

ELECTROCHEMICAL DETECTION OF QUANTUM DOTS USED AS A TOOL FOR LABELLING INFLUENZA DERIVED OLIGONUCLEOTIDE

ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE KVANTOVÝCH TEČEK POUŽITÝCH JAKO NÁSTROJ PRO ZNAČENÍ SPECIFICKÉHO CHRÍPKOVÉHO OLIGONUKLEOTIDU

Krejčová L.¹, Hynek D.^{1,2}, Kopel P.^{1,2}, Adam V.^{1,2}, Hubálek J.^{2,3}, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

³Department of Microelectronics, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: lidakrejцова@seznam.cz

ABSTRACT

The aim of this study was designed hybridization assay consisting of probe modified magnetic particles (MPs) and specific oligonucleotide labeled by quantum dots (QDs), and their application in the detection of avian influenza virus (H5N1) respectively influenza derived oligonucleotide (ODN). There were two basic steps used in the assay: (i) isolation of specific oligonucleotide (target) by anti-sense bounded MPs and (ii) target detection by QDs marker. It was optimized the efficiency of hybridization temperatures between anti senses and target influenza oligonucleotide. QDs labeled target was detected by electrochemical analysis. Our results show that MPs based automatic isolation together with electrochemical detection is available tool for influenza detection.

Key words: voltammetry, quantum dots, influenza, oligonucleotide, nanoparticles, automatic isolation hybridization assay, electrochemistry

Acknowledgments: Financial support from the projects NANIMEL GA CR 102/08/1546 IGA TP 6/2012 and CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 is gratefully acknowledged.

ÚVOD

Chřipka je infekční onemocnění způsobené RNA viry z čeledi Orthomyxoviridae. Chřipkové viry způsobují akutní infekční onemocnění horních cest dýchacích (Osterholm a Henderson, 2012, Peiris, a kol., 2012) a šíří se kapénkovou infekcí v sezónních epidemiích. Vakcína proti chřipce existuje, ale nechrání očkováného jedince po celý život, je účinná pouze jeden rok a to díky mutačním změnám, které změně strukturu viru během jednoho roku tak, že použití stejné vakcíny i následující rok by bylo neúčinné (Feng, a kol., 2011, Ghendon, 1994). Chřipkové viry (respektive jejich povrchové antigeny) velmi snadno podléhají mutačním změnám prostřednictvím antigenního driftu a shiftu. Díky těmto změnám může snadno dojít k vytvoření nového chřipkového subtypu jako v případě varianty H5N1 (HPAI - highly pathogenic avian influenza). Extrémně nakažlivá a nebezpečná onemocnění, mezi které HPAI bezpochyby patří, vyžadují neustálý vývoj rychlejších a spolehlivějších metod detekce (Fouchier, a kol., 2012, Karlas, a kol., 2010, Peiris, a kol., 2012).

Pro izolaci cílové DNA jsou často využívány hybridizační testy (založené na hybridizaci sonda + cílová molekula DNA), které pro izolaci DNA používají sondou modifikované magnetické částice (MPs) (Elghanian, a kol., 1997, Katz a Willner, 2004). MPs jsou považované za vhodný nástroj pro izolaci cílové DNA (Ahmed, a kol., 1992, Ossendorp, a kol., 1989, Xu, a kol., 2003). Výhodou magnetické izolace je možnost modifikovat povrch MPs a tím snížit adsorbci interferujících látek z matrice vzorku (Drbohlavova, a kol., 2009, Hsing, a kol., 2007).

Pro detekci DNA se často využívá vazby dvou afinitních látek, např.: biotin-avidin, protein (substrát)-enzyme, antigen-protilátka. Další možností detekce je použití fluorescenční značky nebo jiných opticky aktivních látek jako jsou kvantové tečky (QDs) (Hicks, 1984, Lim, a kol., 2009). QDs jsou stále častěji využívány jako fluorescenční značky k detekci cílových molekul a to díky svým unikátním optickým vlastnostem a širokému spektru použití (Agrawal, a kol., 2007, Bakalova, a kol., 2005, Peterson, a kol., 2001, Ryvolova, a kol., 2011, Steel, a kol., 2000). Pro naši aplikaci nebyly důležité optické vlastnosti QDs, ale elektroaktivita jejich kovové části. Elektroaktivitu nevykazují pouze kovy, ale i některé látky biologického původu, mezi tyto látky patří i DNA. K detekci cílové molekuly (QDs značeného chřipkového oligonukleotidu) byla vybrána elektrochemická analýza. Byly použity dvě voltametrické metody. Pro stanovení kovové části QDs byla vybrána metoda diferenční pulsní voltametrie (DPV) (Bruland, 1992, Manivannan, a kol., 2004). Pro stanovení chřipkového oligonukleotidu byla vybrána metoda square wave voltametrie (SWV).

Detekce DNA je důležitou součástí diagnostiky virových, bakteriálních a geneticky vázaných onemocnění (Wang, a kol., 2003). V současné době je právě elektrochemie považována za jednu z

nejcitlivějších metod pro detekci nukleových kyselin. Přímá detekce DNA je mnohem méně efektivnější než detekce DNA značené pomocí QDs (Drbohlavova, a kol., 2009). Využití elektrochemického značení pro citlivější detekci otevírá nové možnosti pro diagnostiku DNA a pro bioanalýzu obecně (Wang, a kol., 2003).

Cílem naší studie byla izolace a detekce SH značeného specifického chřipkového oligonukleotidu pomocí CdS kvantových teček.

MATERIÁL A METODIKA

1. Příprava CdS kvantových teček

Chemikálie a oligonukleotidy, které jsou popsány ve studii byly objednány od firmy Sigma – Aldrich (St.Louis, USA). CdS QDs byly připraveny podle modifikované metody (Li, a kol., 2007). Dusičnan kademnatý $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.03085 g, 0.1 mM) byl rozpuštěn v ACS vodě (25 ml). 3-merkaptopropionová kyselina (35 μl , 0,4 mM) byla za stálého míchání postupně přidávána do roztoku. Poté bylo pH upraveno na 9.11 pomocí 1M NH_3 (1.5 ml). Sulfid sodný $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,02402 g, 0,1 mM) byl rozpuštěn ve 23 ml ACS vody a potom byl přiléván do prvního roztoku za stálého míchání. Získaly jsme žlutý roztok CdS QDs, který byl skladován v temnu při teplotě 4 °C.

2. Příprava CdS značeného chřipkového oligonukleotidu (ODN-SH-Cd)

ODN-SH H5N1 5'-Th CTTCTTCTCTCTCCTTGAGG -3' (100 μl , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) byl smíchán s roztokem CdS QDs (100 μl). Směs obou roztoků byla míchána po dobu 24 h při pokojové teplotě (Vortex Genie2 (Scientific Industries, USA)). Následně byl roztok dialyzován proti 2000 ml milíQ vody (24 h, 4 °C) na membránovém filtru Millipore 0.025 μm VSWP. Během dialýzy byl roztok zředěn na objem 800 μl . Zředěný roztok byl následně zakoncentrován na 500 μl finálního objemu s využitím odstředivého filtračního zařízení Amicon Ultra 3k (Millipore). Nakonec byl vzorek centrifugován (5417R (Eppendorf, Německo)) s následujícími podmínkami 15 min, 4500 rpm, 15 °C.

3. Automatická izolace ODN-SH-Cd

Pro izolaci chřipkového oligonukleotidu byla použita automatická pipetovací stanice EP motion 5075 (Eppendorf, Německo) s originálním vybavením.

V izolačním procesu byly použity tyto pufrы: fosfátový pufr I: 0,1 M NaCl + 0,05 M Na_2HPO_4 + 0,05 M NaH_2PO_4 ; fosfátový pufr II: 0,2 M NaCl + 0,1 M Na_2HPO_4 + 0,1 M NaH_2PO_4 ; hybridizační roztok: 100 mM Na_2HPO_4 + 100 mM NaH_2PO_4 , 0,5 M NaCl, 0,6 M Guanidium thiocyanát, 0,15 M Trizma. pH tohoto roztoku bylo upravené pomocí HCl na hodnotu 7,5.

Postup izolace byl následující: 10 μl magnetických částic Dynabeads Oligo dT₂₅ (Invitrogen, Norsko) bylo napipetováno do jamek v mikrodestičce (PCR 96, Eppendorf, Německo). Destička byla přenesena na magnet a byl odpipetován uchovávací roztok z částic. Poté byly částice třikrát promyty 20 μl fosfátového pufru I. Po promytí částic následovala první hybridizace. 10 μl poly A

modifikovaného anti sense H5N1 oligonucleotidu a 10 μ l hybridizačního pufru bylo napipetováno do jamek v destičce a směs byla inkubována (15 min, 25 °C, pipetování). Následovalo trojitě promytí 20 μ l fosfátovým pufrům I a potom druhá hybridizace: 10 μ l kadmíem značeného H5N1 oligonukleotidu a 10 μ l hybridizačního pufru bylo přidáno do jamek a směs byla opět inkubována (15 min, 25 °C, pipetting), následovalo trojnásobné promytí 20 μ l fosfátového pufru I. V posledním kroku bylo do jamek přidáno 30 μ l elučního roztoku (fosfátový pufr II) a směs byla inkubována (5 min, 85 °C). Po eluci (uvolnění cílové molekuly od magnetických částic) byla destička přenesena na magnet a eluční produkt z každé jamky byl přenesen do nové jamky. Tento postup byl navržen v souladu s našimi předchozími publikacemi (Adam, a kol., 2010, Huska, a kol., 2009, Janicek, a kol., 2010).

4. Metody pro detekci CA a Cd píku (ODN-SH-Cd)

Všechna měření byla provedena v elektrochemické cele ve standardním tříelektrodevém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita rtuťová (HMDE) elektroda, jako referenční argentchloridová (Ag/AgCl/3M KCl) elektroda a jako pomocná uhlíková elektroda. Měření probíhalo v prostředí acetátového pufru (0,2 M CH_3COOH + 0,2 M CH_3COONa (pH 5.0)) a při teplotě 25 °C. Před každým měřením byly vzorky probublány pomocí argonu (99,99%, 120 s). K elektrochemické detekci byla použita následující zařízení: 663 VA Stand, 800 Dosino, 846 Dosing Interface (Metrohm, Švýcarsko) a výsledky byly zpracovány pomocí softwaru GPES.

K detekci CA píku byla použita metoda square wave voltametrie (SWV) s následujícími parametry: počáteční potenciál 0 V; koncový potenciál -1,85 V; frekvence 10 Hz; potenciálový krok 0,005 V; amplituda 0,025 V.

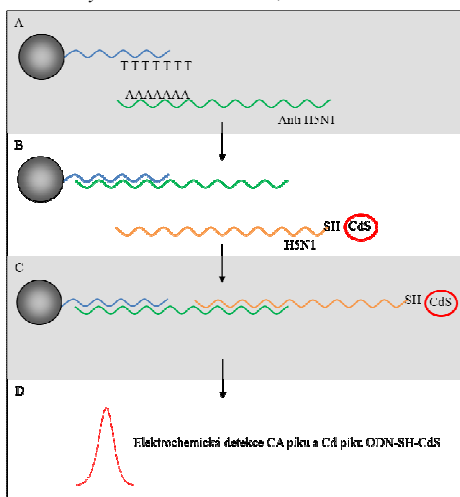
Pro elektrochemickou detekci Cd píku byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV). Parametry detekce byly následující: počáteční potenciál -0,9 V; koncový potenciál -0,45 V; depoziční potenciál -0,9 V; délka depozice 240 s; equilibrační čas 5 s; modulační čas 0,06; časový interval 0,2 s; potenciálový krok 0,002 V; modulační amplituda 0,025.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla navržena a popsána metoda založená na izolaci a detekci specifické DNA značené kvantovými tečkami (CdS). K izolaci DNA byly použity magnetické částice, jejichž povrch byl modifikován sondou (anti sense řetězec). Tato metoda byla aplikována pro izolaci a detekci subtypu ptačí chřipky (H5N1 chřipkového oligonukleotidu). Hybridizační komplex se skládal ze čtyř kroků: (i) vazba poly T modifikovaných MPů s poly A modifikovanou sondou (anti-sense oligonukleotid), vazba mezi MPů a sondou byla vytvořena díky komplementaritě T a A bází, (ii) CdS QDs značení cílového oligonukleotidu, (iii) zachycení CdS značeného chřipkového oligonukleotidu, a (iiii) elektrochemické detekce kovové části QDs pomocí DPV a elektrochemická detekce chřipkového oligonukleotidu (Obr. 1).

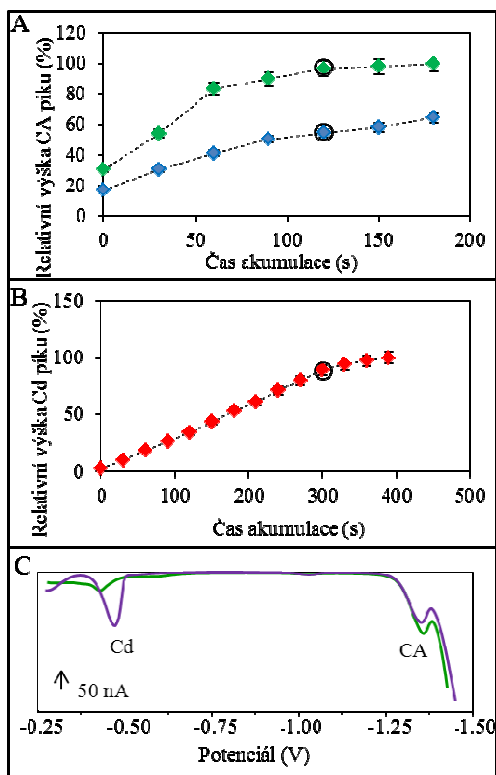
Příprava CdS kvantových teček (Cd QDs) byla prvním krokem experimentální části. Dalším krokem bylo označení chřípkového oligonukleotidu pomocí QDs (CdS). Posledním krokem byla plně automatizovaná metoda izolace spojená s elektrochemickou detekcí chřípkového oligonukleotidu (ODN-SH-Cd).

Obrázek č.1: Schéma izolace a detekce H5N1 oligonukleotidu (ODN-SH-CdS). A – vazba Anti H5N1 řetězce (sonda) na magnetické částice díky A-T komplementaritě, B + C – vazba ODN-SH-Cd na magnetické částice na které byl navázán Anti H5N1, D – elektrochemická detekce ODN a Cd.

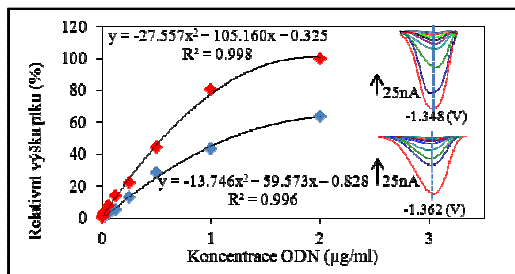


Pro detekci ODN-SH-Cd byla vybrána elektrochemická analýza. Pro studium tohoto komplexu byly použity dvě voltametrické metody. Pro kadmium (Cd pík) byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV) a pro detekci oligonukleotidu square wave voltametrie (SWV). Pro obě metody byl optimalizován čas akumulace (CA pík 120s, Cd pík 300s) (Obrázek č.2). Následovalo stanovení limitu detekce pro CA pík (0.0019 $\mu\text{g/ml}$ ODN-SH-Cd) (Obrázek č.3) a Cd pík (0.0157 $\mu\text{g/ml}$ ODN-SH-Cd) (Obrázek č.4).

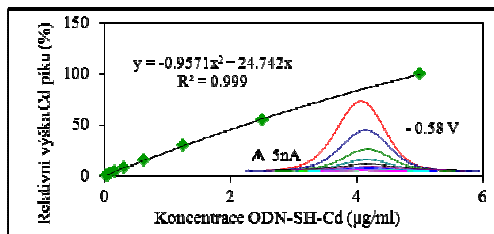
Obrázek č.2: Část A: Optimalizace času akumulace (s) pro CA pík ODN-SH (♦) a ODN-SH-Cd (♦). Část B: Optimalizace času akumulace (s) pro Cd pík ODN-SH-Cd (♦); koncentrace obou ODN byla 2µg/ml. Pro detekci CA píku byla použita metoda SWV, pro detekci Cd píku DPV. Část C: Porovnání reálných voltamogramů ODN-SH (-) a ODN-SH-Cd (-).



Obrázek č.3: Limit detekce pro CA pík (♦) ODN-SH a (◆) ODN-SH-Cd. Počáteční koncentrace obou ODN byla 2μg/ml.



Obrázek č.4: Limit detekce pro Cd pík (◆)ODN-SH-Cd. Počáteční koncentrace ODN byla 2μg/ml.

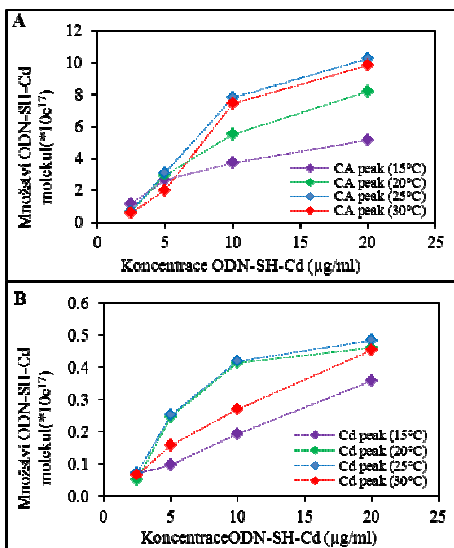


Electrochemická charakterizace oligonukleotidu (ODN-SH) a značeného oligonukleotidu (ODN-SH-Cd) (Obrázek č.2, Část C) prokázala značné rozdíly mezi voltamogramy. Na ODN-SH voltamogramu můžeme pozorovat jen jeden pík - CA pík (potenciál: -1.348 ± 0.002 V). Na ODN-SH-Cd voltamogramu můžeme pozorovat dva píky. První pík odpovídá kadmii (Cd pík - potenciál: -0.58 ± 0.005 V) a druhý, odpovídající nukleové kyselině - CA pík (potenciál: -1.362 ± 0.002 V). Byl pozorován rozdíl mezi CA píkem značeného i neznačeného oligonukleotidu. ODN bez QDs vykazuje větší a užší CA pík, než je tomu u značeného ODN. Také pozice CA píku se lišila (QDs značený ODN: -1.362 V, neznačený ODN: -1.348 V) (Obrázek č.3). Jediný rozdíl mezi oligonukleotidy spočíval ve vazbě CdS na 5' SH značený konec ODN. Z toho vyplývá, že změna signálu CA píku musí být způsobena vazbou CdS, ale tento jev zatím není zcela vysvětlen.

Hybridizační proces je ovlivněn řadou podmínek, jako teplota, čas, míchání, pH a složení hybridizačního pufru. Naším cílem byla optimalizace teploty hybridizační reakce. Hybridizační reakce byla celkem čtyřikrát opakována a to při těchto teplotách: 15 °C; 20 °C; 25 °C and 30 °C (Obrázek č. 5). Jako nejefektivnější byla vybrána teplota 25 °C. Tato teplota byla mnohem

efektivnější, než teplota 30 °C, a to z důvodu toho, že teplota tání (T_m) chřípkového oligonukleotidu byla 28°C.

Obrázek č.5: Část A: Detekce množství ODN-SH-Cd molekul ($*10e^{17}$) jako funkce počáteční koncentrace ODN-SH-Cd ($\mu\text{g/ml}$) před hybridizací vztahené k CA píku. Část B: Množství ODN-SH-Cd molekul ($*10e^{17}$) jako funkce koncentrace ODN-SH-Cd ($\mu\text{g/ml}$) vztahené k Cd píku.



Sledovaným parametrem a indikátorem této optimalizace byly výška CA a Cd píku. Se stoupající teplotou (do 25 °C) roste účinnost hybridizace cílové molekuly (ODN-SH-Cd) a díky tomu i výška CA a Cd píku. Větší citlivost na teplotní změny během hybridizace vykazuje detekované kadmium z QDs značky než samotný oligonukleotid. Značení cílových molekul pomocí kvantových teček ve spojení s izolací pomocí MPs představuje unikátní a citlivý analytický nástroj.

ZÁVĚR

Byla navržena a optimalizována metoda pro izolaci kadmíem značeného chřípkového oligonukleotidu s využitím automatické pipetovací stanice. Byl pozorován účinek hybridizační teploty (druhá hybridizace) na výšku detekovaného CA a Cd píku. S rostoucí teplotou se zvyšovala účinnost hybridizace a tím i výška CA a Cd píku. Nárůst výšek obou píků byl pozorován pouze do teploty tání hybridizovaného oligonukleotidu, jejíž hodnota byla v našem případě 28°C. Navržený a optimalizovaný postup, založený na izolaci sondou modifikovaných MPs, by mohl být použit jako miniaturizovaný elektroanalytický nástroj pro rychlou detekci cílového oligonukleotidu.

LITERATURA

Adam V., Huska D., Hubalek J., Kizek R. (2010): Easy to use and rapid isolation and detection of a viral nucleic acid by using paramagnetic microparticles and carbon nanotubes-based screen-printed electrodes. *Microfluidics and Nanofluidics*, 8(3): 329-339.

Agrawal A., Sathe T., Nie S. M. (2007): Single-bead immunoassays using magnetic microparticles and spectral-shifting quantum dots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10): 3778-3782.

Ahmed A. R. H., Olivier G. W. J., Adams G., Erskine M. E., Kinsman R. G., Branch S. K., Moss S. H., Notarianni L. J., Pouton C. W. (1992): Isolation and partial-purification of a melanocyte-stimulating hormone receptor from B 16 murine melanoma-cells-a novel-approach using a cleavable biotinylated photoactivated ligand and streptavidin- coated magnetic beads. *Biochemical Journal*, 286(377-382).

Bakalova R., Zhelev Z., Ohba H., Baba Y. (2005): Quantum dot-conjugated hybridization probes for preliminary screening of siRNA sequences. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32): 11328-11335.

Bruland K. W. (1992): Complexation of cadmium by natural organic ligands in the central north pacific. *Limnology and Oceanography*, 37(5): 1008-1017.

Drbohlovova J., Adam V., Kizek R., Hubalek J. (2009): Quantum dots - Characterization, preparation and usage in biological systems. *Int. J. Mol. Sci.*, 10(2): 656-673.

Drbohlovova J., Hrdy R., Adam V., Kizek R., Schneeweiss O., Hubalek J. (2009): Preparation and properties of various magnetic nanoparticles. *Sensors*, 9(3): 2352-2362.

Elghanian R., Storhoff J. J., Mucic R. C., Letsinger R. L., Mirkin C. A. (1997): Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277(5329): 1078-1081.

Feng Z. L., Towers S., Yang Y. D. (2011): Modeling the Effects of Vaccination and Treatment on Pandemic Influenza. *Aaps Journal*, 13(3): 427-437.

Fouchier R. a. M., Herfst S., Osterhaus A. (2012): Restricted Data on Influenza H5N1 Virus Transmission. *Science*, 335(6069): 662-663.

Ghendon Y. (1994): Introduction to pandemic influenza through history. *European Journal of Epidemiology*, 10(4): 451-453.

Hicks J. M. (1984): Fluorescence immunoassay. *Human Pathology*, 15(2): 112-116.

Hsing I. M., Xu Y., Zhao W. T. (2007): Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis*, 19(7-8): 755-768.

Huska D., Hubalek J., Adam V., Vajtr D., Horna A., Trnkova L., Havel L., Kizek R. (2009): Automated nucleic acids isolation using paramagnetic microparticles coupled with electrochemical detection. *Talanta*, 79(2): 402-411.

Janicek Z., Huska D., Trnkova L., Provaznik I., Hubalek J., Kizek R. (2010): Isolation of DNA by the help of robotized detection on paramagnetic particles. *J. Biochem. Technol.*, 2(5): S87-S88.

Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K. P., Artarini A., Heuer D., Becker D., Khalil H., Ogilvie L. A., Hess S., Maurer A. P., Muller E., Wolff T., Rudel T., Meyer T. F. (2010): Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 463(7282): 818-U132.

Katz E., Willner I. (2004): Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(45): 6042-6108.

Li H., Shih W. Y., Shih W. H. (2007): Synthesis and characterization of aqueous carboxyl-capped CdS quantum dots for bioapplications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(7): 2013-2019.

Lim S. H., Bestvater F., Buchy P., Mardy S., Yu A. D. C. (2009): Quantitative Analysis of Nucleic Acid Hybridization on Magnetic Particles and Quantum Dot-Based Probes. *Sensors*, 9(7): 5590-5599.

Manivannan A., Kawasaki R., Tryk D. A., Fujishima A. (2004): Interaction of Pb and Cd during anodic stripping voltammetric analysis at boron-doped diamond electrodes. *Electrochimica Acta*, 49(20): 3313-3318.

Ossendorp F. A., Bruning P. F., Vandenbrink J. a. M., Deboer M. (1989): Efficient selection of high-affinity B-cell hybridomas using antigen- coated magnetic beads. *Journal of Immunological Methods*, 120(2): 191-200.

Osterholm M. T., Henderson D. A. (2012): Life Sciences at a Crossroads: Respiratory Transmissible H5N1. *Science*, 335(6070): 801-802.

Peiris J. S. M., Poon L. L. M., Guan Y. (2012): Surveillance of Animal Influenza for Pandemic Preparedness. *Science*, 335(6073): 1173-1174.

Peterson A. W., Heaton R. J., Georgiadis R. M. (2001): The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Research*, 29(24): 5163-5168.

Ryvolova M., Chomoucka J., Janu L., Drbohlavova J., Adam V., Hubalek J., Kizek R. (2011): Biotin-modified glutathione as a functionalized coating for bioconjugation of CdTe based quantum dots. *Electrophoresis*, 32(13): 1619-1622.

Steel A. B., Levicky R. L., Herne T. M., Tarlov M. J. (2000): Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophysical Journal*, 79(2): 975-981.

Wang J., Liu G. D., Merkoci A. (2003): Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *Journal of the American Chemical Society*, 125(11): 3214-3215.

Xu H. X., Sha M. Y., Wong E. Y., Uphoff J., Xu Y. H., Treadway J. A., Truong A., O'brien E., Asquith S., Stubbins M., Spurr N. K., Lai E. H., Mahoney W. (2003): Multiplexed SNP genotyping

using the Qbead (TM) system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay. *Nucleic Acids Research*, 31(8).