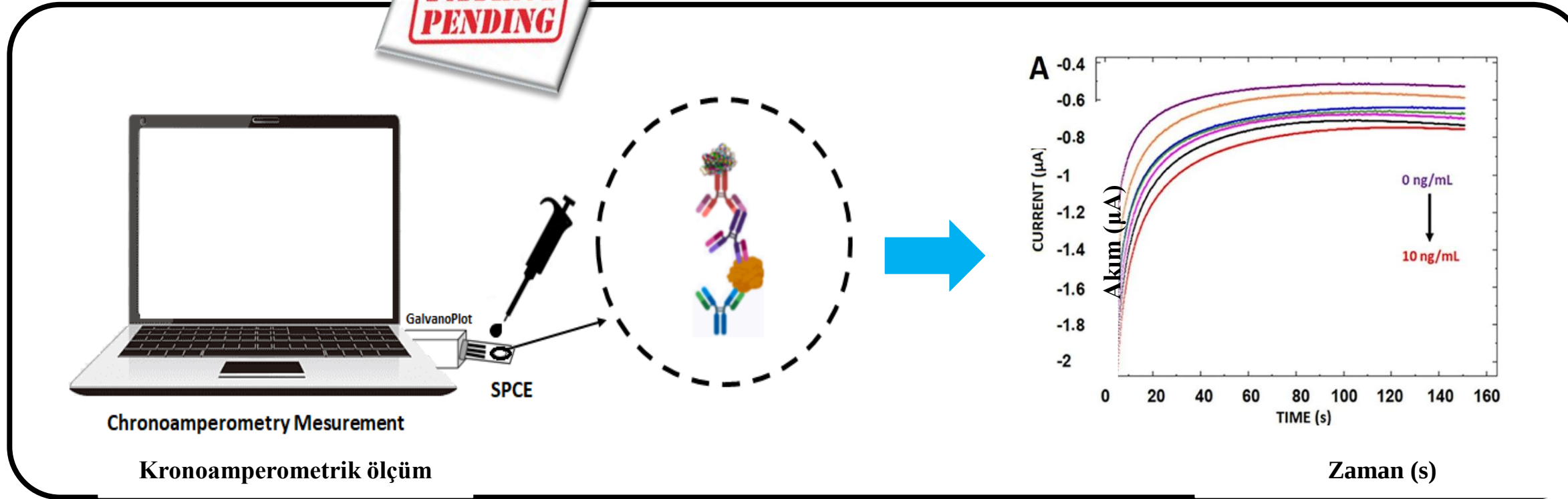
COVID-19 pandemisinin başlangıcından itibaren dünya çapında hızla yayılarak küresel sağlık tehditlerine yol açan SARS-CoV-2 virüsünün tespiti büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda [1], SARS-CoV-2 tespiti için taşınabilir ve hasta başı analizlerinde kullanılabilir, hızlı ve hassas sonuçları verebilecek bir elektrokimyasal immünosensör geliştirilmesi hedeflenmiştir. S1 proteinine özgü geliştirilen immünosensör teknolojisiyle, enzimatik temelli yöntem kullanılarak sadece 10 µL örnekle yapılan amperometrik ölçümlerle, 6 dakika içinde sonuç verebilen hızlı ve güvenilir bir analiz sistemi geliştirilmiştir. Projemizde herhangi bir nanomalzeme kullanılmadan, düşük maliyetli ve yüksek seçiciliğe sahip bir COVID-19 teşhis yöntemi sunulmuş olup geliştirilen sistem, özellikle sahada ve acil durumlarda kullanılabilir özelliktedir; böylece, COVID-19 tanısında erken teşhis ve hızlı izolasyon imkanları sunarak, küresel sağlık güvenliğine katkıda bulunması beklenmektedir.

AMAÇ

Projemizde;

- COVID-19'un hızlı ve doğru teşhis edilmesi, SARS-CoV-2 virüsünün S1 proteininin tayini COVID-19 teşhisi,
- Hızlı, hassas ve seçici antijen test kitlerinin geliştirilmesi,
- Amperometrik immünosensör geliştirilerek taşınabilir ve minyatürize edilmiş bir potansiyostata entegre edilmesi,
- Taşınabilir potansiyostat ile yapılan analizlerde, hassas ve seçici S1 proteini tayini
- Geliştirilen sistemin hasta başı analizlerde uygulanabilirliğinin araştırılması,
- Düşük maliyetli, hızlı ve kullanıcı dostu bir çözüm sunulması,
- Geliştirilen yöntemin farklı hedef analitlerin tespiti ne yönelik uyarlanabilir olması,
- Gelecekte olası salgın hastalıklar için hızlı tanı sistemlerin geliştirilmesine yönelik uygulanabilir olması hedeflenmiştir.

YÖNTEM, MATERYAL VE METOT



Şekil 1. SARS-CoV-2 S1 Proteininin tespitine yönelik geliştirilen amperometrik immünosensörün taşınabilir potansiyostat cihaza entegrasyonu ve analizin gerçekleştirilmesi.

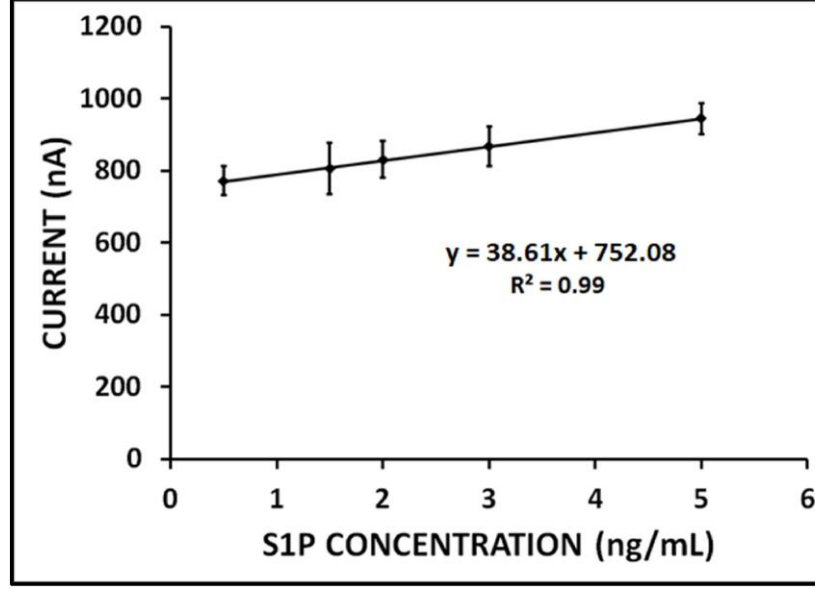
SARS-CoV-2 S1 proteininin spesifik ve hassas tespiti için tek kullanımlık perde baskılı karbon elektroda (SPCE) dayalı bir amperometrik immünosensör geliştirilmiştir (Şekil 1).

- Anti-SARS-CoV-2 S1 monoklonal antikor (Cab) ilk olarak elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Daha sonra sırasıyla S1 proteini, ikincil antikor (dAb) ve HRP-IgG eklenerek sandviç kompleksi oluşturulmuştur.
- Kronoamperometri ölçümleri TMB aracı varlığında yapılmış ve SARS-CoV-2 S1 proteininin tespiti 10 µL örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Projemizde geliştirilen immünosensör teknolojisi, taşınabilir özellikte minyatürize edilmiş bir potansiyostata (Galvanoplot, Türkiye) entegre edilerek hasta başı analizlerde uygulanabilir hale getirilmiştir.

SONUÇLAR

Tablo 1. S1 proteininin tespiti için amperometrik immünosensörün optimizasyonunda incelenen deneysel parametreler ve optimum deneysel koşullar.

Parametreler	Çalışılan Aralık	Seçilen değer
CAb konsantrasyonu (µg/mL)	0,25-2-4-6-8-10	6
BSA konsantrasyonu (%)	0,2-0,6-1-2	1
Antijen inkübasyon süresi (dk)	30-60-90	60
dAb konsantrasyonu (µg/mL)	0,25-0,5-1-1,5-2	0,5
dAb inkübasyon süresi (dk)	30-45-60	60
HRP-IgG konsantrasyonu (µg/mL)	0,2-0,5-1-2-4	0,5
HRP-IgG inkübasyon süresi (dk)	15-30	30
Antijen inkübasyon sıcaklığı	Oda sıcaklığı-37 °C	37 °C



Şekil 2. Taşınabilir potansiyostata entegre immünosensör ile yapay tükürük ortamında SARS-CoV-2 S1 proteininin (S1P) amperometrik tayinine yönelik kalibrasyon grafiği.

Optimize koşullar altında (Tablo 1);

- Tampon ortamında 0,5–10 ng/mL S1 protein konsantrasyon aralığında tayin sınırı 0,19 ng/mL (24,7 amol, 10 µL örnekte); yapay tükürük ortamında 0,5 – 3 ng/mL konsantrasyon aralığında tayin sınırı 0,13 ng/mL (16,9 amol, 10 µL örnekte) olarak hesaplanmıştır.
- S1 proteine spesifik immünosensörün seçicilik çalışması, COVID-19 ile benzer semptomlara sahip olan Influenza biyobelirteci olan hemaglutinin antijeni kullanılarak yapılmış ve seçicilik gösterdiği rapor edilmiştir.
- Taşınabilir sistemle yapılan analizlerde, yapay tükürük ortamında 0,5–5 ng/mL konsantrasyon aralığında 0,15 ng/mL (19,5 amol, 10 µL örnekte) tayin sınırına ulaşılmıştır (Şekil 2). Ayrıca, hemaglutinin (HA) antijenine karşı yapılan seçicilik çalışmaları yüksek özgüllüğünü doğrulamıştır.
- Elde edilen bu sonuçlar, taşınabilir cihazın klinik ve sahada kullanım potansiyelini açıkça ortaya koymuştur. Proje kapsamında bilinen mevcut tekniklere göre; immünosensör hazırlığını takiben analizlerin çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilebildiği (analiz süresi 6 dk), hasta başı analizlere uygulanabilir, maliyeti uygun, ayrıca herhangi bir nanomalzeme kullanılmamasına gerek kalmadan hassas ve seçimli bir COVID-19 teşhis yöntemi kullan-at immünosensör teknolojisi kullanılarak geliştirilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

COVID-19 tanısına yönelik geliştirilen immünosensör teknolojisi, nanomalzeme kullanımına gerek duymadan, hasta başı tanı kitlerine uygulanabilir, maliyet açısından uygun, hızlı, seçimli ve hassas bir prosedür sunmaktadır. İmmünosensör hazırlığını takiben analizlerin çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilebildiği (analiz süresi sadece 6 dk) yöntem, ayrıca daha düşük tayin sınırına sahip olması sayesinde erken dönemde hastalık teşhisi yapabilmektedir. Geliştirilen immünosensör teknolojisi, analizlerin klinik örneklerin test merkezlerine gönderilmesi gibi zaman alıcı süreçlere sahip olmadan, uzman personel gerektirmeksizin ve yüksek maliyetli cihazlar kullanmadan çalışabilmektedir. Bu sayede tanı kitine dönüştürüldüğünde, hasta başı kullanıma uygun olup, pozitif vakaların hızlıca izolasyonu sağlanabilir. Taşınabilir potansiyostata entegre edilebilen bu immünosensör, geniş ölçekte üretililecek yapısı ile hedeflenen sektörlerde yerli ve milli bir tanı kiti olarak kullanılabilir. Yapay tükürük örnekleri kullanılarak yapılan analizlerin invaziv olmayan bir yöntem sunması, hasta konforunu artırmakta ve uyuncu önemli ölçüde iyileştirmektedir.

TÜBİTAK 1005 - Ulusal Yeni Fikirler ve Ürünler Araştırma Destek Programı destekli "COVID-19 Tanısına Yönelik Elektrokimyasal Biyosensörlerin Geliştirilmesi: COVID-19 ImmunoSens" başlıklı 120S419 no'lu TÜBİTAK 1005 projesi, 2021 yılı sonunda tarihinde tamamlanmış olup, ilgili projenin çıktılarından biri olarak "Amperometric immunosensor developed for sensitive detection of SARS-CoV-2 spike S1 protein in combined with portable device" [1] başlıklı yayın Q1 dilimde ve Etki faktörü 5,6 olan "ELSEVIER" bünyesindeki SCI-Expanded dergi olan "TALANTA" dergisinde 29.03.2022 tarihinde yayınlanmıştır (DOI: doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123422). Ayrıca projede elde edilen çıktılara yönelik ulusal patent başvurusu, 2022/001386 başvuru numarasıyla [2] Türk Patent Kurumu nezdinde yapılmıştır.

A.E, Proje Araştırmacı olarak Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK, Türkiye) (Proje No. 120S419, 1005 Ulusal Yeni Fikirler ve Yeni Ürünler Araştırma Destek Programı) finansal desteğine teşekkür eder ve ayrıca desteği için Türkiye Bilimler Akademisi'ne (TÜBA, Türkiye) Asli üye olarak teşekkürlerini sunar. H.S, E.Y ve M.M TÜBİTAK tarafından sağlanan proje bursuna (Proje No. 120S419) teşekkür eder.

Kaynaklar

1. Erdem, A., Senturk, H., Yildiz, E., & Maral, M. (2022). Amperometric immunosensor developed for sensitive detection of SARS-CoV-2 spike S1 protein in combined with portable device. Talanta, 244, 123422. (DOI: doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123422).
2. Ulusal patent başvurusu (Patent başvuru no: 2022/001386, Başvuru tarihi: 03.02.2022).