

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Rasmus Rohtla

**Aptasensor tsüanobakterite toksiini mikrotsüstiin-LR  
määramiseks**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Juhendajad: Toonika Rinke, PhD

Kairi Kivirand, PhD

Eerik Jõgi, MSc

Tartu 2021

## **Aptasensor tsüanobakterite toksiini mikrotsüstiin-LR määramiseks**

Käesolevas töös disainiti ja konstrueeriti aptasensor toksiini mikrotsüstiin-LR (MC-LR) määramiseks. MC-LR on tsüanobakterite poolt toodetud levinuim hepatotoksiin, mille sidumiseks ja detekteerimiseks kasutati konstrueeritud sensoris nii MC-LR aptameeri kui MC-LR vastast monoklonaalset antikeha. Töö tulemusena leiti, et sensor võimaldab määrata MC-LR kontsentratsiooni alla Maailma Terviseorganisatsiooni kehtestatud piirmäära, mis on 1 µg/l, kusjuures analüüsiks kulus 75 minutit. Konstrueeritud aptasensorit testiti ka MC-LR määramiseks sinivetikakultuuris. Aptasensori kasutamine võimaldab tulevikus sinivetikate poolt toodetavate toksiinide kohapealset detekteerimist ja vee kvaliteedi hindamist.

Märksõnad: *Mikrotsüstiin-LR, biosensor, aptameer, antikeha*

CERCS: P300, Analüütiline keemia; T360, Biokeemiatehnoloogia; T270, Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

## **Aptasensor for the detection of cyanobacterial toxin Microcystin-LR**

The aim of this work was to develop an aptasensor for the detection of the most common hepatotoxin microcystin-LR (MC-LR) produced by cyanobacteria. This aptasensor, which was based on MC-LR aptamer and specific anti-MC-LR antibody allowed to detect MC-LR concentration below the allowed limits of MC-LR set by WHO. The analysis time was 75 minutes. The aptasensor was also used to detect MC-LR concentration in the blue-green algae culture. The aptasensor can be potentially used for the on-site detection of toxins produced by cyanobacteria, and the assessment of water quality.

Keywords: *Microcystin-LR, biosensor, aptamer, antibody*

CERCS: P300, Analytical chemistry; T360, Biochemical technology; T270, Environmental technology, pollution control

# Sisukord

Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1. Tsüanobakterite levik ja nende poolt põhjustatavad terviseprobleemid.....	6
1.2. Tsüanobakterite poolt toodetavad mikrotsüstiinid.....	6
1.4. Meetodid tsüanotoksiinide määramiseks .....	8
1.5. MC-LR biosensorid .....	10
1.5.1. MC-LR biosensorites kasutatavad bioselektiivsed elemendid .....	11
1.5.1.1. Antikehad mikrotsüstiin-LR määramiseks .....	11
1.5.1.2. Aptameerid mikrotsüstiin-LR määramiseks .....	11
1.5.2. MC-LR biosensorites kasutatavad signaali detekteerimise süsteemid .....	12
1.5.3. Analüüside läbiviimine voolus: mikrograanulite sisestusanalüüs .....	12
2. Eksperimentaalne osa.....	14
2.1. Kasutatud reaktiivid ja materjalid.....	14
2.2. Kasutatud seadmed .....	15
2.3. Metoodikad .....	15
2.3.1. Lahuste valmistamine .....	15
2.3.2. Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine.....	15
2.3.3. Mõõtmiste läbiviimine biosensoriga.....	16
2.3.4. Sinivetika kultuuri kasvatamine.....	17
2.3.5. Sinivetika proovi ettevalmistus.....	18
3. Tulemused ja arutelu.....	20
3.1. Biosensori disainimine mikrotsüstiin-LR määramiseks .....	20
3.2. Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine.....	21
3.3. Mikrotsüstiin-LR määramine.....	21
3.3.1. Mõõteprotokollide optimeerimine .....	21
3.3.2. Kalibreerimisgraafiku koostamine MC-LR määramiseks .....	22

3.3.3. MC-LR biosensori testimine sinivetikakultuuris .....	24
3.4. Detekteeritava kompleksi moodustumise uurimine geelfiltratsiooni abil .....	25
Kokkuvõte.....	29
Summary .....	30
Kasutatud kirjandus .....	31
Lisad.....	35
Lisa 1. Erinevate voolukiiruste kromatogrammid .....	35
Lisa 2. Erinevate proovi kontsentratsioonide kromatogrammid.....	36
Lisa 3. Erinevate proovi ruumalade kromatogrammid .....	37
Lisa 4. Aptameeri ja Aptameer/MC-LR segulahuse kromatogrammid .....	38
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	39

## Sissejuhatus

Sinivetikate ehk tsüanobakterite kasv kiireneb oluliselt temperatuuri tõustes ning globaalne soojenemine võib kaasa tuua ulatusliku sinivetikate leviku. Kui vee temperatuur on vähemalt 15°C, hakkavad sinivetikad massiliselt vohama. Sinivetikate massiline vohamine võib põhjustada nende poolt toodetavate toksiinide sattumise ümbritsevasse vette. Sinivetikate toksiinidest on enim levinud mikrotsüstiin-LR (MC-LR), mis on üks ohtlikumaid sinivetika toksine ning võib inimestel ja loomadel tekitada löövet, kõhukrampe ning maksakahjustusi. Seetõttu on oluline vee kvaliteedi pidev seire.

Käesoleval ajal kasutatakse MC-LR määramiseks looduslikest veekogudest peamiselt kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (HPLC). Peale selle rakendatakse ka ensüümi (fosfataasi) inhibeerimisel põhinevaid bioteste ning ensüüm-immunosorptsioonanalüüsi (ELISA). Kõik nimetatud meetodid nõuavad proovide ettevalmistamist ja transporti laborisse ja seetõttu on aeganõudvad. Kromatograafilised analüüsid on lisaks kallid ning nende teostamiseks on vajalik spetsiaalne väljaõpe. Seetõttu on tekkinud vajadus kiirete ja kohapeal kasutatavate analüüsimeetodite väljatöötamiseks. Üheks selliseks analüüsi võimaluseks on biosensorite, näiteks aptasensorite kasutamine.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida võimalusi MC-LR määramiseks kasutatava aptasensori disainimiseks ja konstrueerimiseks, koostada eeskiri selle sensoriga mõõtmiste läbiviimiseks ning testida sellise sensori kasutatavust sinivetikate poolt toodetud toksiooni määramiseks.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Tsüanobakterite levik ja nende poolt põhjustatavad terviseprobleemid

Tsüanobakterid ehk sinivetikad on fotosünteesivad gram-negatiivsed bakterid, kes suudavad kohaneda väga erinevates keskkondades: neid on leitud nii mageda ja soolase veega veekogudes, aga ka kuumaveeallikates [1].

Tsüanobakterite massilise levimise tingimused sõltuvad konkreetsest liigist, mida looduses leidub väga palju. Temperatuuri tõus põhjustab tsüanobakterite kiirema kasvu. Peale temperatuuri mõjutavad tsüanobakterite levikut ka keskkonna pH, soolsus, vajalike toitainete olemasolu (nt lämmastik ja fosfor) ning valgus. On täheldatud, et globaalne soojenemine võib tõsta tsüanobakterite vohamise sagedust ning ulatust. Mikroorganismide massilise levimise ehk vee õitsengu ajal võivad tsüanobakterid eritada keskkonda mitmeid erinevaid toksine. [1]

Tsüanobakterite poolt toodetud toksiinidel on nii inimestele kui ka loomadele kahjulik mõju. Sinivetikate poolt toodetava toksiooni sattumisel organismi on sümptomiteks kõhulahtisus, nahaärritus, oksendamine, kõhukrambid, nõrkus ning valus kurk. Kuna loomad tarbivad looduslike veekogude vett ka joomiseks, siis esineb loomadel mürgistusi tihedamini. [1, 2]

## 1.2. Tsüanobakterite poolt toodetavad mikrotsüstiinid

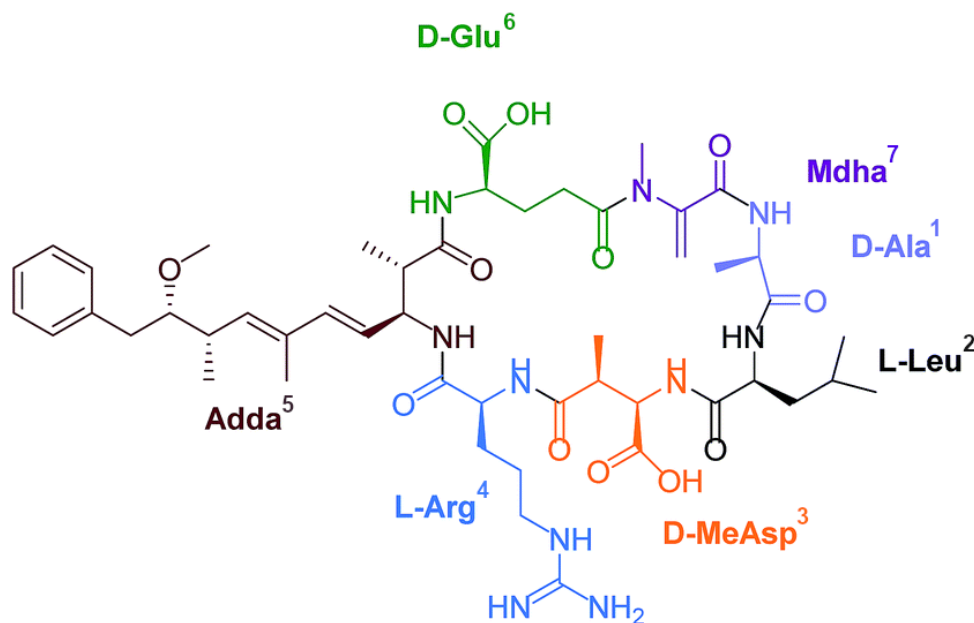
Tsüanobakterid toodavad erinevaid toksine ning neid klassifitseeritakse vastavalt sellele, millist mõju nad organismile avaldavad:

- maksa kahjustavad hepatotoksiinid;
- närvisüsteemi kahjustavad neurotoksiinid;
- nahka kahjustavad dermatotoksiinid [3].

Olulisemateks hepatotoksiinideks on mikrotsüstiinid, mille puhul on viidatud ka võimalikule kantserogeensele toimele [4]. Käesoleval ajal on kokku kirjeldatud üle 250 erineva mikrotsüstiini. Mikrotsüstiinid on tsüklilised heptapeptiidid, mille molekulmass jääb vahemikku 800-1100 Da (Joonis 1). Mikrotsüstiinide molekulide koostises on mitmeid mittekodeeritavaid (ingl *non-proteinogenic*) aminohappe jääke, näiteks N-metüüldehüdroalaniin (Mdha) või (2*S*,3*S*,4*E*,6*E*,8*S*,9*S*)-3-amino-9-metoksü-2,6,8-trimetüül-10-fenüüldeka-4,6-dieenhape (ADDA) [5, 6]. MC-LR molekulis tsüklis väljaulatuvad ning kõrvuti asuvad ADDA ja arginiini jäägid tõukuvad, mis muudab need ruumiliselt paremini kättesaadavaks ning suurendab nende retseptoritele seondumise tõenäosust [6].

Erinevate mikrotsüstiinide molekulides esineb aminohappejääkide varieerumist teises ja neljandas positsioonis, teistes positsioonides olevad aminohapete jäägid on samad, kusjuures varieeruvad elemendid on alati kodeeritavad L-aminohapped. Varieeruvateks aminohappejääkideks teises ja neljandas positsioonis on näiteks leutsiin ningalaniin (Ala, A) ning arginiin (Arg, R) ja arginiin vastavalt mikrotsüstiin-LA ning mikrotsüstiin-RR korral. [1, 6] Nendes asendites olevate aminohapete jääkide ühetähelised lühendid lisatakse vastava mikrotsüstini nimetusele.

Levinuim ja kõige toksilisem on mikrotsüstiin-LR (MC-LR), mille puhul on teises positsioonis leutsiin (Leu, L) ja neljandas positsioonis arginiin (Arg, R) (Joonis 1) [1]. MC-LR molekuli modelleerimise tulemusena on leitud, et asendites 1 ja 2 asuvad alanini ja leutsiini jäägid, mis nii MC-LR kui ka teise hepatotoksiini nodulariini molekulides asuvad samades asendites, ulatuvad tsükli tasapinnast välja poole ning võimaldavad seeläbi selektiivset seondumist retseptormolekulidega, mis omakorda põhjustab MC-LR ja nodulariini kõrge toksilisuse. [6]



**Joonis 1.** Mikrotsüstiin-LR struktuur [5]. Number aminohappejäägi kohal näitab vastava aminohappejäägi positsiooni numbrit.

MC-LR on keemiliselt väga stabiilne: talub tugevat happelist ning aluselist keskkonda (nt laguneb 90% ulatuses pH väärtustel 1 ja 9 vastavalt 10 ja 12 nädalat) ning temperatuuri kuni 300°C. [1] Looduslikes veekogudes, mille pH väärtused jäävad vahemikku 7,4 kuni 8,1 ja

veepinnale langeva valguse intensiivsus on võrreldav Kesk-Euroopa päikesevalguse intensiivsusega, on MC-LR poolestusaeg 90-120 päeva [7].

MC-LR piirmäärad on looduslikele veekogudele kehtestatud vaid üksikutes riikides. Ungaris ning mõnedes Ameerika Ühendriikide osariikides, näiteks Indiana ja New Yorki osariikides, on MC-LR piirmääraks veekogudes 4 µg/l [8]. Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) on kehtestanud MC-LR piirmääraks joogiveele 1 µg/l [9].

#### **1.4. Meetodid tsüanotoksiinide määramiseks**

Tsüanotoksiinide määramiseks on praegusel ajal kasutusel palju erinevaid meetodeid: kromatograafilised meetodid, immunosorptsioonanalüüs (ELISA), proteiinfosfataasi inhibeerimistestid (PPIA).

Tsüanotoksiinide määramiseks kasutatakse kõige enam kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat UV-detektoriga (HPLC-UV) ja vedelikkromatograafiat kombineerituna massispektromeetriaga (LC-MS). ISO standard 20179:2005 mikrotsüstiinide määramiseks põhineb HPLC-UV kasutamisel koos tahke faasi ekstraktsiooniga [10]. HPLC on selektiivne ja tundlik meetod, mis võimaldab üheaegselt määrata erinevaid mikrotsüstiine. Kromatograafiliste meetodite abil on võimalik määrata väga madalaid toksiinide kontsentratsioone (0,02 µg/l), kuid määramine on tehniliselt keerukas ja aega nõudev, aparatuuri hind on kõrge ning ühe analüüsi maksumuseks on 100-200 € [11]. Samuti on vajalik proovide eeltöötlus [12]. Kromatograafilised meetodid ei võimalda läbi viia kohapealset monitooringut ning arvestades vajadust proovide transpordiks, on võimalik tulemusi saada minimaalselt 4-6 tunni jooksul. LC-MS/MS-i kasutatakse tihti konkreetsete tsüanotoksiinide olemasolu kinnitamiseks. Kombineerides LC-MS/MS-i eelneva tahkefaasi ekstraheerimisega, on võimalik saada mikrotsüstiinide määramispiiriks 0,01 µg/l. [12, 13] Kromatograafilisel analüüsil on oluline maatriksiefektide arvestamine. Seetõttu on vajalik eelnev süsteemi kalibreerimine standardainega uuritavas maatriksis [13].

Sageli kasutatakse mikrotsüstiinide määramiseks ka ensüüm-immunosorptsioonanalüüsi (ELISA) või proteiinfosfataasi inhibeerimistesti (PPIA). ELISA testid põhinevad antigeen-antikeha interaktsioonidel ja analüütide tuvastamine toimub reaktsiooni tulemusena tekkiva värvimuutuse abil. ELISA analüüs on kõrge tundlikkusega ja suhteliselt lihtne. [12] Kommertsiaalsete ELISA kiirtestide korral on mikrotsüstiinide määramispiiriks 0,06 µg/l, katse aeg varieerub vahemikus 4-6 h ning ühe analüüsi maksumuseks on ~50 € [14]. Paljude kommertsiaalsete ELISA testide oluliseks puuduseks on asjaolu, et need põhinevad anti-

ADDA antikehade kasutamisel ning nendega ei mõõdetata mitte konkreetset mikrotsüstiini vaid mikrotsüstiinide ja nodulariinide summaarset sisaldust [15], lisaks esineb ristreaktiivsus [13]. ELISA testidega, mis põhinevad positsioonis 4 asuva arginiini vastasel monoklonaalsel antikehal on määramispiiriks saadud isegi 0,002 – 0,006 µg/l [11, 16].

Proteiinfosfataasi inhibeerimistestid (ingl *Protein phosphatase inhibition assay*, PPIA) võimaldavad analüüse teha odavalt, lihtsalt ja kiiresti (2h). Need testid põhinevad ensüüm proteiinfosfataasi poolt katalüüsitava valguga defosforüleerumise reaktsioonil, kus kromogeense substraadi (näiteks p-nitrofenool fosfaat) olemasolul vabaneb p-nitrofenool, mida detekteeritakse lainepikkusel 410 nm. Mikrotsüstiin inhibeerib proteiinfosfataase ning reaktsiooni tulemusena tekkiva p-nitrofenooli hulk väheneb sõltuvalt mikrotsüstiini kontsentratsioonist uuritavas proovis [17]. Kasutatavad ensüümid, näiteks proteiinfosfataas 1 (PP1), on kergesti kättesaadavad ning meetod on keskmise tundlikkusega - MC-LR määramispiiriks on saadud 0,1 µg/l ning ühe analüüsi maksumuseks on 20-50 € [18]. PPIA peamine puudus on madal selektiivsus, sest fosfataase sisaldavate tsüanobakterite olemasolu korral proovis ei ole võimalik määrata toksiini täpset mõju testile. Samuti ei võimalda PPIA määrata, millise mikrotsüstiiniga täpsemalt tegemist on [19]. Arvatakse, et mikrotsüstiinide interaktsioon PP1ga on seotud mikrotsüstiinide molekulides asendites 5, 6 ja 7 olevate mittekodeeritavate aminohappe (vastavalt ADDA, D-Glu ja Mdha) jääkidega [20].

Eelpoolkirjeldatud mikrotsüstiinide määramise meetodeid iseloomustavad olulisemad analüütilised parameetrid on kokkuvõtlikult toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Ülevaade MC-LR määramise meetoditest

Meetod	LOD (µg/l)	Analüüsi aeg (h)	Proovi eeltötlus	Kohapealse analüüsi võimalus	Ligikaudne maksumus	Viide
Kromatograafilised meetodid (HPLC-UV ja LC-MS/MS)	0,02	4-6	+	-	100-200€	[11, 13]
ELISA	0,002	4	+/-	+		[11]
Kommertsiaalsed ELISA kiirtestid	0,06	5-6	+/-	+	50€	[14]
PPIA	0,1	2	+	-	20-50€	[18]

\*LOD: avastamispiir; HPLC-UV: kõrgefektiivne vedelikukromatograafia UV-detektoriga; LC-MS/MS: vedelikukromatograafia kombineerituna massispektromeetriaga; ELISA: ensüüm-immunosorptsioonanalüüs; PPIA: proteiinfosfataasi inhibeerimistest

## 1.5. MC-LR biosensordid

Tsüanotoksiinide kohapealseks monitooringuks saab kasutada ka biosensoreid, mis võimaldavad selektiivselt määrata erinevaid ühendeid, tihti ilma proovide eelneva töötluseta [21]. Enamus MC-LR määramiseks kasutatavaid biosensoreid on immunosensordid, kus analüüdi äratundmiseks kasutatakse antikehi või aptameere. Väljapakutud biosensorite määramispiirid varieeruvad vahemikus 0,00001 – 0,37 µg/l ning analüüsi aeg vahemikus 0,8-2,3 tundi [22–27].

Biosensor on analüütiline seade, mis koosneb kahest osast: bioäratundvast komponendist ja bioäratundmisreaktsiooni signaali registreerivast detektorist. Bioäratundev komponent, näiteks ensüüm, antikeha või aptameer, seondub selektiivselt analüüdiga. Selle äratundmisreaktsiooni käigus tekkiv massi, temperatuuri või optilise signaali muutus detekteeritakse vastava muunduri abil ning muudetakse mõõdetavaks signaaliks. Erinevate algoritmide abil leitakse saadud tulemustest mõõdetavale signaalile vastav analüüdi kontsentratsioon [28]. MC-LR biosensorite puhul on varieeritud nii bioselektiivseid elemente kui ka detekteerivaid elemente.

Mikrotsüstiinide määramiseks kasutatavaid biosensoreid iseloomustavad olulisemad parameetrid on kokkuvõtlikult toodud tabelis 2.

**Tabel 2.** Ülevaade MC-LR biosensoritest

Meetod	LOD (µg/l)	Analüüsi aeg (h)	Proovi eeltöötlus	Kohapealse analüüsi võimalus	Märkused	Viide
Kolorimeetrial põhinev aptasensor	0,37	0.7	+	+	Kasutatakse kulla-nanoosakesi	[22]
Fluorestsentsil põhinev aptasensor	0,002	1	-	+/-		[23]
Raman spektroskoopial põhinev aptasensor	0,002	2,3	-	+/-	Kasutatakse kulla- ning magnet nanoosakesi	[24]
Ruutlaine voltammeetrial põhinev aptasensor	0,002	~1	+	-		[25]
Fotoelektrokeemiline aptasensor	0,00001	~0,8	-	-		[26]

Diferentsiaal tsüklilisel voltamperomeetriaal ja antikehadel põhinev sensor	0,000 3	~1	-	-	Kasutatakse kulla- nanoosakesi	[27]
---	------------	----	---	---	--------------------------------------	------

\**LOD: avastamiskiir*

### 1.5.1. MC-LR biosensorites kasutatavad bioselektiivsed elemendid

#### 1.5.1.1. Antikehad mikrotsüstiin-LR määramiseks

Antikehad ehk immunoglobuliinid (Ig) on glükoproteiinid, mida organism kasutab võõraste objektide tuvastamiseks ja neutraliseerimiseks. Antikehadel on iseloomulik baasstruktuur, mis koosneb disulfiidsillaga ühendatud valgu ahelast. Antikehad on antigeeni suhtes väga kõrge afiinsusega, mida saab kirjeldada antigeen/antikeha kompleksi dissotsiatsioonikonstandiga. Selle konstandi väärtused on tavaliselt  $10^{-12}$  ja  $10^{-8}$  M vahel. [29] MC-LR määramiseks on kasutatud mitmeid erinevaid antikehasid: näiteks toimub detekteerimine mikrotsüstiinide molekulide viiendas asendis asuva mittekodeeritava aminohappe jäägi ADDA järgi (määratakse koos kõikide mikrotsüstiinide ja nodulariinide sisaldus) [30]. Töös kasutatav MC-LR monoklonaalne antikeha omab afiinsust kõikide mikrotsüstiinide suhtes, mille struktuuri neljandas positsioonis on arginiin, kusjuures dissotsiatsioonikonstandi väärtuseks on  $1,4 \cdot 10^{-11}$  M [31].

#### 1.5.1.2. Aptameerid mikrotsüstiin-LR määramiseks

Aptameer on DNA või RNA fragment, mis samuti võib sihtmolekulile seonduda kõrge afiinsusega. Aptameere toodetakse tavaliselt SELEX meetodil, mis seisneb suure hulga erinevate oligonukleotiidide järjestuste hulgast uuritavale analüüdile suurima afiinsusega järjestuste valimises. Võrreldes antikehadega on aptameeride tootmine suurtes kogustes odavam. Aptameeride kasutamisel bioselektiivsete elementidena on nende kõige suuremaks puuduseks aptameeride lagunemine nukleasid toimel. [32]

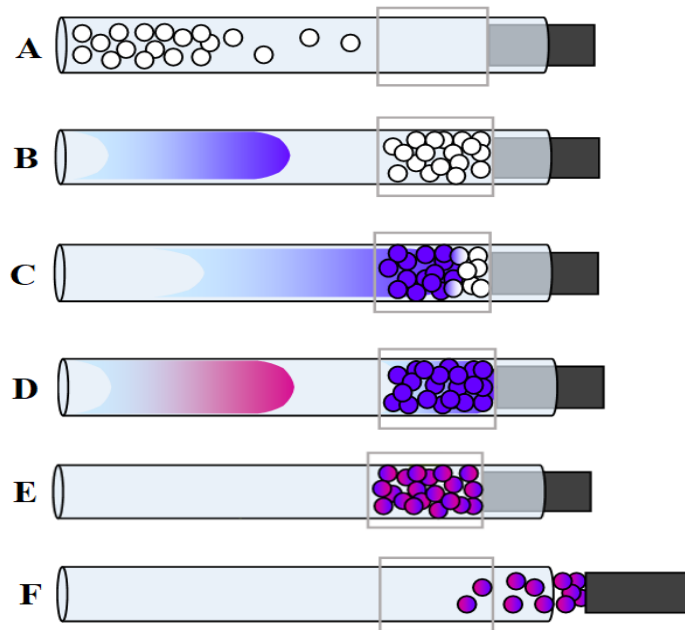
Varasemalt on uuritud ka mitme erineva aptameeri selektiivsust ning afiinsust erinevate mikrotsüstiinide suhtes. Uuringust selgus, et aptameere on võimalik disainida väga spetsiifiliselt MC-LR jaoks. Näiteks aptameer AN6, mis on disainitud spetsiaalselt MC-LR jaoks on selektiivne asendis 2 asuva leutsiini suhtes. Aptameer AN6 dissotsiatsioonikonstandi väärtused MC-LR ja MC-LA jaoks on vastavalt  $50 \pm 12$  nM ja  $158 \pm 39$  nM, mikrotsüstiin MC-YR'ga AN6 ei seondu. [33]

### **1.5.2. MC-LR biosensorites kasutatavad signaali detekteerimise süsteemid**

MC-LR määramiseks kasutatavad biosensorid on elektrokeemilised või optilised. Elektrokeemilised biosensorid mõõdavad voolu, pinge või potentsiaali muutust, kusjuures enamasti on elektrod valmistatud kullast või süsinikust ja süsiniku nanovormidest [34]. Elektrokeemilised biosensorid on võimelised määrama väga madalat MC-LR sisaldust (madalaim avastamispiir on 0,00001 µg/l) [26]. Optiliste biosensorite puhul mõõdetakse äratundmisreaktsiooni poolt põhjustatud optilist signaali (enamasti fluorestsentsi). Optiliste biosensorite puhul on samuti võimalik määrata väga madalaid analüüdi kontsentratsioone (kuni 0,002 µg/l) [19]. Nii optiliste kui ka elektrokeemiliste biosensorite puhul enamasti ei ole vaja proovi eeltöötlust ning analüüse on võimalik läbi viia ka kohapeal. [23, 34]

### **1.5.3. Analüüside läbiviimine voolus: mikrograanulite sisestusanalüüs**

Kohapealsete analüüside läbiviimiseks ja toksiinide pidevaks monitooringuks on perspektiivne kasutada mõõtmisi analüüsivat ainet sisaldavas voolus. Voolus (ingl *in-flow*) kasutatavate sensorsüsteemide konstrueerimise üheks võimaluseks on kasutada BIA (ingl *Bead injection analysis*) põhimõtet. Mikrograanulite sisestusanalüüsis (BIA) kasutatakse analüüsi teostamiseks vajalike mikrokolonnide moodustamiseks mikrograanulite transporti voolavas lahuses. Mikrokolonni moodustanud graanulite pinnal, millele on immobiliseeritud analüüti äratundev selektiivne komponent, toimub analüütide eelkontsentreerimine ja sidumine. Pärast proovi maatriksi eemaldamist toimub seondunud analüüdi selektiivne detekteerimine, milleks kasutatakse näiteks antigeen/antikeha interaktsiooni. Äratundmisreaktsiooni signaali detekteeritakse spektromeetriliselt või fluorestsentssignaali mõõtes. [35, 36] BIA tööpõhimõtte skeem on toodud joonisel 2.



**Joonis 2.** Graanulsisestusanalüüsi (BIA) tööpõhimõte [37]

- A bioaktiveeritud graanulid sisestatakse voolukanalisse, kus moodustub mikrokolonn
- B sisestatakse proov ja proovis leiduv analüüt seondub graanulitele
- C kolonni pestakse, et eemaldada kolonniga mitteseondunud proovi komponendid
- D sisestatakse bioäratundev komponent, inkubeeritakse ning eemaldatakse mitteseondunud bioäratundev komponent
- E toimub signaali detekteerimine
- F toimub süsteemi regenerereerimine

Mikrokolonna moodustamiseks vajalik graanulite hulk on väike ( $\sim 20 \mu\text{g}$ ), mis võimaldab nende ühekordset kasutamist. See vähendab oluliselt kogu süsteemi regenerereerimiseks kuluvat aega, selle saastamise riski, graanulile seotud bioäratundva komponendi denaturatsiooni riski ning võimaldab opereerida pidevas voolavas süsteemis. Saadavate tulemuste usaldusväärsuse ja täpsuse tagamiseks on oluline tagada ka graanulite bioaktiveerimise stabiilselt kõrge kvaliteet. [35]

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1. Kasutatud reaktiivid ja materjalid

1. Sephadex G-50 Medium (Pharmacia Fine Chemicals, FB-14567)
2. Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare, 10090795)
3. Naatriumkloriid (NaCl), 99,8% (Sigma-Aldrich, SZBF1590V)
4. Naatriumkarbonaat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 99,5% (Sigma-Aldrich, SLCB9935)
5. Naatriumdivesinikfosfaat-dihüdraat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), 99% (Appllichem, 5O000977)
6. Naatriumhüdroksiid (NaOH), 99% (Appllichem, 7S003451)
7. Epiklorohüdriin (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>ClO), 99% (Acros Organics, A0386058)
8. Etanoolamiin (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO), 99,5% (Fisher Chemical, 1689849)
9. Inimese IgG Fc fragment, puhastatud tervete inimese vereseerumist kasutades afiinsuskromatograafiat HiTrap valk A HP kolonniga TÜ Keemia instituudi Biosensorite laboris
10. Kaaliumdikromaat (ч.д.а., Reachim)
11. Dekstraansinine (Reanal)
12. Glükoosi oksüdaas (*Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich, SLCG0619, 17300 U/mg)
13. Ovalbumin (Kebo)
14. Lipoksüdaas (*Soybean*, Sigma-Aldrich, 118F03422, 110600 U/mg)
15. Tsellulaas (*Aspergillus niger*, Tokyo Chemical Industry CO, 3JRKJ)
16. Trüpsiin (*Porcine Pancreas*, Sigma-Aldrich, 22K7268, 1120 BAEE U/mg)
17. Pektinaas (*Rhizopus sp.*, Sigma-Aldrich, BCCC9340, 400-800 U/mg)
18. Monoklonaalne MC-LR antikeha (Enzo Life Sciences, MC10E7)
19. MC-LR spetsiifiline aptameer 5' GGC GCC AAA CAG GAC CAC CAT GAC AAT TAC CCA TAC CAC CTC ATT ATG CCC CAT CTC CGC 3' (Integrated DNA Technologies)
20. Fluorestentsmärgisega MC-LR spetsiifiline aptameer 5' GGC GCC AAA CAG GAC CAC CAT GAC AAT TAC CCA TAC CAC CTC ATT ATG CCC CAT CTC CGC 3' Alexa Fluor 647N/ (Integrated DNA Technologies)
21. Coomassie Brilliant Blue R-250, 99% (Fluka AG, CH-9470)
22. MC-LR standard, 95% (Enzo Life Sciences, ALX-350-012-C100)
23. *Microcystis aeruginosa* (Norwegian Culture Collection of Algae, K-0540)

## 2.2. Kasutatud seadmed

1. Voogsisestusanalüüsi süsteem FIALab 3500B (FIALab)
2. Spektrofotomeeter USB2000+ (Ocean Optics)
3. Valgusallikas DH-2000 (Ocean Optics)
4. Loksuti DOS-20L (ELMI)
5. Ultrahelisond Bandelin Sonoplus UW 2070 (Bandelin Electronics)
6. Magnetsegaja MS3000 (Biosan)
7. Analüütiline kaal PB602-S/FACT (Mettler Toledo), täpsusega 0,01 g
8. Analüütiline kaal XS105 DualRange (Mettler Toledo), täpsusega 0,01 mg
9. Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
10. Spektromeeter UV-1800 240V IVDD (Shimadzu)
11. Kromatograaf ÄKTApurifier UPC 10 (GE Healthcare)
12. pH-Meeter (Mettler Toledo), täpsusega 0,02 ühikut

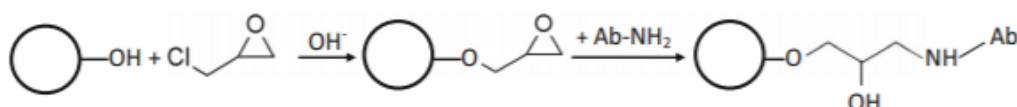
## 2.3. Metoodikad

### 2.3.1. Lahuste valmistamine

Kõik töös mainitud lahused valmistati kasutades ülipuhast Milli-Q vett (eritakistusega 18,2 MΩ·cm). Puhverlahuste pH väärtused mõõdeti pH-meetriga, mida eelnevalt kalibreeriti standardlahustega (pH 4,0 ja pH 7,0). Aptameeri ja mikrotsüstiini lahused valmistati 0,01 M fosfaatpuhvri (0,15 M NaCl, pH 7,2; PBS) lahusesse. MC-LR antikehade lahuste valmistamiseks kasutati lisaks PBS puhvrile ka 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,50) lahust. Valmistatud lahuseid hoiustati 4°C juures.

### 2.3.2. Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine

Bioaktiveeritud geeli valmistamise skeem on toodud joonisel 3. Sephadex G-50 Medium graanulite aktiveerimiseks kasutati epiklorohüdrini. Antikeha seotakse aminorühma abil kovalentselt epiklorohüdrini epoksürühma süsinikuga.



**Joonis 3.** Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine [37]

MC-LR antikeha sidumiseks Sephadex G-50 Medium graanulitele modifitseeriti seondunud antikeha saagise suurendamiseks varasemalt töögrupis väljatöötatud protokoll [38]. Esmalt kaaluti 47 mg Sephadex G-50 Medium geeli, sellele lisati 1 ml Milli-Q vett ning jäeti punduma 24 h 4°C juurde. Pärast pundumist lisati 400 µl NaOH lahust, mille kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 0,4 – 1 M, ning loksutati. Seejärel lisati geeli aktiveerimiseks 100 µl 99% epiklorohüdrini ja jäeti loksutile 3h toatemperatuurile. Pärast seda pesti saadud suspensiooni 2 korda 685 µl Milli-Q veega ning ühe korra 685 µl 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puhvriga (pH 9,50). Graanulite eraldamiseks lahusest tsentrifuugiti segu pärast igat pesu 5 minutit 2450×g juures. Seejärel lisati graanulitele MC-LR antikeha lahus Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puhvril. Antikeha lahusekontsentratsiooni varieeriti vahemikus 10 – 350 µg/ml ning kogust vahemikus 0,5 – 2 ml. Segu inkubeeriti loksutil 24h toatemperatuuril. Peale inkubeerimist tsentrifuugiti suspensiooni (5 minutit 2450×g juures) ning pesti ühe korra 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puhvriga (pH 9,50). Geeli pinnal olevate vabade sidumiskohtade blokeerimiseks lisati geelile 685 µl etanoolamiini lahust (85 µl/ml) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puhvril ning segu inkubeeriti loksutil 2h toatemperatuuril. Suspensiooni tsentrifuugiti (5 min 2450×g juures), pesti 2 korda 685 µl Milli-Q veega, 6 korda 685 µl PBS puhvriga ning hoiustati seejärel 685 µl PBS puhvril 4°C juures.

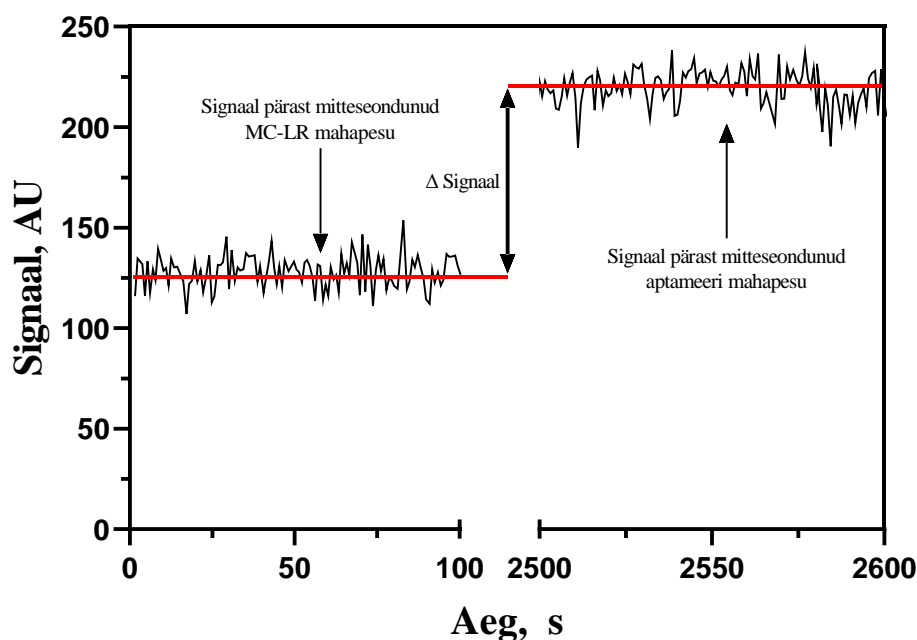
Antikehade immobiliseerimise saagist graanulitele hinnati kahel erineval meetodil. Esiteks kontrolliti seda visuaalselt 0,1% Coomassie Brilliant Blue lahusega, lisades seda enne etanoolamiini lisamist 30 µl graanulitele. Visuaalselt hinnati, kas graanulid värvuvad siniseks, mis näitab seondunud valgule olemasolu graanulitel. Lisaks mõõdeti spektrofotomeetriga valgusisaldust antikeha lahuses enne ja pärast antikeha immobiliseerimise protsessi. Valgu sisaldust proovides määrati lainepikkusel 280 nm ja kontsentratsiooni määramiseks kasutati neeldumiskoeffitsienti, mis IgG ( $\epsilon^{1\%}$ ) korral on 1,37 [39].

### **2.3.3. Mõõtmiste läbiviimine biosensoriga**

BIA süsteemi mõõteraku väljavoolukanal suleti osaliselt liikuva korgiga ning kolonni moodustamiseks süstiti mõõterakku 20 µl bioaktiveeritud mikrograanuleid voolukiirusega 1 µl/s. Seejärel lisati 30 µl PBS puhverlahust kiirusega 2 µl/s, et tagada kolonni pakkimine mõõterakus. Mõõterakku viidi 150 µl MC-LR sisaldavat proovi kiirusega 1 µl/s, vool peatati ning inkubeeriti 30 minutit. Mitteseondunud toksini eemaldamiseks pesti mõõterakku 150 µl PBS puhverlahusega kiirusega 2 µl/s. Seejärel sisestati 30 µl fluorestsentsmarkeriga (Alexa Fluor 647) märgistatud MC-LR aptameeri (kontsentratsioon 0,5 – 5 µg/ml) kiirusega 1 µl/s ning inkubeeriti 30 minutit. Mitteseondunud aptameer eemaldati mõõtekolonnist 350 µl PBS

puhverlahusega kiirusega 1  $\mu\text{l/s}$ . Pärast igat mõõtmist avati kork ning süsteemi pesti vähemalt 4 korda PBS puhverlahusega. Süsteemi taustasignaali eksperimentaalseks määramiseks kasutati MC-LR sisaldava proovi asemel PBS puhvrit, kõik teised mõõtmisprotsessi etapid jäeti samaks.

Kõik katsed teostati kolmes kuni viies korduses. Mõõtmised viidi läbi toatemperatuuril ning fluorestsentsi intensiivsust mõõdeti Alexa Fluor 647 emissioonimaksimumi lainepikkusel 670 nm (ergastuse lainepikkus 650 nm) perpendikulaarselt ergastusvalgusega. Biosensori signaali leidmiseks lahutati lõppsignaalist (signaal pärast mitteseondunud aptameeri mahapesu, registreerimist alustati 5 min. peale aptameeri väljapesu lõppu) maha signaal pärast mitteseondunud MC-LR maha pesemist. Signaali registreeriti 1 sekundilise intervalliga. Eksperimentaalsete mürade vähendamiseks arvutati keskmine signaal pärast selle stabiliseerumist 100 punkti keskmisena. Näitena on joonisel 4 toodud biosensori signaali muutumine mõõtmise jooksul MC-LR kontsentratsioonil  $8,0 \cdot 10^{-4}$  mg/ml.



**Joonis 4.** Näide biosensori signaali intensiivsuse muutumisest ajas MC-LR kontsentratsioonil  $8,0 \cdot 10^{-4}$  mg/ml

#### 2.3.4. Sinivetika kultuuri kasvatamine

*Microcystis aeruginosa* (K-0540) rakkude kasvatamiseks külvati 1 ml sinivetikakultuuri 50 ml vedelasse steriliseeritud BG11+ söötmesse ning kasvatati kunstliku valguse käes 14 päeva

16°C juures [40]. Valgusallikana kasutati LED lampi (16h valge/8h pime, 6W 3000 K), mida hoiti kasvatusanumast 20 cm kaugusel. Üleskasvanud säilitati -20°C juures.

### 2.3.5. Sinivetika proovi ettevalmistus

Pärast proovi ülessulatamist proovid kontsentreeriti. Korduva tsentrifuugimisega (5 minutit, 10000×g) vähendati proovide mahtu 5 korda. Kontsentreeritud sinivetika rakkude purustamiseks kasutati ultrahelisoni 1 minut, tsükli intensiivsusega 7/10 ning võimsusega 75%.

### 2.3.6. Geelfiltratsioon

Geelfiltratsioon viidi läbi ÄKTA Purifier 10 vedelikkromatograafia süsteemiga, mis oli varustatud UPC detektoriga ja võimaldas samaaegselt mõõta neelduvust 280 nm juures ning lahuste juhtivust. Geelfiltratsiooni läbiviimiseks täideti kolonn (Ø 1 cm) Sephacryl S-200 HR (ingl *High Resolution*) geeliga, mis oli eelnevalt paisutatud 24 h toatemperatuuril PBS puhvril. Kasutati kolonne pikkusega 15,5 cm ja 29 cm. Kolonnide paremaks pakkimiseks voolutati neid erinevatel voolukiirustel (kuni 0,5 ml/min) PBS puhvriga, voolutamiskiirust tõsteti 0,1 ml/min sammuga, igal voolutamiskiirusel voolutati kolonni vähemalt 30 min.. Peale igat pakkimist keerati ülemist adapterit vastavalt vajadusele juurde (vastu ülemist filtrit). Voolutamiskiirust tõsteti seni kuni pakitud kolonni ruumala enam ei muutunud 30 min jooksul.

Seejärel optimeeriti geelfiltratsiooni läbiviimise tingimusi: voolukiirus (0,18 ml/min – 0,39 ml/min), proovi ruumala (50 – 100 µl), proovi kontsentratsioon (0,05 – 1 mg/ml). Seejärel kolonn kalibreeriti. Kolonni kalibreerimiseks kasutati markerainetena katalaasi (M=240 kDa), glükoosi oksüdaasi (M=160 kDa), inimese IgG-d (M=150 kDa), lipoksüdaasi (M=54 kDa), inimese IgG Fc fragmenti (M=50 kDa), ovalbumini (M=45 kDa), trüpsiini (M=23 kDa), pektinaasi (M=20-60 kDa) ning tsellulaasi (M=39 ja 108 kDa). Kolonni tühiruumala ja koguruumala määramiseks kasutati vastavalt dekstraansinist (M=2 000 kDa) ja kaaliumdikromaati (M= 294 Da). Kõik mõõtmised viidi läbi 8°C juures.

Kalibreeritud kolonni kasutati uuritavate ainete (antikeha ja aptameer) ja nende ainete segude analüüsimiseks (aptameer/mikrotsüstiin ja antikeha/mikrotsüstiin/aptameer). Eksperimendid viidi läbi voolukiirusel 0,18 ml/min, kolonni süstiti 50 µl proovi. Kolonni voolutati kuni 70 ml. Aptameer/mikrotsüstiini lahus valmistati järgnevalt: aptameeri lahust inkubeeriti MC-LR'ga 30 minutit (moolsuhe 1:1). Antikeha/mikrotsüstiin/aptameeri lahus valmistati järgnevalt:

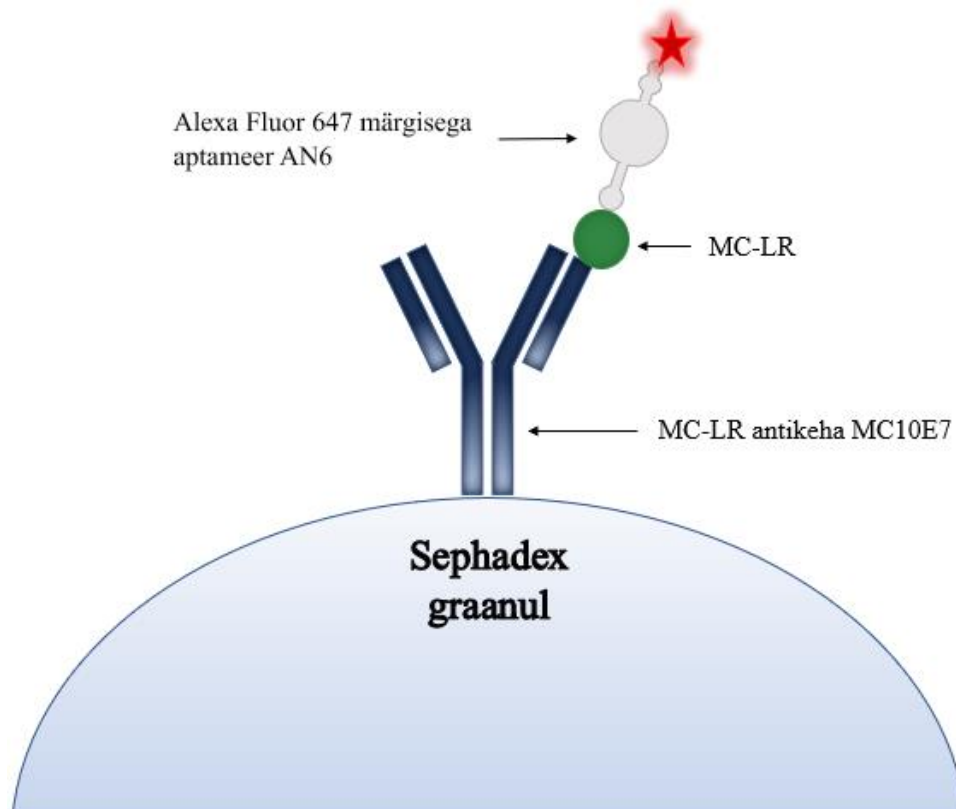
antikeha inkubeeriti MC-LR'ga 30 minutit ning peale aptameeri lisamist inkubeeriti uuesti 30 minutit (moolsuhte vastavalt 1:2:43)

### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1. Biosensori disainimine mikrotsüstiin-LR määramiseks

MC-LR määramiseks konstrueeriti biosensor, mis põhineb antikeha/MC-LR/aptameer bioäratundmissüsteemil. Biosensori disainimisel lähtuti sellest, et kuna MC-LR molekul on võrreldes antikeha ning aptameeriga väike (molekulmassid on vastavalt 0,995; 150 ja 18,17 kDa), siis MC-LR molekuli sidumiskohad selle sidumiseks antikehaga aktiveeritud kolonnile ning detekteerimiseks kasutatavale aptameerile oleksid erinevad. Tootjapoolse informatsiooni kohaselt seondub biosensoris kasutatud monoklonaalne MC-LR antikeha MC10E7 MC-LR molekuliga asendis 2 [16]. Seondunud MC-LR molekuli detekteerimiseks kasutatav aptameer AN6 valiti selliselt, et see seonduks teise MC-LR molekulis oleva iseloomuliku aminohappejäägiga asendis 4 [33]. Lisaks aminohappejääkidele MC-LR molekulis asendites 2 ja 4 on interaktsioonideks põhimõtteliselt võimalik kasutada ka asendis 5 olevat ADDA jääki, kuid selle kasutamine vähendaks biosensori selektiivsust, sest ADDA esineb kõikides mikrotsüstiinides ja nodulariinides.

MC-LR määramise skeem on toodud joonisel 5.



**Joonis 5.** MC-LR määramiseks konstrueeritud aptasensori skeem

## 3.2. Bioaktiveeritud mikrograanulite valmistamine

MC-LR selektiivseks sidumiseks ning kontsentreerimiseks kasutatava kolonni jaoks valmistati esmalt monoklonaalse MC-LR antikehaga MC10E7 aktiveeritud Sephadex G-50 M graanulid. Graanulite valikul lähtuti nende suurusest (puhverlahuses 100 – 300 µm) - et neid oleks võimalik koguda korgiga suletavasse mõõtekanalisse - kasutatud süsteemis peab graanulite läbimõõt olema minimaalselt 80 µm [41, 42].

Antikeha sidumise efektiivsuse määramiseks mikrograanulitele viidi läbi katseseria, kus kasutati erinevate kontsentratsioonidega MC-LR antikeha lahuseid. Esimese katse korral lisati funktsionaliseeritud mikrograanulitele 0,35 mg/ml antikeha lahust (0,5 ml) ja teise katse korral 0,1 mg/ml lahust (2 ml). Võrreldes spektrofotomeetriliselt määratud antikeha koguseid enne ja pärast immobiliseerimist selgus, et mõlema eksperimendi korral kinnitus mikrograanulite pinnale  $44 \pm 0,1\%$  lahuses olnud antikehast (Tabel 3). Visuaalse vaatluse tulemusena selgus, et geel värvus helesiniseks, mis samuti kinnitas seondunud antikeha olemasolu graanulitel. See tähendab, et immobiliseerimise protsessi efektiivsus ei sõltunud antikeha kontsentratsioonist immobiliseerimise lahuses.

**Tabel 3.** Antikeha sidumise efektiivsus

	Alglahuse neelduvusnäit	Alglahuse kontsentratsioon (mg/ml)	Lõpplahuse neelduvusnäit	Lõpplahuse kontsentratsioon (mg/ml)	Sidumise efektiivsus (%)
1	0,479	0,35	0,267	0,20	44
2	0,135	0,10	0,075	0,06	44

## 3.3. Mikrotsüstiin-LR määramine

### 3.3.1. Mõõteprotokolli optimeerimine

Biosensoriga mõõtmiste läbiviimiseks modifitseeriti BIA süsteemil põhineva patogeenide biosensori jaoks väljatöötatud mõõteprotokolli. Madala määramispiiri saavutamiseks suurendati nii antikeha/MC-LR (kolonnile seondumine) kui ka MC-LR/aptameer (detekteeriva aptameeri seondumine) inkubatsiooniaegu 30-le minutile, kuna 15 minuti korral ei olnud seondumine piisav, et saada usaldusväärset signaali ja määramispiiri alla kehtestatud piirnормi. [43]

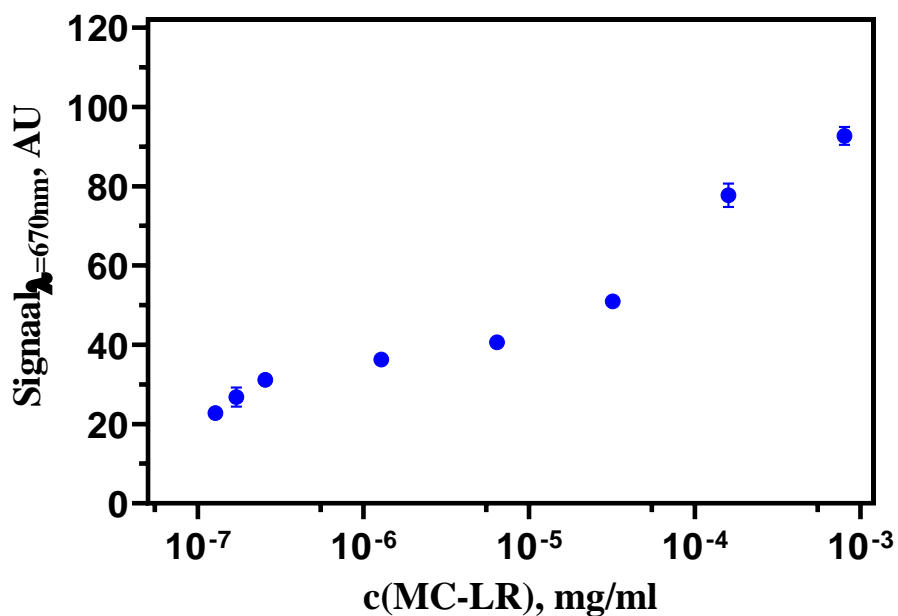
Seondumata aptameeri efektiivsemaks eemaldamiseks kolonnist suurendati pesemiseks kasutatud puhverlahuse kogust 200  $\mu$ l võrra. Selgus, et seondumata aptameeri eemaldamiseks kolonnist on minimaalne vajalik puhverlahuse kogus 350  $\mu$ l. Väiksema pesemislahuse korral ei saavutatud stabiilset lõppsignaali (signaal tõusis 5 minuti jooksul paarsada ühikut), kuna osa aptameeri lahusest ei väljunud kanalist.

Seejärel uuriti biosensori signaali sõltuvust seondunud MC-LR detekteerimiseks kasutatava märgistatud aptameeri lahuse kontsentratsioonist, mida varieeriti 10 korda: mõõtmised sooritati aptameeri kontsentratsioonidel 5  $\mu$ g/ml ja 0,5  $\mu$ g/ml. Kõrgema kontsentratsiooniga aptameeri lahuse korral selgus, et biosensori signaali väärtus oli ligikaudu 3000 ühikut, millega ei saavutatud stabiilset lõppsignaali 5 minuti jooksul. Madalama aptameeri kontsentratsiooni puhul oli biosensori signaali väärtus umbes 800 ühikut, mis oli piisav et saavutada stabiilne lõppsignaal 5 minuti jooksul. Tulemustest lähtudes otsustati kasutada aptameeri kontsentratsiooniga 0,5  $\mu$ g/ml. Kokkuvõtlikult kasutati MC-LR määramiseks järgmist optimeeritud protokollit:

- mõõtesüsteemi sisestati 20  $\mu$ l bioaktiveeritud geeli kiirusega 1  $\mu$ l/s;
- mõõtesüsteemi sisestati 30  $\mu$ l PBS puhverlahust kiirusega 2  $\mu$ l/s;
- mõõterakku sisestati 150  $\mu$ l MC-LR sisaldavat proovi kiirusega 1  $\mu$ l/s;
- MC-LR proovi inkubeeriti 30 minutit;
- mõõterakku pesti 150  $\mu$ l PBS puhverlahusega kiirusega 2  $\mu$ l/s;
- mõõtesüsteemi sisestati 30  $\mu$ l fluorestsentsmärgisega aptameeri AN6 kiirusega 1  $\mu$ l/s;
- aptameeri inkubeeriti 30 minutit;
- mõõterakku pesti 350  $\mu$ l PBS puhverlahusega kiirusega 1  $\mu$ l/s
- lõppsignaali stabiliseerumist oodati 5 minutit

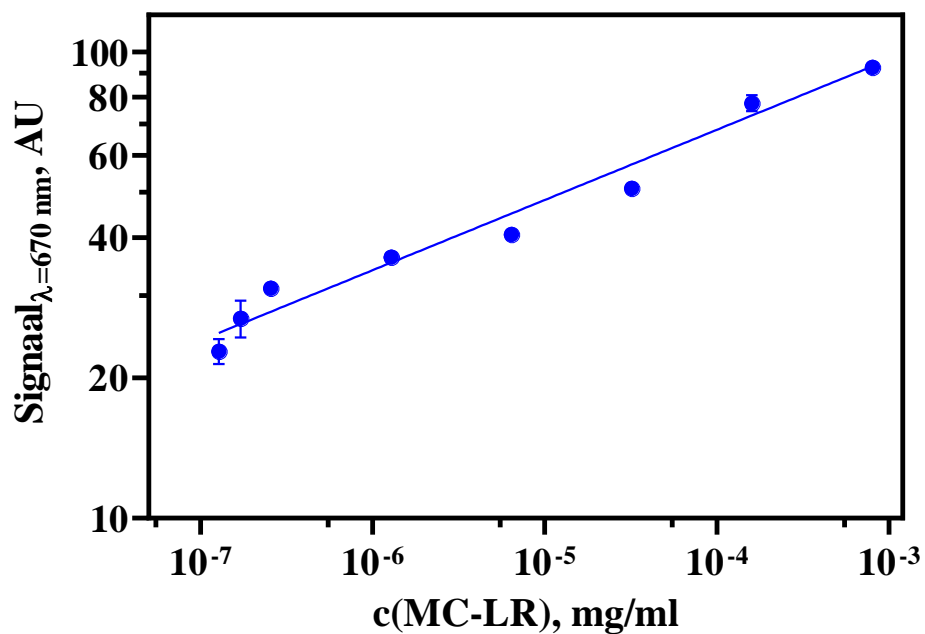
### **3.3.2. Kalibreerimisgraafiku koostamine MC-LR määramiseks**

Aptasensori tundlikuse ning tööpiirkonna iseloomustamiseks koostati eelnevalt optimeeritud mõõteprotokollit kasutades poollogaritmises skaalas sensori signaali sõltuvus MC-LR kontsentratsioonist (Joonis 6).



**Joonis 6.** Biosensorsüsteemi signaali intensiivsuse ( $\lambda = 670 \text{ nm}$ ) sõltuvus MC-LR kontsentratsioonist.

Kuna poollogaritmilises skaalas on aptasensori kalibreerimine problemaatiline, siis kalibreerimisgraafik koostati log-log skaalas (Joonis 7).



**Joonis 7.** Aptasensori kalibreerimisgraafik.

Tulemustest selgus, et konstrueeritud aptasensori signaal sõltus MC-LR kontsentratsioonist lineaarselt uuritud kontsentratsioonivahemikus  $1,3 \cdot 10^{-7}$  kuni  $8,0 \cdot 10^{-4}$  mg/ml, kusjuures mõõtevead selles vahemikus olid suhtelised väikesed: 0,8-4,3 AU (iga katse jaoks tehti 3-5 kordumõõtmist). Saadud sõltuvus iseloomustav  $R^2$  väärtus oli 0,97. Kalibreerimisgraafiku tõus, mis iseloomustab aptasensori tundlikkust selles piirkonnas, on  $0,151 \pm 0,006$  logAU/log(mg/ml) ning telglõik  $2,44 \pm 0,02$  AU. Eksperimentaalselt mõõdetud süsteemi taustasignaali on  $4,6 \pm 0,9$  AU, mis mõõdeti kasutades modifitseeritud mõõteprotokollit ehk MC-LR sisaldav proov asendati sama koguse PBS puhveriga. MC-LR aptasensori teoreetiline avastamispiir arvutati järgnevalt: taustasignaali + taustasignaali 3 standardhälbe väärtust, ning määramispiir: taustasignaali + taustasignaali 10 standardhälbe väärtust. Vastavalt taustasignaali väärtusele ning standardhälbele on meetodi avastamispiiriks (LOD)  $1,7 \cdot 10^{-8}$  mg/ml ning määramispiiriks (LOQ)  $3,4 \cdot 10^{-8}$  mg/ml.

Võrreldes saadud biosensori määramis- ja avastamispiire WHO poolt kehtestatud MC-LR piirmääraga joogivees  $1 \mu\text{g/l}$  [7], on näha, et konstrueeritud MC-LR aptasensori avastamis- ja määramispiirid on oluliselt madalamad kui WHO poolt kehtestatud piirmäär, mis loob head eeldused antud biosensori kasutamiseks MC-LR sisalduse määramiseks ning looduslike veekogude vee kvaliteedi monitooringuks.

Antud aptasensoriga kulub MC-LR määramiseks ligikaudu 75 minutit, millest 60 minutit kulub analüüdi sidumisele ning detekteeritava kompleksi moodustumisele. Võrreldes laboratoorsete MC-LR analüüsimeetoditega, mille teostamiseks kulub tavapärast 4-6 tundi [11–13], võimaldab antud meetod määrata toksiini sisaldust proovis oluliselt kiiremini, ehkki võrreldes teiste biosensoritega on tegemist mõnevõrra aeglasema meetodiga. MC-LR kiiremaks määramiseks on edaspidi võimalik samaaegselt vähendada inkubeerimisaegasid ning suurendada detekteerimiseks kasutatava aptameeri kontsentratsiooni.

Kuna töö üks eesmärke oli ka MC-LR analüüside läbiviimine võimalikult madalate kuludega, hinnati ka analüüsi keskmist materjalide kulu ühe mõõtmise tegemiseks, milleks on 4,4€. Võrreldes teiste käesoleval ajal kasutatavate meetoditega on tegemist odavama analüüsimeetodiga.

### **3.3.3. MC-LR biosensori testimine sinivetikakultuuris**

Disainitud aptasensori testimiseks kasutati sinivetikakultuuri ning mõõdeti selle poolt toodetud toksiini MC-LR. Kuna proov sisaldas lõhutud sinivetika rakke ning oli rohelist värvi, siis enne analüüsi tegemist lahjendati proovi 50 korda. Tulemusena saadi korjatud proovi

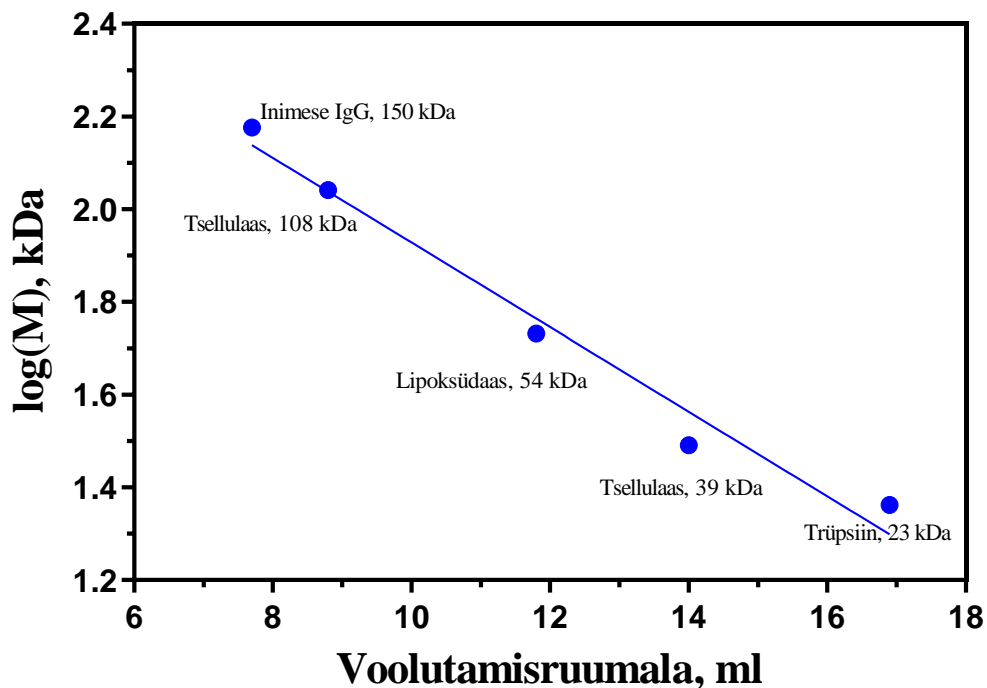
konsentratsiooniks  $3,0 \cdot 10^{-7}$  mg/ml ning selle põhjal saab järeldada, et loodud aptasensor on piisavalt tundlik, et sinivetikakultuurist määrata MC-LR sisaldust, mis on eelduseks selle kasutamisel veeproovidel.

### **3.4. Detekteeritava kompleksi moodustumise uurimine geelfiltratsiooni abil**

Biosensori eeldatava äratundmissüsteemina kasutatava antikeha/MC-LR/aptameer kolmikkompleksi moodustumist uuriti ka geelfiltratsiooni abil, kuna kompleksi moodustavate komponentide molekulmasside erinevus on piisavalt suur: MC-LR molekul 995 Da, kasutatud antikeha ning aptameer vastavalt 150 kDa ja 18,17 kDa.

Kompleksi moodustumise uurimiseks kasutati 29 cm pikkust Sephacryl S-200 HR geeliga täidetud kolonni ( $\varnothing$  1 cm). Parima lahutatavuse saavutamiseks optimeeriti esmalt geelfiltratsiooni läbiviimise meetodikat: voolutamiskiirust, sisse süstitava proovi ruumala ning analüütide kontsentratsiooni. Parim piikide lahutatavus olulises molekulmasside vahemikus (100-200 kDa) saavutati voolukiirusel 0,18 (Lisa 1) ml/min ning proovide kontsentratsioonil 0,5 mg/ml (Lisa 2). Proovi ruumala muutmine ei mõjutanud piikide lahutuvust märkimisväärselt, mistõttu otsustati analüütide kokkuhoiu mõttes edaspidi kasutada proovide ruumalana 50  $\mu$ l (Lisa 3).

Kasutades optimaalseid tingimusi kalibreeriti kolonn kasutades inimese IgG-d (M=150 kDa), tsellulaasi (M=39 ja 108 kDa), lipoksüdaasi (M=54 kDa) ning trüpsiini (M=23 kDa) (Joonis 8). Mitmete kasutatud markerainete (pektinaas, katalaas, glükoosi oksüdaas, ovalbumin ja inimese IgG Fc fragment) kromatogrammide koosnesid mitmest piigist ning need jäeti kalibreerimisgraafikult välja. Kolonni tühirusumala (ingl *void volume*) leidmiseks kasutati dekstraansinist (M=2000 kDa) ning see oli 6,5 ml. Kolonni täisruumala (ingl *total volume*) leidmiseks kasutati kaaliumdikromaati (M=294 Da) ning selle suurus oli 40,2 ml.



**Joonis 8.** Sephacryl S-200 HR (1/29) kolonni kalibratsioonigraafik. Voolutamiseks kasutati 10 mM PBS (0,15 M NaCl, pH 7,2), voolutamise kiirus oli 0,18 ml/min, proovide ruumalad 50 µl, proovide kontsentratsioonid 0,5 mg/ml.

Võimalike komplekside moodustumise uurimiseks analüüsiti ja võrreldi eraldi puhaste monoklonaalse MC-LR antikeha, aptameeri AN6 ja mikrotsüstiini kromatogramme nende ainete segude kromatogrammidega, kusjuures enne analüüside tegemist inkubeeriti segusid erinevatel režiimidel:

- (1) aptameeri lahust inkubeeriti mikrotsüstiiniga enne kolonni süstimist 30 min;
- (2) antikeha inkubeeriti mikrotsüstiiniga 30 min ja seejärel lisati aptameer ja inkubeeriti taaskord 30 min enne kolonni süstimist.

Antikeha ja aptameeri puhaste lahuse ning aptameer/mikrotsüstiini ja antikeha/mikrotsüstiin/aptameeri segulahuste kromatograafilise analüüsi tingimused ja saadud tulemused on kokkuvõtvalt toodud tabelis 4.

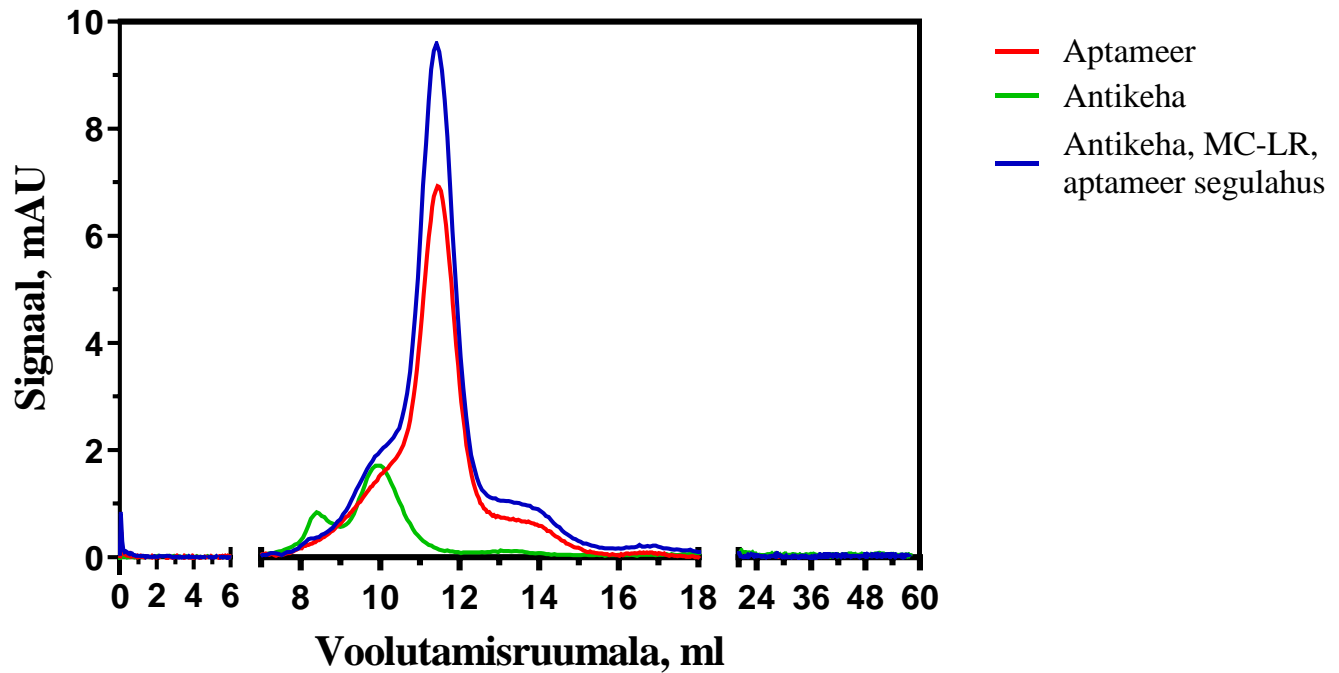
**Tabel 4.** Antikeha ja aptameeri puhaste lahuste ning aptameeri/mikrotsüstiini ja antikeha/mikrotsüstiin/aptameeri segulahuste kromatogrammide andmed (kolonn Sephacryl S-200 HR (1/29), proovi ruumala oli 50 µl, voolutamiskiirus 0,18 ml/min)

<b>Proov</b>	<b>Kontsentratsioon proovis (mg/ml)</b>	<b>Piikide arv (n)</b>	<b>Piigi maksimum (ml) (<math>\pm 4\%</math>)</b>	<b>Piikide kogu pindala</b>
Puhas MC-LR antikeha	0,24	2	8,40 ja 9,99	3,37
Puhas aptameer AN6	0,06	1	11,46	11,77
Aptameer AN6-mikrotsüstiin segulahus	AN6: 0,03 MC-LR: 0,002 AN6:MC-LR moolsuhe 1:1	1	11,61	5,79
MC-LR antikeha-mikrotsüstiin-aptameer AN6 segulahus	MC-LR antikeha: 0,24 MC-LR: 0,07 AN6: 0,06 MC-LR antikeha: AN6: MC-LR moolsuhe 1:2:43	2	8,10 ja 11,50	15,79

Kuna geelfiltratsioonil toimub lahutamine kolonnis vastavalt osakeste suurusele, siis tingituna aptameeri AN6 erinevatest ruumilistest struktuuridest [44] saadi mitmeid erinevaid piike, mis liikusid kolonnist läbi oodatust oluliselt kiiremini. Aptameeri kromatogrammilt võis selgelt välja lugeda kaks piiki, voolutamisruumaladega 8,10 ml ja 11,50 ml ( $\pm 4\%$ ). Antikeha kromatogrammilt oli võimalik samuti eraldada kaks iseloomulikku piiki voolutamisruumaladega 8,40 ml ja 9,99 ml ( $\pm 4\%$ ).

Kuna aptameeri konfiguratsiooni tõttu ei ole võimalik segu lahuste kromatogrammidel olevaid piike iseloomustada molekulmasside alusel, võrreldi piikide kuju ning intensiivsuse ja pindala muutusi. Aptameeri inkubeerimisel MC-LR'ga (eelnevalt kirjeldatud režiim 1) kromatogrammidest erinevusi ei tuvastatud võrreldes aptameeri kromatogrammiga (Lisa 4). Kui segusse lisati kõik 3 uuritavat komponenti (antikeha, MC-LR ja aptameer) ning saadud kromatogramme võrreldi puhaste ainetega kromatogrammidega (Joonis 9), leiti, et segulahusega saadud kromatogrammil puudub piik, mille voolutamisruumala on 8,1 ml ning on suurenenud piigi intensiivsus, mille voolutamisruumala on 11,5 ml, mis võib viidata interaktsioonide tekkele erinevate komponentide vahel. Võrreldes aptameer, antikeha ja antikeha/MC-LR/aptameer lahuste piikide aluseid pindalasisid üksteisega, siis on näha, et

erinevus on alla ühe ühiku ( ca. 6% ), mis viitab sellele, et kõik ained, mis kolonni süstiti, on kolonnist läbi tulnud ja kolonni midagi kinni ei jäänud. Kokkuvõtvalt võib öelda, et kahjuks kasutatud kolonn ei olnud kõige efektiivsem kompleksi tekke uurimiseks. Edaspidises töös oleks vaja leida uus kolonni täidis, mille eraldumisvõime piirkond oleks oluliselt kitsam ning jääks 100 kDa ja 250 kDa vahele. Lisaks tuleks kasutada veel pikemat kolonni või vähendada kolonni diameetrit, et tagada parem lahutatavus erinevate ainete vahel.



**Joonis 9.** Sephacryl S-200 HR (1/29) kolonni kromatogramm: aptameer (punane joon), antikeha (roheline joon) ning antikeha, MC-LR ja aptameer segulahus (sinine joon). Aptameeri ja antikeha kontsentratsioonid on vastavalt 0,06 mg/ml ja 0,24 mg/ml. Antikeha/MC-LR/aptameer segus on MC-LR kontsentratsioon 0,07 mg/ml (aptameeri ja antikeha kontsentratsioonid on vastavalt 0,06 mg/ml ja 0,24 mg/ml). Voolutamise kiirus 0,18 ml/min, sisse süstitud proovi ruumalad 50  $\mu$ l.

## Kokkuvõte

Käesolevas töös disainiti ja konstrueeriti aptasensor sinivetikate poolt toodetava toksiini MC-LR määramiseks. Aptasensoris kasutati graanulsisestusanalüüsi tööpõhimõtet, kus bioaktiveeritud mikrograanulid moodustavad ühekordselt kasutatava mikrokolonnile osaliselt suletud voolukanalis ning proovi läbivoolutamisel toimub uuritava analüüdi seondumine mikrokolonnile. MC-LR aptasensoris kasutati mikrograanulitena monoklonaalsete MC-LR antikehadega aktiveeritud Sephadex G-50 M geeli, mis võimaldab selektiivselt siduda antud toksiini. Kolonnile seondunud MC-LR detekteerimiseks kasutati fluorestsentsmärgisega (Alexa Fluor 647) konjugeeritud aptameeri AN6.

MC-LR määramiseks konstrueeritud aptasensoriga optimeeriti märgistatud aptameeri kontsentratsiooni, suurendati proovis leiduva MC-LR kolonnile seondumiseks aega ning seondunud toksiiniga interakteeruva aptameeri sidumiseks vajalikku aega eesmärgiga saavutada piisav aptasensori tundlikkus, mis võimaldaks aptasensoriga määrata MC-LR kehtestatud piirnormi ( $1 \mu\text{g/l}$ ) võimalikult lühikese aja jooksul. Leiti, et analüüdi sidumisele ning detekteeritava kompleksi moodustamisele kulub 60 minutit ning MC-LR määramiseks kokku ligikaudu 75 minutit.

Biosensori avastamispiiriks, mis arvutati kui taustasignaali + 3 taustasignaali standardhälbe väärtust, saadi  $1,7 \cdot 10^{-8}$  mg/ml ning määramispiiriks, mis arvutati kui taustasignaali + 10 taustasignaali standardhälbe väärtust, saadi  $3,4 \cdot 10^{-8}$  mg/ml. Saadud LOD ning LOQ väärtused on mõlemad alla WHO kehtestatud piirmäära ( $1 \mu\text{g/l}$ ). MC-LR aptasensori kasutamist testiti laboratoorsetes tingimustes kasvatatud sinivetikakultuuris ning selgus, et aptasensori tundlikkus on piisav MC-LR määramiseks ka vetikaid sisaldavates proovides, mis loob head eeldused konstrueeritud aptasensori kasutamiseks looduslikes veekogudes vee kvaliteedi monitooringuks.

## Summary

In the present work, an aptasensor was designed and constructed for the detection of cyanobacterial toxin MC-LR. The aptasensor is integrated with bead injection system, where bioactivated microbeads form a disposable microcolumn in a partially closed flow channel. In the MC-LR aptasensor, Sephadex G-50 M gel activated with MC-LR monoclonal antibodies was used because it selectively binds to the toxin. Fluorescently labeled (Alexa Fluor 647) conjugated aptamer AN6 was used to detect column-bound MC-LR

The labeled aptamer concentration was optimized, the time required to bind to the MC-LR column in the sample, and the time required to bind the bound toxin to the bound toxin was increased to achieve sufficient aptasensor sensitivity to detect MC-LR limits ( $1 \mu\text{g/l}$ ). It was found that it took 60 minutes to bind the analyte and form the detectable complex and about 75 minutes to determine the MC-LR.

The detection limit (LOD) of the biosensor was  $1,7 \cdot 10^{-8} \text{ mg/ml}$  (calculated as the background signal + 3 standard deviation values of the background signal) and the limit of quantitation (LOQ) was  $3,4 \cdot 10^{-8} \text{ mg/ml}$  (calculated as the background signal + 10 standard deviation values of the background signal). The LOD and LOQ values obtained are both below the WHO limit ( $1 \mu\text{g/l}$ ). The use of the MC-LR aptasensor was tested in a laboratory-grown cyanobacterial culture and it was found that the sensitivity of the aptasensor is sufficient to determine MC-LR in cyanobacterial culture. That creates good preconditions for using the designed aptasensor to monitor water quality in natural waters.

## Kasutatud kirjandus

1. Chorus, I.; Welker, M. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management (2nd Ed.)*; CRC Press, 2021.
2. Barceloux, D. G. Cyanobacteria. In *Medical Toxicology of Natural Substances*; John Wiley & Sons, Ltd, 2008; pp 181–190.
3. Edwin, W.; Kardinaal, A.; Visser, P. M. Dynamics of Cyanobacterial Toxins. In *Harmful Cyanobacteria*; Huisman, J., Matthijs, H. C. P., Visser, P. M., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2005; pp 41–63.
4. Greer, B.; Meneely, J. P.; Elliott, C. T. Uptake and Accumulation of Microcystin-LR Based on Exposure through Drinking Water: An Animal Model Assessing the Human Health Risk. *Sci Rep*, **2018**, 8 (1), 4913–4913.
5. Neumann, A.-C.; Wang, X.; Niessner, R.; Knopp, D. Determination of Microcystin-LR in Surface Water by a Magnetic Bead-Based Colorimetric Immunoassay Using Antibody-Conjugated Gold Nanoparticles. *Anal. Methods*, **2016**, 8 (1), 57–63.
6. Rudolph-Böhner, S.; Mierke, D. F.; Moroder, L. Molecular Structure of the Cyanobacterial Tumor-Promoting Microcystins. *FEBS Letters*, **1994**, 349 (3), 319–323.
7. Welker, M.; Steinberg, C. Rates of Humic Substance Photosensitized Degradation of Microcystin-LR in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.*, **2000**, 34 (16), 3415–3419.
8. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water; Health and Ecological Criteria Division Washington, DC. Recommended Human Health Recreational Ambient Water Quality Criteria or Swimming Advisories for Microcystins and Cylindrospermopsin <https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-05/documents/hh-rec-criteria-habs-document-2019.pdf> (accessed Jan 3, 2021).
9. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-Water Quality*, 4th ed.; 2011.
10. International Organization for Standardization. ISO 20179:2005: Water quality — Determination of microcystins — Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection <https://www.iso.org/standard/34098.html> (accessed May 24, 2021).
11. Kaushik, R.; Balasubramanian, R. Methods and Approaches Used for Detection of Cyanotoxins in Environmental Samples: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **2013**, 43, 1349–1383.
12. Massey, I. Y.; Wu, P.; Wei, J.; Luo, J.; Ding, P.; Wei, H.; Yang, F. A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins. *Toxins (Basel)*, **2020**, 12 (10), 641.

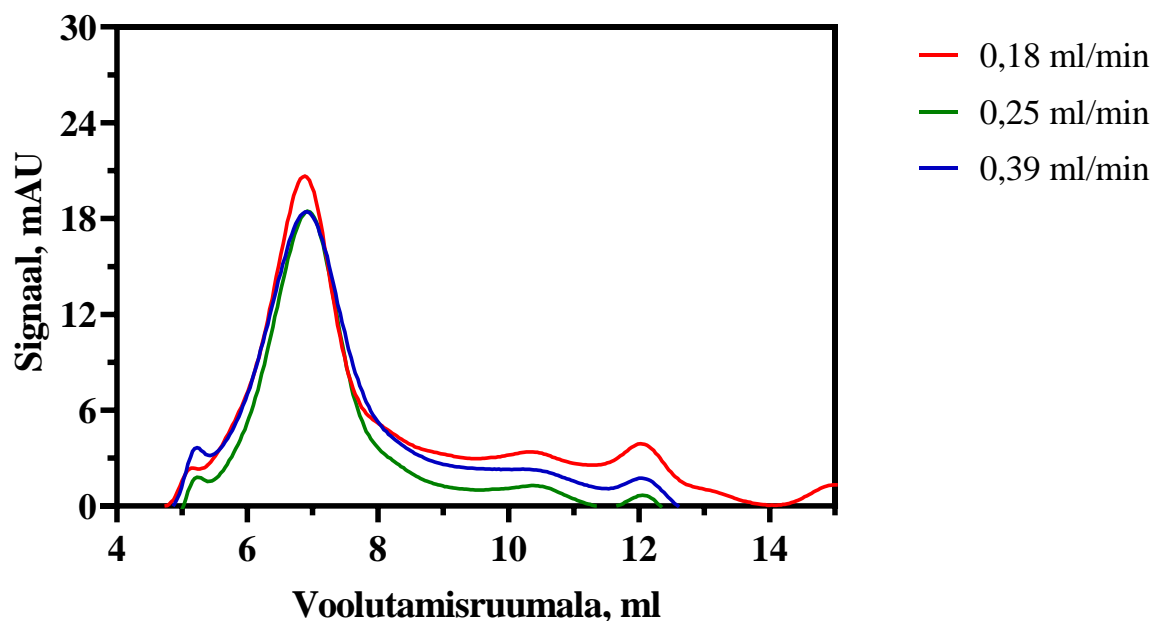
13. Kumar, P.; Rautela, A.; Kesari, V.; Szlag, D.; Westrick, J.; Kumar, S. Recent Developments in the Methods of Quantitative Analysis of Microcystins. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **2020**.
14. Novus Biologicals. Microcystin-LR ELISA Kit (Colorimetric) [https://www.novusbio.com/products/microcystin-lr-elisa-kit\\_ka1496](https://www.novusbio.com/products/microcystin-lr-elisa-kit_ka1496) (accessed May 17, 2021).
15. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water. Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/method-546-determination-total-microcystins-nodularins-drinking-water-ambient-water-adda-enzyme-linked-immunosorbent-assay.pdf> (accessed Jul 18, 2021).
16. Enzo Life Sciences, Inc. Microcystin-LR monoclonal antibody (MC10E7) <https://www.enzolifesciences.com/ALX-804-320/microcystin-lr-monoclonal-antibody-mc10e7/> (accessed Jul 18, 2021).
17. Ward, C. J.; Beattie, K. A.; Lee, E. Y.; Codd, G. A. Colorimetric Protein Phosphatase Inhibition Assay of Laboratory Strains and Natural Blooms of Cyanobacteria: Comparisons with High-Performance Liquid Chromatographic Analysis for Microcystins. *FEMS Microbiol Lett*, **1997**, *153* (2), 465–473.
18. Bouaicha, N.; Maatouk, I.; Vincent, G.; Levi, Y. A Colorimetric and Fluorometric Microplate Assay for the Detection of Microcystin-LR in Drinking Water without Preconcentration. *Food Chem Toxicol*, **2002**, *40* (11), 1677–1683.
19. Rapala, J.; Erkomaa, K.; Kukkonen, J.; Sivonen, K.; Lahti, K. Detection of Microcystins with Protein Phosphatase Inhibition Assay, High-Performance Liquid Chromatography–UV Detection and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Comparison of Methods. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, *466* (2), 213–231.
20. Ren, L.; Hu, Z.; Wang, Q.; Du, Y.; Zong, W. Regulation Efficacy and Mechanism of the Toxicity of Microcystin-LR Targeting Protein Phosphatase 1 via the Biodegradation Pathway. *Toxins*, **2020**, *12* (12).
21. Connelly, J. T.; Baeumner, A. J. Biosensors for the Detection of Waterborne Pathogens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**, *402* (1), 117–127.
22. Li, X.; Cheng, R.; Shi, H.; Tang, B.; Xiao, H.; Zhao, G. A Simple Highly Sensitive and Selective Aptamer-Based Colorimetric Sensor for Environmental Toxins Microcystin-LR in Water Samples. *Journal of Hazardous Materials*, **2016**, *304*, 474–480.

23. Lv, J.; Zhao, S.; Wu, S.; Wang, Z. Upconversion Nanoparticles Grafted Molybdenum Disulfide Nanosheets Platform for Microcystin-LR Sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, *90*, 203–209.
24. He, D.; Wu, Z.; Cui, B.; Jin, Z. A Novel SERS-Based Aptasensor for Ultrasensitive Sensing of Microcystin-LR. *Food Chemistry*, **2019**, *278*, 197–202.
25. Eissa, S.; Ng, A.; Siaj, M.; Zourob, M. Label-Free Voltammetric Aptasensor for the Sensitive Detection of Microcystin-LR Using Graphene-Modified Electrodes. *Anal. Chem.*, **2014**, *86* (15), 7551–7557.
26. Tang, L.; Ouyang, X.; Peng, B.; Zeng, G.; Zhu, Y.; Yu, J.; Feng, C.; Fang, S.; Zhu, X.; Tan, J. Highly Sensitive Detection of Microcystin-LR under Visible Light Using a Self-Powered Photoelectrochemical Aptasensor Based on a CoO/Au/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Z-Scheme Heterojunction. *Nanoscale*, **2019**, *11* (25), 12198–12209.
27. Pang, P.; Teng, X.; Chen, M.; Zhang, Y.; Wang, H.; Yang, C.; Yang, W.; Barrow, C. J. Ultrasensitive Enzyme-Free Electrochemical Immunosensor for Microcystin-LR Using Molybdenum Disulfide/Gold Nanoclusters Nanocomposites as Platform and Au@Pt Core-Shell Nanoparticles as Signal Enhancer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, *266*, 400–407.
28. Perumal, V.; Hashim, U. Advances in Biosensors: Principle, Architecture and Applications. *Journal of Applied Biomedicine*, **2014**, *12* (1), 1–15.
29. Nelson, David L.; Cox, Michael M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Seventh Edition.; W. H. Freeman and Company, 2017.
30. Enzo Life Sciences, Inc. Microcystins (Adda specific) ELISA kit  
<https://www.enzolifesciences.com/ALX-850-319/microcystins-adda-specific-elisa-kit/>  
(accessed Jul 19, 2021).
31. Zeck, A.; Eikenberg, A.; Weller, M. G.; Niessner, R. Highly Sensitive Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody Specific for [4-Arginine]Microcystins. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, *441* (1), 1–13.
32. Wu, Y. X.; Kwon, Y. J. Aptamers: The “Evolution” of SELEX. *Methods*, **2016**, *106*, 21–28.
33. Ng, A.; Chinnappan, R.; Eissa, S.; Liu, H.; Tlili, C.; Zourob, M. Selection, Characterization, and Biosensing Application of High Affinity Congener-Specific Microcystin-Targeting Aptamers. *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, *46* (19), 10697–10703.

34. Vogiazzi, V.; de la Cruz, A.; Mishra, S.; Shanov, V.; Heineman, W. R.; Dionysiou, D. D. A Comprehensive Review: Development of Electrochemical Biosensors for Detection of Cyanotoxins in Freshwater. *ACS Sens*, **2019**, *4* (5), 1151–1173.
35. S. K. Hartwell, G. D. Christian & K. Grudpan. Bead Injection with a Simple Flow-Injection System: An Economical Alternative for Trace Analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, *23* (9), 619–623.
36. Ave Kuusk. Biosensorsüsteemi Konstrueerimine Staphylococcus Aureus'e Määramiseks. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool: Tartu, 2010.
37. E. Viirlaid, M. Illisson, S. Kopanchuk, U. Mäeorg, A. Rincken & T. Rincken. Immunoassay for Rapid On-Site Detection of Glyphosate Herbicide. *Environmental Monitoring and Assessment*, **2019**, *191* (8), 1–12.
38. D. Juronen. Biosensing System for the Rapid Multiplex Detection of Mastitis-Causing Pathogens in Milk. PhD Thesis, Tartu Ülikool: Tartu, 2018.
39. Thermo Fisher Scientific Inc. *Protein A280*; Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers; 2010.
40. Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Cyanobacteria Medium BG11+ [https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium1593.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium1593.pdf) (accessed May 8, 2021).
41. D. Peedel & T. Rincken. Rapid Biosensing of Staphylococcus Aureus Bacteria in Milk. *Analytical Methods*, **2014**, *6* (8), 2642–2647.
42. Merck KGaA. Sephadex® G-50 <https://www.sigmaaldrich.com/EE/en/life-science/ecommerce/ecommerce-faq>.
43. Rain Laidma. Biosensor Sinivetika Toksiini Mikrotsüstiin-LR Määramiseks. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool: Tartu, 2019.
44. Zhao, L.; Huang, Y.; Dong, Y.; Han, X.; Wang, S.; Liang, X. Aptamers and Aptasensors for Highly Specific Recognition and Sensitive Detection of Marine Biotoxins: Recent Advances and Perspectives. *Toxins*, **2018**, *10* (11).

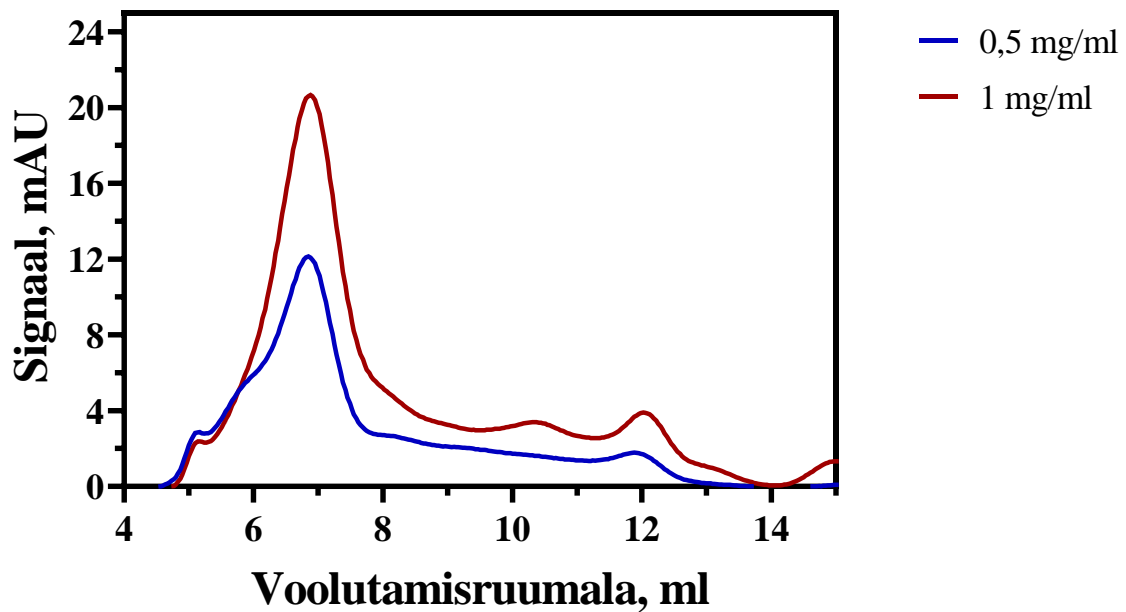
## Lisad

### Lisa 1. Erinevate voolukiiruste kromatogrammid



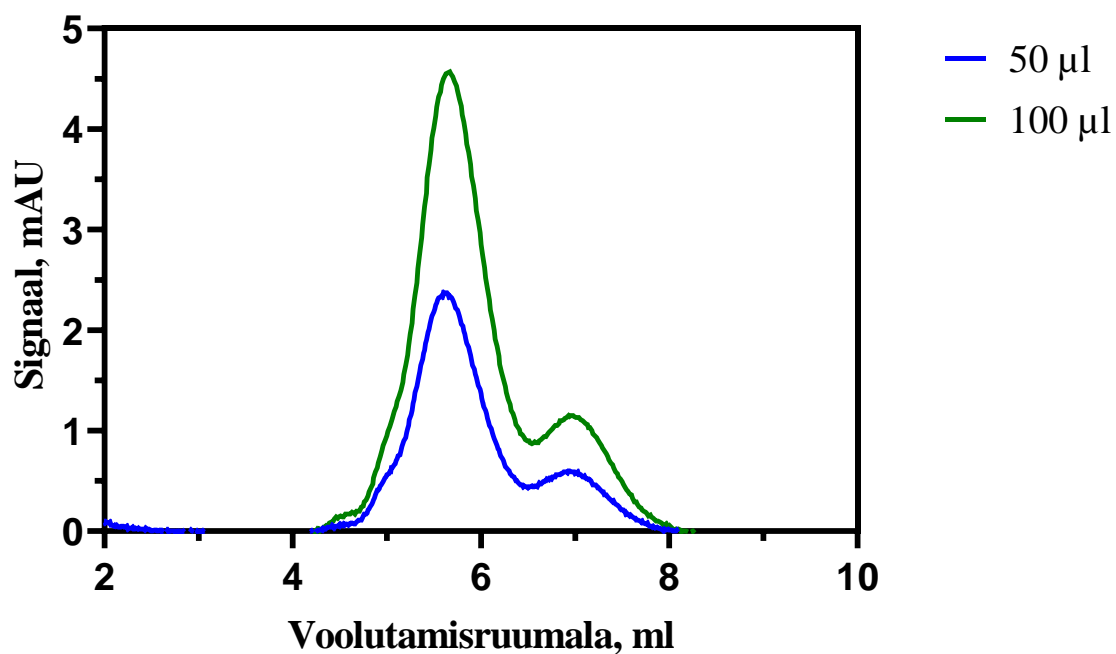
**Joonis L1.** Sephacryl S-200 HR (1/15,5) kolonni kromatogrammid: voolukiirus 0,18 ml/min (punane joon), voolukiirus 0,25 ml/min (roheline joon) ning voolukiirus 0,39 ml/min (sinine joon). Markerainetena kasutati glükoosi oksüdaasi ( $M=160$  kDa, ainult punane ja roheline joon), lipoksüdaasi ( $M=54$  kDa), ovalbumini ( $M=45$  kDa), trüpsiini ( $M=23$  kDa), pektinaasi ( $M=20-60$  kDa) ning tsellulaasi ( $M=39$  ja  $108$  kDa). Voolutamiseks kasutati 10 mM PBS (0,15 M NaCl, pH 7,2), sisse süstitud proovi ruumalad  $100 \mu\text{l}$ , proovide kontsentratsioonid 1 mg/ml.

## Lisa 2. Erinevate proovi kontsentratsioonide kromatogrammid



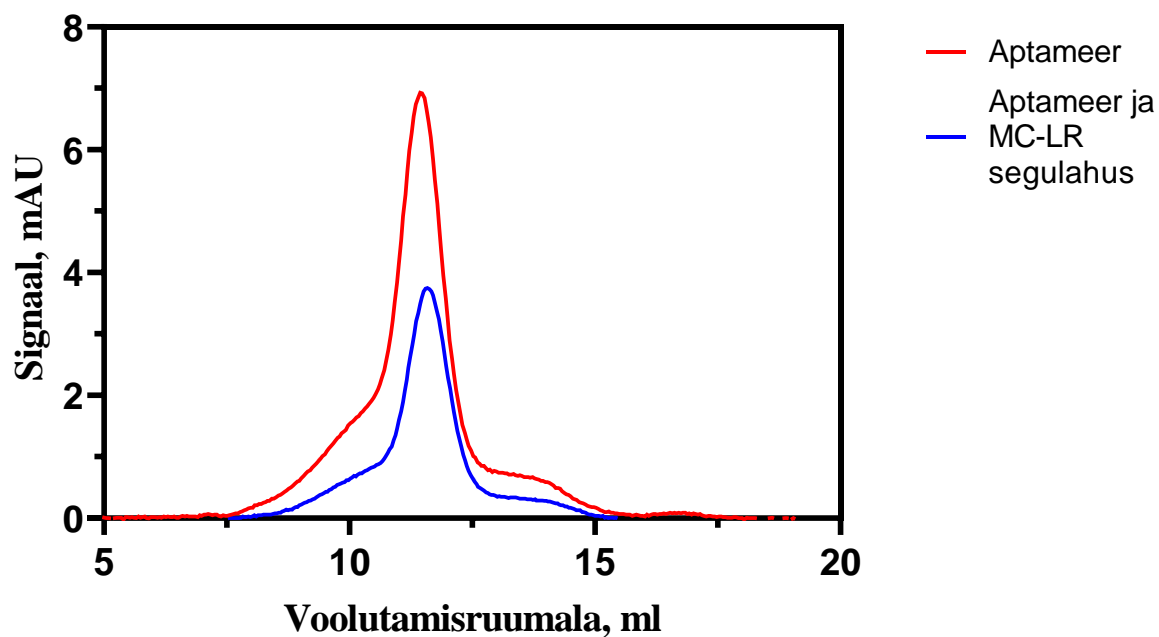
**Joonis L2.** Sephacryl S-200 HR (1/15,5) kolonni kromatogrammid: proovi kontsentratsioon 1 mg/ml (punane joon) ning proovi kontsentratsioon 0,5 mg/ml (sinine joon). Markerainetena kasutati glükoosi oksüdaasi (M=160 kDa), lipoksüdaasi (M=54 kDa), ovalbumini (M=45 kDa), trüpsiini (M=23 kDa), pektinaasi (M=20-60 kDa) ning tsellulaasi (M=39 ja 108 kDa). Voolutamiseks kasutati 10 mM PBS (0,15 M NaCl, pH 7,2), voolukiirus 0,18 ml/min, sisse süstitud proovi ruumalad 100 µl.

### Lisa 3. Erinevate proovi ruumalade kromatogrammid



**Joonis L3.** Sephacryl S-200 HR (1/15,5) kolonni kromatogrammid: süstitud proovi ruumala 100 µl (roheline joon) ning süstitud proovi ruumala 50 µl (sinine joon). Markerainetena kasutati glükoosi oksüdaasi ( $M=160$  kDa), inimese IgG-d ( $M=150$  kDa) ning inimese IgG Fc fragmenti ( $M=50$  kDa) Voolutamiseks kasutati 10 mM PBS (0,15 M NaCl, pH 7,2), voolukiirus 0,18 ml/min, proovide kontsentratsioonid 0,05 mg/ml.

#### Lisa 4. Aptameeri ja Aptameer/MC-LR segulahuse kromatogrammid



**Joonis Lisa 4.** Sephacryl S-200 HR (1/29) kolonni kromatogrammid: aptameer (punane joon) ning aptameer ja MC-LR segulahus (sinine joon). Aptameeri kontsentratsioon on 0,06 mg/ml. Aptameer/MC-LR segus on MC-LR kontsentratsioon 0,002 mg/ml ning aptameeri kontsentratsioon on 0,03 mg/ml. Voolutamise kiirus 0,18 ml/min, sisse süstitud proovi ruumalad 50  $\mu$ l.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Rasmus Rohtla,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

### **Aptasensor tsüanobakterite toksiooni mikrotsüstiin-LR määramiseks,**

mille juhendajad on Toonika Rincken, Kairi Kivirand ja Eerik Jõgi,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **26.07.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Rasmus Rohtla*

**26.07.2021**