

**ELISA SİSTEMLERİ İÇİN YENİ BİR ALTERNATİF TEKNOLOJİ:
TEKRAR KULLANILABİLİR AFİNİTE KUYUCUKLAR**

Şeyda BASKINCI
Yüksek Lisans Tezi
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Eylül 2012

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şeyda Baskıncı'nın " ELISA Sistemleri İçin Yeni Bir Alternatif Teknoloji: Tekrar Kullanılabilir Afinite Kuyucuklar" başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 16.08.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. RIDVAN SAY	
Üye :	Doç. Dr. LÜTFÜ GENÇ	
Üye :	Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELISA SİSTEMLERİ İÇİN YENİ BİR ALTERNATİF TEKNOLOJİ: TEKRAR KULLANILABİLİR AFİNİTE KUYUCUKLAR

Şeyda BASKINCI

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji

Danışman; Prof. Dr. Rıdvan SAY

2012, 74 Sayfa

Enzim bağlı immunosorbant testleri (ELISA) peptidler, proteinler, antikorlar ve hormonlar gibi maddelerin belirlenmesi ve sayısal olarak değerlendirilmesi için dizayn edilmiş plaka temelli testlerdir. Tayin, konjuge edilmiş enzim aktivitesini kullanarak ölçülebilir bir ürün üreten substratın inkübasyonu yolu ile gerçekleşir. Bir enzim doğrudan olarak birincil antikora bağlanabilir ya da bu birincil antikor biyotin işaretli ise streptavidin gibi bir proteine bağlanabilir. En yaygın kullanılan enzimler Horseradish Peroksidaz ve alkalinfosfatazdır. β -galaktozidaz, asetilkolinesteraz ve katalaz da ELISA işleyişinde kullanılabilir. Substrat seçimi sinyal-tespit için uygun bir (spektrofotometre ya da florimetre gibi) cihaza dayanır. ELISA, antikorlar veya proteinler ile kaplanan 96 kuyucuk taşıyan polistren plakalarda gerçekleşir. Bu plakalar tek kullanımlıktır. Piyasada bulunan Protein A, G, C kaplı, Biyotin kaplı, Streptavidin kaplı, amin kaplı yada antikor kaplı modifiye mikrolakalar ELISA için tercih edilir.

Bu çalışmada; ELISA prosedüründe kullanılan polistren mikrolaka kuyularının modifikasyonu ile tekrar kullanılabilir mikrolakalar elde edilmiştir. Plazma yöntemi ile amin kaplanan polistren plaka kuyular, fotosensitif monomerler kullanılarak yapılan modifikasyonlarla antikorlar yada diğer proteinlerin yüzeye çapraz bağlanması için uygun hale getirilmiştir.

Anahtar kelimeler: ELISA, HRP, Fotosensitif monomer, ANADOLUCA

ABSTRACT

Master of Science Thesis

A NEW ALTERNATIVE TECHNOLOGY FOR ELISA: REUSABLE AFFINITY WELLS

Şeyda BASKINCI

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Advanced Technologies Program

Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Rıdvan SAY

2012, 74 Pages

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are plate-based assays designed for detecting and quantifying substances such as peptides, proteins, antibodies and hormones. Detection is accomplished by assessing the conjugated enzyme activity via incubation with a substrate to produce a measurable product. An enzyme can be linked directly to the primary antibody or a protein such as streptavidin if the primary antibody is biotin labeled. The most commonly used enzymes are horseradish peroxidase (HRP) and alkaline phosphatase (AP). β -galactosidase, acetylcholinesterase and catalase can be used for performing the ELISA. The choice of substrate depends upon the instrumentation (spectrophotometer, fluorometer) available for signal-detection. ELISA is performed in 96-well (or 384-well) polystyrene plates which will bind antibodies and proteins are disposable. Protein A, G, C coated, Biotin coated, Streptavidin coated, nickel coated, copper coated, amine coated or antibody coated modified microplates are preferred for ELISA.

In this study, the re-usable microplates by the modification of the polystyrene microplate wells used in the ELISA procedure have been obtained. Polystyrene plate wells, coated with the amine by plasma method, have been made suitable for antibodies or other proteins cross-linking to the surface by modification using photosensitive monomers.

Keywords: ELISA, HRP, Photosensitive monomers, ANADOLUCA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca beni her zaman destekleyen, motive eden ve hep anlayışla bana yol gösteren Danışman Hocam Prof. Dr. Rıdvan SAY'a,

BİBAM'da bulunamadığım süre zarfında bana anlayış ve desteklerini esirgemedikleri için BİBAM Müdürü Doç. Dr. Lütfi GENÇ'e ve BİBAM Müdür Yardımcısı Doç. Dr. Deniz HÜR'e,

Hem laboratuvar hem de teorik çalışmalarım sırasında bana bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Prof. Dr. Arzu Ersöz, Yard. Doç. Dr. Lokman Uzun'a, Yrd. Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ 'e, Yrd. Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN'a, Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ'a ve Arş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER'e,

Çalışmam boyunca her zaman destekleriyle bana yardım eden sevgili arkadaşlarım Şennur GÖRGÜLÜ ve Ender KÖSE'ye,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım AİLEM'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Şeyda BASKINCI

Eylül 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1.İmmünolojik Teknikler.....	2
1.2.ELISA Testi.....	4
1.2.1.Antijen arama için kullanılan yöntemler.....	8
1.2.2.Antikor arama amacıyla kullanılan yöntemler.....	9
1.3.Biyokonjugasyon.....	10
1.3.1.Çapraz bağlama reaktifleri	13
1.3.1.1.NHS.....	17
1.3.1.2.EDC.....	20
1.3.2. Antikor-enzim konjugasyon yöntemleri.....	22
1.3.2.1.İmmunoglobulin yapısı ve özellikleri.....	23
1.3.2.2.Antikor-enzim konjugatlarının hazırlanması.....	26
1.3.2.3. Horseradish Peroksidaz (HRP) yapısı ve konjugasyonu.....	34
1.4.Fotosensitif amino asit monomerleriyle çağraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi ile biyokonjugasyon.....	39
1.5.Plazma Yöntemi İle Polistren Plaka Modifikasyonu.....	40
2.MATERYAL VE YÖNTEM.....	45
2.1.Materyal.....	45
2.2.Yöntem.....	46
2.2.1. İnvitrogen ELISA Kit İçinden Çıkan Protokolün Uygulanması.....	46

2.2.2.Nano-HRP sentezi ve anti- TNF- α antikorları ile biyokonjugasyonu.....	47
2.2.3.Radyo Frekans Plazma yöntemi kullanılarak mikrolakaların modifikasyonu.....	48
2.2.4.Amin gruplar bağlanmış mikrolaka kuyularına nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikorı kaplanması ve elde edilen modifiye mikrolakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-1).....	48
2.2.5.Amin gruplar bağlanmış mikrolaka kuyularına anti-TNF- α antikorı kaplanması ve elde edilen modifiye mikrolakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-2).....	50
2.2.6.Amin gruplar bağlanmış mikrolaka kuyularına FcRn reseptörü kaplanması ve elde edilen modifiye mikrolakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-3).....	51
2.2.7.Amin gruplar ve fotosensitif monomerler bağlanmış mikrolaka kuyularına FcRn reseptörü aracılığı ile anti-TNF- α antikorlarının kaplanması sonucunda elde edilen modifiye mikrolakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-4).....	53
2.2.8.Amin gruplar ve fotosensitif monomerler bağlanmış mikrolaka kuyularına Streptavidin aracılığı ile Biotinli anti-TNF- α antikorlarının kaplanması sonucunda elde edilen modifiye mikrolakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-5).....	54
3. BULGULAR VE SONUÇLAR	56
3.1.Invitrogen ELISA Kit protokolünün sonuçları.....	56
3.2.Nano-HRP Karakterizasyonu.....	57
3.3.Modifiye Mikrolakalar Kullanılarak Yapılan ELISA Sonuçları.....	57
3.3.1.Yüzeylerine nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikorı kaplanan mikrolakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-1).....	57
3.3.2.Yüzeylerine anti-TNF- α antikorı kaplanan mikrolakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-2).....	58
3.3.3.Yüzeylerine FcRn reseptörleri kaplanan mikrolakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-3).....	59
3.3.4.Yüzeylerine FcRn reseptörleri aracılığı ile anti-TNF- α antikorı kaplanan mikrolakalar ile yapılan ELISA sonuçları(Yöntem-4).....	61
3.3.5.Yüzeylerine Streptavidin aracılığı ile Biotinli anti-TNF- α antikorı kaplanan mikrolakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-5).....	63
3.4.Sonuçların Analitik Olarak Değerlendirilmesi.....	64
4.TARTIŞMA VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.Antijen-Antikor Arası Bağlanma.....	3
1.2.Antijen-Antikor Bağlanmasının 3 Boyutlu Görüntüsü	3
1.3.Örnek bir ELISA protokolü.....	6
1.4.Farklı Çeşitlerde ELISA Protokollerine Örnekler; A) İndirekt ELISA B) Sandviç ELISA C)Kompetitif ELISA.....	10
1.5.1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodimid hidroklorür (EDC) çapraz bağlayıcısı kullanılarak BSA proteinin P(VP-co-AA) kopolimeri ile konjugasyon reaksiyonu.....	12
1.6. Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi.....	13
1.7.Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi.....	15
1.8. NHS molekülünden NHS ester oluşumu.....	17
1.9. Sülfö NHS ester molekülü.....	18
1.10.Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan N-Hidroksisüksinimid esterleri.....	19
1.11.NHS ester kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması.....	20
1.12.EDC Plus Sülfö-NHS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması.....	22
1.13.İmmünglobulinin şematik yapısı.....	24
1.14.Sülfidril içeren antikor molekülü ile birleşmeyi sağlamak için enzim molekülündeki amin grupları ile SMCC'nin reaksiyonu	27
1.15.Tiol grupları içeren yarım antikor molekülleri elde etmek için IgG molekülünün disülfid bağlarından ayrılması	29
1.16.Antikorların SMCC aktif enzimle konjugasyonu için sülfidril oluşturan 2-iminotiolane ile modifikasyonu	29
1.17.Antikor molekülünde terminal korunmuş sülfidril içeren amit bağı oluşturmak için SATA ajanının NHS ester ucuyla antikorun amin grupların modifikasyonu	30

1.18.Gluteralehit antikor-enzim çapraz bağlanma prosesi (tek basamaklı yöntem).	31
1.19.HRP gibi glukoprotein olan enzimlerin reaktif aldehit kökler oluşturan sodyum periyodat ile oksidasyonu.....	32
1.20.Antikor molekülündeki polisakkarit gruplar aldehit oluşturan periyodat ile akside olur. hidrozan bağlarında biyotin hidrojid ile modifikasyon	34
1.21.Bayır turbu (yaban turbu, Horseradish, <i>Armoracia rusticana</i>) bitkisi...	35
1.22.X-ışını kristalografisi ile HRP'nin üç boyutlu molekül yapısı.....	36
1.23.HRP enziminin çalışma mekanizması	37
1.24.Enzim-antikor konjugasyonunda SMCC kullanımı.....	38
1.25.Plazma halin zellikleri.....	41
1.26.Oksijen plazması sonrası polietilen polimerinin yapısı.....	42
1.27.Üç basamaklı plazma yöntemi.....	43
1.28.Silanlama işleminde kullanılan maddeler ve sonrasında yüzeylerin kazandığı zellikler.....	44
1.29.Afm görüntüleri; A: işlem yapılmamış plaka. B: Silanlanmış plaka. C: Plasma uygulaması yapılmış..D: Plasma uygulanmış silanlanmış plaka	44
2.1.ELISA protokolü.....	47
2.2.Plazma yöntemi ile plaka kaplama işlemi.....	48
2.3.Yzeeye anti-TNF- α antikor konjuge HRP bağlandığı yöntem.....	49
2.4.Yzeeye anti-TNF- α antikoru bağlandığı yöntem.....	51
2.5.FcRn kaplı mikropalakalarda ELISA işlemi.....	52
2.6.FcRn ve antikor kaplı mikropalakalarda ELISA işlemi.....	54
2.7.Streptavidin ve Biyotinli antikor kaplı mikropalakalarda ELISA işlemi.	55
3.1.ELISA kit prosedürü uygulandığında elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	56
3.2.Nano HRP TEM görüntüsü.....	57
3. 3.Yüzey kaplaması Anti-TNF- α antikor ile yapılan çalışma sonuçları....	58
3.4.4.ELISA sonucu oluşan renk değişimleri.....	58
3.5.Anti-TNF- α antikoru ile kaplı kuyular ile yapılan ELISA sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	59

3.6.FcRn kaplı kuyularda yapılan ELISA işleminde oluşan renk dönüşümleri.....	60
3.7.FcRn kaplı kuyularda yapılan 5. ELISA işleminde oluşan renk dönüşümleri.....	60
3.8.FcRn kaplı kuyular kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen absorbands değerleri.....	61
3.9.FcRn reseptörleri ve anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 1.ELISA sonuçları.....	62
3.10.FcRn reseptörleri ve anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 5.ELISA sonuçları.....	62
3.11.FcRn ve Anti-TNF- α antikoru ile kaplı kuyular ile yapılan ELISA sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	62
3.12.Streptavidin ve biyotinli anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 1.ELISA sonuçları.....	63
3.13.Streptavidin ve biyotinli anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 5.ELISA sonuçları.....	63
3.14.Streptavidin ve Biyotinli Anti-TNF- α antikoru ile kaplı kuyular ile yapılan ELISA sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.İmmünolojik tekniklerin sınıflandırılması.....	2
1.2.Plazma yönteminde kullanılan bazı gazların kullanım alanları ve etkileri.....	41
4.1.Thermo Firması Ürünleri	66
4.2.Bioword Firması Ürünleri	67

1. GİRİŞ

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere genel olarak enzim immunotest (Enzim Immuno Assay, EIA) denir. Radyoimmünötestler (Radio Immuno Assay, RIA) EIA'dan daha önce kullanılmaya başlanmış, ancak işaretleme için I^{125} gibi kısa ömürlü izotopların kullanılması, toplum sağlığını ve çevreye zararlı radyoaktif madde kullanımı, RIA'nın endokrinoloji laboratuvarlarında kullanımı ile sınırlı kalmasına neden olmuştur. İmmün Floresan (IF) teknikleri RIA'dan daha yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak IF tekniklerinin uygulanmasında iyi eğitilmiş eleman gereksinimi ve sonuçların yorumlanmasının subjektif olması bu tekniklerin de yaygın kullanımını engellemektedir.

Enzim bağlı immünosorbant test sistemleri (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA), 1960'larda radioimmunoassay yöntemlerine alternatif aranırken bulunmuştur. EIA'da kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması ve otomatize edilebilmesi diğer iki tekniğe olan üstünlükleridir. Daha önemlisi laboratuvarlara çok fazla sayıda örnekle çalışma olanağı verme yanında analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır. EIA diye isimlendirilen yöntemler, homojen ve heterojen olmak üzere iki çeşittir. Homojen tekniklerde, enzim bir hapten ile konjuge haldedir. Tekniğin esası, bu konjugatın antikor ile reaksiyona girmesi halinde enzim aktivitesinin başlamasına dayanır. Ancak bu tekniğin düşük moleküler ağırlıklı maddeler kullanma zorunluluğunun bulunması, pahalı ve zahmetli olması gibi dezavantajları vardır. Bu nedenlerden dolayı fazla sık kullanılmazlar. Heterojen EIA'da bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılırlar. ELISA, heterojen EIA'ya örnektir (Çırak 1999).

Antikor veya antijen aranmasında kullanılan serolojik testlerden biri olan ELISA yöntemi antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugant ve enzim substratı kullanılarak renk oluşumu esasına dayanan bir testtir. Neye özgül olduğu bilinen antijen ile örneklerdeki antikoru, tipini,

miktarını veya antikor var ise de buna özgü antijen ve miktarı saptanabilir (Okay 2006).

ELISA testi son derece duyarlı ve kesin sonuçlar veren bir test olmasına rağmen kitlerinin tek kullanımlık olması, kitlerin pahalı olması ve ülke ekonomisi açısından bakıldığında dışa bağımlılığın söz konusu olması çözülmesi gereken problemlerdir.

Bu çalışmanın amacı, mikropalakaların tekrar kullanılabilir hale dönüştürülmesi ve raf ömürlerinin uzatılmasıdır.

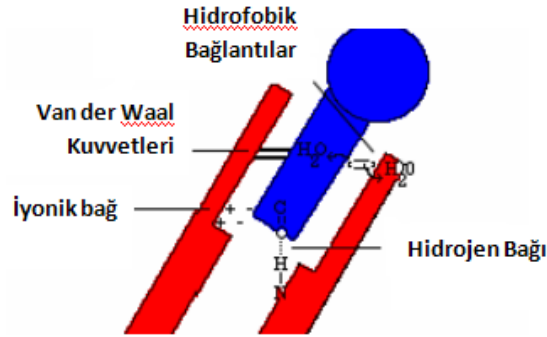
1.1. İmmünolojik Teknikler

İmmünolojik teknikler, antijen-antikor etkileşmesine dayanan analiz yöntemleridir. Bu yöntemlerde bilinen bir antijen olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antikor veya bilinen bir antikor olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antijen saptanabilir. Ayrıca örnek materyal içerisindeki özgül antijen veya antikor miktarları niceliksel testlerle saptanabilir. İmmünolojik teknikler Çizelge 1.1’ de sınıflandırılmıştır.

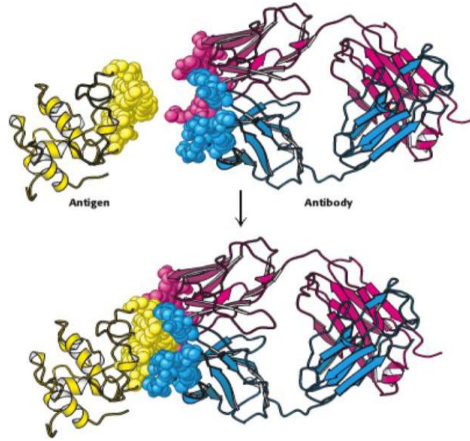
Çizelge 1.1. İmmünolojik tekniklerin sınıflandırılması

İmmünolojik teknikler	
Kalitatif yöntemler	Kantitatif yöntemler
-Presipitasyon	-Türbidimetrik ve nefelometrik ölçümler
-Ring testi (halka deneyi)	-İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler
-Tüpte sulandırma yöntemi	-Radioimmunoassay (RIA)
-Jelde presipitasyon (immünodifüzyon)	-Enzim immunoassay (EIA)
-Radyal immünodifüzyon	
-Çift yönlüimmünodifüzyon	
-İmmünoelektroforez	
-Flokülasyon	
-Aglütinasyon	
-Kompleman fiksasyon testi	

Antijen ve antikor birleşimlerinin özellikleri immunolojik teknikler için büyük önem taşır. Antijen-antikor birleşmesi spesifik bir olaydır. Fakat birbirine benzeyen gruplar arasında da birleşme olabilir. Buna ‘çapraz reaksiyon’ adı verilir. Diğer taraftan antijen-antikor birleşmesi kimyasal bir olaydır. Bu birleşmede kovalent olmayan bağlar rol oynar (Şekil1.1). Ayrıca antijen-antikor birleşmesi tersinirdir. Antijen ve antikor multivalan olduklarından ve reaksiyon için bütün valansların doyması şart olmadığından değişik oranlarda birleşir. Antijen-antikor birleşmesinde pH, tuz konsantrasyonu ve ısınnın da etkisi vardır (Altınışık 2004).



Şekil 1.1. Antijen-Antikor Arası Bağlanma (Altınışık 2004).



Şekil 1.2. Antijen-Antikor Bağlanmasının 3 Boyutlu Görüntüsü (Altınışık 2004).

1.2. ELISA Testi

ELISA yöntemi, AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) tanısı için yaygın kullanımı ile bilinen immunolojik bir tanı yöntemidir. 1985 yılında antikor testlerinin bulunması ile dünyanın her yerinde kan ve kan ürünlerinin hastaya verilmeden önce HIV (Human Immunodeficiency Virus) yönünden test edilmesi zorunlu hale getirilmiştir. Ülkemizde 1987 yılından beri tüm kan ve kan ürünlerine ELISA yöntemi ile test yapıldıktan sonra hastaya verilmektedir. Bu test HIV tanısında, taramasında ucuz olması, standardize edilmiş bir yöntem olması, güvenilirliğinin % 97,3 oranında olması ve çabuk sonuç vermesi yönünden en fazla kullanılan yöntemlerdendir (Tümer ve Ünal 2001).

ELISA yönteminde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Serodiagnostikde kolay ve hızlı olmasından dolayı geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

ELISA yöntemine Engwall ve Perlmann öncülük etmişler, 1971 yılında antijen veya antikorları radyoizotop yerine enzim ile konjuge ederek immunolojik bir yöntem geliştirmişlerdir.

Carlson ve arkadaşları 1972’de, Holmgren ve Svennerholm 1973’de, Voller 1974’de diagnostik mikrobiyolojide ELISA testini kullanmışlardır. 1978’de Bishai ve Galli, 1979’da Leinikki ve arkadaşları, 1980’de ise Ukkonen ve arkadaşları Influenza, Parainfluenza ve Mumps viruslarının neden olduğu enfeksiyonların tanısında ELISA yönteminden yararlanmışlardır. ELISA testi, 1980 yılında Ukkonen tarafından modifiye edilerek ve mikrotitrasyon plakalar kullanılarak denenmiştir.

ELISA yönteminde antijen veya antikor, katı bir faza bağlanmaktadır. Katı faz olarak rigid polisitren, polivinil veya polipropilenden yapılmış tüpler ve mikroplakaların daha uygun olduğu belirtilmiştir.

Antijen ve antikoru uygun bir şekilde adsorbe eden ve diğer safhalarda yer alan komponentleri adsorbe etmeyen özellikte mikroplakalar tercih edilmelidir.

ELISA’da enzim olarak beta galaktozidaz, glukozoksidaz, peroksidaz ve alkalın fosfotaz kullanılmaktadır.

Alkalın fosfataz ile P-nitrofenil fosfat, substrat olarak kullanılmakta, emniyetli tablet formda bulunmakta ve pozitif reaksiyonda sarı bir renk oluşturmaktadır.

Peroksidaz konjugat için substrat olarak, 5 amino salisilik asid ve O-fenilendiaminden yararlanılmakta ve kahverengi bir renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak kabul edilmekte, substrat olarak tetrametil benzidin kullanıldığında ise mavi renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak kabul edilmektedir (Altınışık 2004).

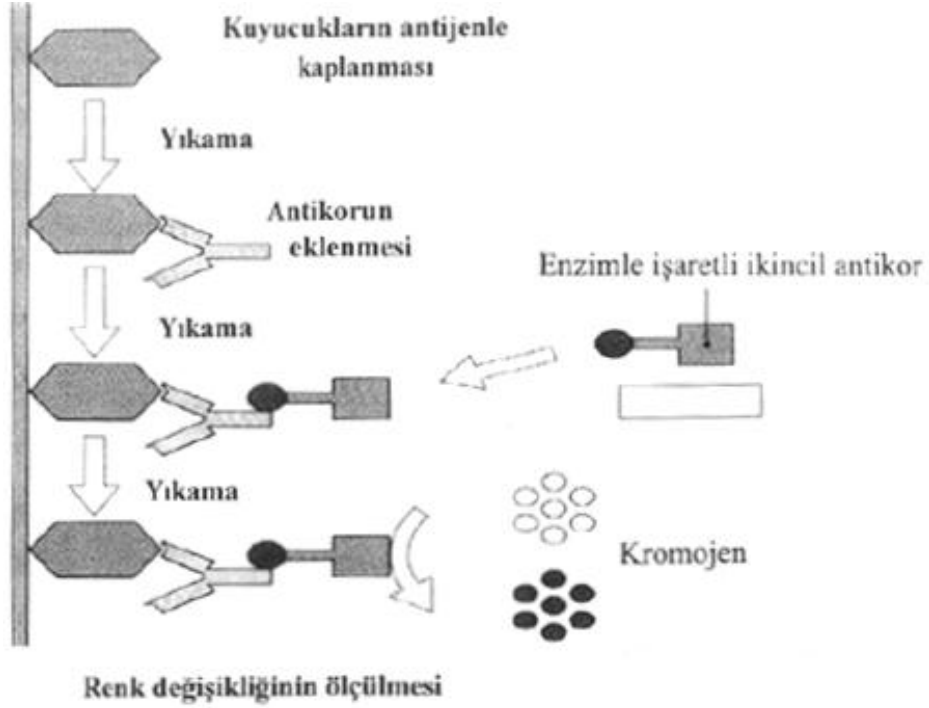
Peroksidaz, alkalin fosfataz ve beta-galaktozidaz substratları ile renkli ürünler oluşturabilme yeteneğinde olan enzimlerdir. Bu renkli ürünler standart spektrofotometrede okutulabilir. Beta-galaktozidaz kullanılmışsa florimetrede okutulmalıdır (Çırak 1999).

Enzimlerin katabolik etkileri enzim substrasyon reaksiyonu esnasında immunolojik reaksiyonun hem hızlanmasını hem özgüllüğünü sağlamaktadır. Enzim substrat reaksiyonu genellikle 30-60 dakika içinde tamamlanır. Reaksiyon H_2SO_4 ile durdurulabilir ve sonuçlar, kullanılan konjugatın özelliğine göre 400-600 nm de okutulur.

ELISA testinin her evresi için aşağıda belirtilen optimum şartlar gereklidir.

- 1- Katı fazın kaplamasında antijen veya antikor optimum konsantrasyonda olmalıdır.
- 2- İnkübasyon süresi ve sıcaklığı optimum olmalıdır.
- 3-En uygun substrat seçilmelidir.

ELISA'da kullanılan antijen ve antikorlar steril koşullarda yıllarca saklanabilir. ELISA, faktör VIII ile ilgili antijenler, çeşitli tümör belirteçleri ve IgG (immünoglobulin G), IgM (immünoglobulin M) gibi antikorların ölçümünde kullanılabilir (Altınışık 2004).



Şekil 1.3. Örnek bir ELISA protokolü

Şekil 1.3’de örnek bir ELISA protokolü yer almaktadır. ELISA plakları hazırlanırken antijen aranacaksa antijene özgül antikor veya antikor aranacaksa antikora özgül antijen katı faza (plastik çukur veya boncuğa) bağlanmalıdır. Plakların kaplanma işlemi, 2 saat 37°C’de ya da bir gece oda ısısında veya +4°C’de bekletildikten sonra yıkama yapılarak gerçekleştirilir.

ELISA yönteminin birçok uygulama alanı vardır: TORCH (Toxoplasma gondii, rubella, CMV, HSV) ajanlarına özgül IgG ve IgM antikorları saptanmaktadır. Legionella pneumophila, Mycoplasma pneumoniae, Treponema pallidum, Chlamydia trachomatis, Rickettsia, Neisseria gonorrhoeae, Mycobacterium türleri ve Brucella türlerinin serolojik tanılarında başarıyla kullanılmıştır. Hepatit viruslarına (Hepatit A, B, C, D ve E) karşı oluşan özgül antikorlar, HIV, RSV (Respiratory syncytial virus) ve diğer birçok virüs hastalığında antijen antikor ilişkisi bu yöntemle saptanabilir. ELISA-antikor testleri, hepatit virusları, kızamık virusu, kızamıkçık virusu, CMV (cytomegalovirus), Rota virus ve Arbo virusların sebep olduğu viral hastalıklarda da, epidemiyolojik değerlendirmeler yapılabilmesi açısından da değerlidir. Paraziter hastalıklarda da ELISA yöntemi geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Antijen aranmasında kullanılan ELISA tetkikleri, daha çok endokrinoloji sahasında gelişmiştir (Çırak 1999).

Günümüzde ELISA yöntemi daha gelişmiş sistemler içinde yer almaktadır. Araştırılacak etkenin DNA'sını PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılması ve elde edilen PCR ürününe özgü problerle kaplı mikrokuyucuklarda hibridizasyonu takiben ELISA'ya benzer şekilde kolorimetrik reaksiyon ile değerlendirme yapılması tanısı konacak viral hastalıkta yalancı pozitif sonuçların minimuma indirilmesi bakımından çok yararlıdır. Örneğin, Hepatit C virus tanısı için geliştirilen ticari bir HCV PCR kiti olan "Amplicor HCV", ELISA ile HCV'ye karşı antikor pozitifliği saptanan olgularda HCV gösterilmesinde önemlidir, ancak bu yöntem de halen standardizasyon sorunu yaşamaktadır.

Amplifikasyon ürününün ELISA sistemi ile gösterilmesine dayalı bir başka geliştirilen teknik dallanmış DNA'dır. Amplifikasyon tekniklerinden belirli bir şekilde farklı olan dallanmış DNA (branched DNA) tekniğinde hedef nükleik asit çoğaltılmamaktadır; bunun yerine reaksiyonun duyarlılığı sinyal amplifikasyonu ile sağlanır. bDNA tekniği enfeksiyöz hastalıkların değerlendirilmesinde kullanılır. HIV-1, HCV ve HBV'nin saptanması ve kantitatif olarak değerlendirilmesi için ELISA sistemini esas alan geliştirilmiş kitler bulunmaktadır (Çırak 1999).

Son yıllarda ELISA testleri, viral enfeksiyonun tanısında kullanılan klasik testlerden birçoğunun yerini almaktadır. Klasik testlerde bir hastalığın serolojik tanısının konulabilmesi için akut ve konvelesan faz serumlarının birlikte incelenmesi ve ikisi arasında en az 4 titre artışının saptanması gerekmektedir. ELISA testi genellikle çift serum örneği ile çalışmaya gereksinim olmadığından daha pratiktir. Antijene spesifik IgG ve IgM antikorlarının belirlenebilmesi de bu testin diğerlerine üstünlüklerinden birini oluşturmaktadır.

İndirekt ELISA yöntemi, antikor miktar tayini için çok yaygın olarak kullanılan bir testtir. Ancak IgM gibi küçük miktarlardaki immunoglobulin seviyelerinin ölçümünde dikkatli olunması ve romatoid faktöre bağlı yalancı pozitiflik ile IgG antikorlarının çok yüksek olması halinde yapışmaya bağlı olarak meydana gelen IgM yalancı negatiflik olgularının gözden uzak tutulmaması gerekir. Bu problemleri azaltmak için katı faz anti IgM ELISA yöntemi

kullanılmaktadır. Bu amaçla ilk adımda anti-IgM ile kaplı mikropalakalar kullanılır. Serum numunesi üzerine işaretli antijen ve uygun substrat edilerek test değerlendirilir.

İndirekt ELISA'nın problemlerinden biri olan IgM yalancı pozitifliği, spesifik antijene bağlanan spesifik IgG antikorunun Fc parçasına, IgM romatoid faktörün (RF) bağlanmasından kaynaklanmaktadır. RF ile ilgili nonspesifik pozitifliğin eliminasyonu için çeşitli teknikler geliştirilmiş ve bu amaçla agregre olmuş IgG, IgG ile kaplanmış lateks partiküller Stafilococcus aureus protein A ve sepharose kullanılmaktadır (Anonim 2011).

1.2.1. Antijen arama için kullanılan yöntemler

Direkt ELISA (sandviç yöntemi); araştırılacak antijene özgü antikor, katı faza bağlanır. Antijen araştırılacak materyal ile birlikte inkübe edilir. Üzerine enzim bağlanmış özgül antikor eklenir. İncelenmekte olan materyalde antijen var ise, katı faza bağlanmıştır. Buna bağlanmış olan enzimli antikorun enzimi, substrat eklenince kendi substratına etkili olarak renk oluşur.

Direkt ELISA tek basamaklı sandviç yöntemi; direkt ELISA'dan farkı, katı fazda yapışık özgül antikorun üzerine aynı anda antijen aranmakta olan materyal ile enzim bağlantılı antikor eklenir.

İndirekt ELISA; katı faza yapışmış özgül antikora daha önce bir süre inkübe edilmiş antijen aranacak materyal ve özgül antikor karışımı eklenir. Ancak bu ikinci antikorun, katı fazda yapışık antikorun elde edilmiş olduğu hayvan türünden farklı bir hayvan türünden elde edilmiş olması gerekir. Eğer incelenen materyalde uygun antijen varsa, bir yandan serbest antikora diğer yandan da katı fazdaki antikora bağlanır; eklenen enzimli antiglobulin yıkama ile gitmez. Enzime uygun kromojen substrat eklenince renk oluşur.

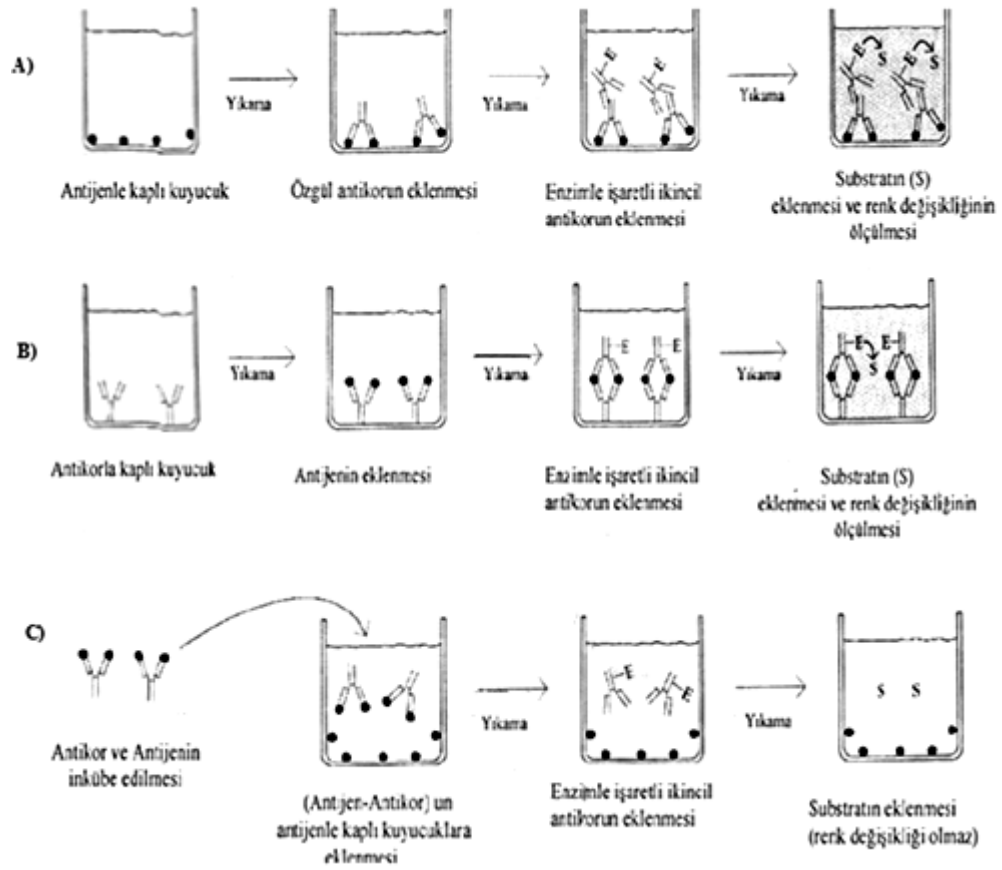
Kompetitif ELISA yöntemi, katı faza yapışmış özgül antikorun üzerine antijen aranacak olan materyal eklenir. İnkübasyondan sonra, enzim bağlanmış özgül antijen, takiben substrat eklenir. İncelenen materyalde antijen varsa, katı fazdaki antikora bağlanmıştır, enzimli antijen yapışamayacağı için, yıkama ile uzaklaştır; substrat eklenince renk oluşmaz.

1.2.2. Antikor arama amacıyla kullanılan yöntemler

İndirekt yöntem (katı faz sandviç yöntemi); bilinen antijenin katı faza adsorbsiyonundan sonra, antikor aranan hasta serumu ile inkübe edilir. Antijen-antikor kompleksinin gösterilebilmesi için, enzim ile konjuge insan antiglobulini eklenir. Antikor bağlanmışsa enzimli antiglobulin de bağlanır; uygun enzim substratı eklenince renk oluşur.

Sandviç inhibisyon yöntemi; serbest antijen hasta serumu ile karıştırılıp bir süre inkübe edilir. Hasta serumunda antikor varsa antijene bağlanarak onu bloke edecektir. Bu karışım katı fazdaki özgül antikorun üzerine eklenir. İnkübasyondan sonra sırasıyla, enzim bağlanmış özgül antikor ve kromojen substrat eklenir. Hasta serumunda antikor varsa serbest antijen ile bloke olmuş olduğundan katı fazdaki antikora bağlanmaz. Bu durumda eklenen enzimli antikor da bağlanmayacağından substrattan renk oluşmaz.

Kompetitif ELISA yöntemi; katı faza bağlanmış antijenin üzerine önce antikor aranmakta olan hasta serumu, takiben enzimle işaretli özgül antikor ve kromojen substrat eklenir. Hasta serumunda antikor varsa, enzimle işaretli antikora göre daha aktif olduğundan, yarışma sonucu katı fazdaki antijene bağlanmıştır. Enzimli antikor bağlanamayıp yıkama ile uzaklaştığı için substrat eklendiğinde renk oluşmaz (Çırak 1999).



Şekil 1.4. Farklı Çeşitlerde ELISA Protokollerine Örnekler; A) İndirekt ELISA B) Sandviç ELISA C) Kompetitif ELISA

1.3. Biyokonjugasyon

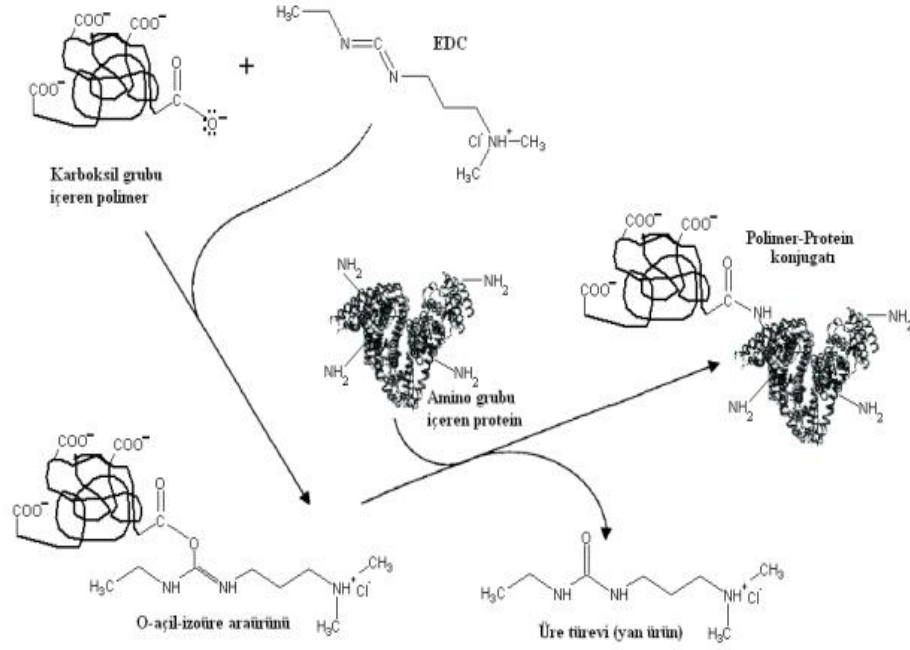
Biyokonjugasyon, iki veya daha fazla molekülün her bileşenin içerdiği özellikleri barındıran bir kompleks oluşturmak için bir araya gelmesi anlamına gelmektedir. Doğal veya sentetik bileşenlerin aktiviteleriyle, düzenlenen özelliklerine sahip tek bir madde oluşturan kimyasal bileşimlerdir. Böylece bir protein, izlenebilir bir konjugat oluşturmak için belirlenmiş diğer molekül çiftleriyle çağraz bağlanabilen bir kompleks karışımındaki hedef bir moleküle bağlanabilir.

Biyokonjugasyon teknolojisi, yaşam bilimleri içerisinde neredeyse her disiplini etkiler. Ayrıcalıklı aktiviteleri ile oluşturulan tüm konjugatlar için reaktif sistemleri ve çapraz bağlama uygulamaları, maddelerin küçük miktarlarının analizine, moleküllerin in vivo hedeflenmesine ve spesifik biyolojik sistemlerin

oluşturulmasına imkan sağlar. Moleküllerin modifikasyonu veya konjugasyonu hastalıkların tedavisinde, spesifik hücresel moleküllerin yerini belirlemede ve tespitinde ve ya saflaştırma işlemlerinde kullanılabilir.

Bir moleküle diğerlerinin kimyasal yollarla eklenmesi uygulamaları, araştırma, teşhis ve tedavi piyasalarında milyar dolarlık bir endüstrinin doğmasına neden olmuştur. Klinik testleri içeren tüm biyolojik ölçümlerin önemli bir bölümü çözelti, hücre veya dokularda belirli analitlerle etkileşebilen konjugatların kullanımına dayanmaktadır. Çapraz bağlanmış veya modifiye edilmiş ajanlar, peptid ve proteinlerin, şeker ve polisakkaritlerin, nükleik asitler ve oligonükleotidlerin, lipidlerin kimyasal olarak oluşturulan ve görüntülenebilen moleküllerin fonksiyonları ve doğal hallerinin değiştirilmesinde kullanılabilir. Dikkatli bir modifikasyon ve konjugasyon stratejisi boyunca proteinin fonksiyonu ve yapısı, meydana çıkan reseptör-ligant bağlantıları ve aktif bölge konformasyonu çok iyi bilinmelidir. Biyokonjugat kimyası gelişmeden moleküllerin işaretleme, modifikasyon ve konjugasyon birleşimlerinin oluşturulması da mümkün değildir (Hermanson 1996).

Biyokonjugatlarının geleneksel yöntemlerle sentezlenmesi, makromoleküllerin sulu çözeltideki fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bilinen tüm biyokonjugasyon reaksiyonlarında taşıyıcı moleküllerin fonksiyonel gruplarının aktivasyonu ve proteinlere bağlanması için 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) gibi çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır (Dilgimen ve ark. 2001). Örneğin, 1-etil -3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür aracılığı ile polimerlerin karboksil gruplarının modifikasyonu ve proteinlerin amino gruplarının, aktifleştirilmiş polimer gruplarına amid bağı oluşturarak kovalent olarak bağlanması Şekil 1.5.'da gösterildiği üzere iki adımda gerçekleşmektedir. İlk adımda taşıyıcı özellikteki polimerin karboksil grupları karbodiimid ile aktive edilmekte ve O-açilizoüre kararsız ara ürünü oluşmaktadır. Sonrasında ortama ilave edilen proteindeki amino grupları bu kararsız ara ürüne saldırarak reaksiyon vermekte ve amid bağı oluşumu üzerinden polimer-protein biyokonjugatları sentezlenmektedir (Akkılıç ve ark. 2007; Mustafaev 1996).



Şekil 1.5. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür (EDC) çapraz bağlayıcısı kullanılarak BSA proteinin P(VP-co-AA) kopolimeri ile konjugasyon reaksiyonu

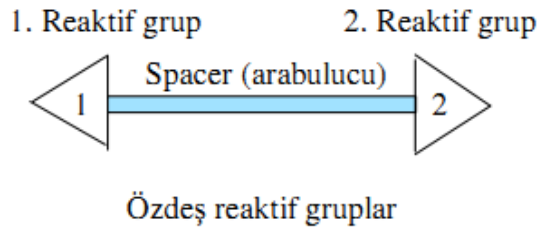
Proteinlerin akrilik asit ve kopolimerleri ile kompleks oluşumunu ve konjugat sentezi reaksiyonlarını incelemiş ve elde edilen sonuçlardan karbodiimid varlığında karboksil grubu ile amino grubu arasında meydana gelen kondenzasyon reaksiyonundan önce hızla protein-polimer komplekslerinin oluştuğunu saptamışlardır. (Kizilbey ve ark. 2009; Akkılıç ve ark. 2007).

Yapılan çalışmalarda poliakrilik asidin (PAA) immün sistem üzerinde yüksek uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir, ancak yüksek toksisitesinden dolayı hazırlanan preparatlar immunolojide geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bu nedenle PAA'nin toksisitesini düşürmek için PAA'nin N-Vinilpirolidon ile çeşitli oranlarda ve farklı molekül ağırlıklarında kopolimerlerini sentezleyerek bu kopolimerlerin de en az PAA kadar immün sistemde uyarıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir (Rafikov ve ark. 1986).

1.3.1. Çapraz bağlama reaktifleri

Çapraz bağlama reaktifleri (çapraz bağlayıcılar) biyokonjugat yöntemlerinde moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan ve uygulama amacına göre çok farklı çeşitleri bulunan kimyasal reaktiflerdir. Çapraz bağlayıcılar biyolojik moleküllerin işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük moleküllerin daha büyük moleküllere bağlanarak hedeflenmesi ve dağıtımında kullanılmaktadır. İki farklı molekül intermoleküler (moleküller arası) ya da tek bir molekül intramoleküler (molekül içi) olarak çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanabilmektedir. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının eş olup olmamasına göre Homobifonksiyonel (iki eş fonksiyonel R grubu taşıyanlar) veya Heterobifonksiyonel (farklı fonksiyonel R grubu taşıyanlar) olarak sınıflandırılırlar (Hermanson, 1996).

Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun simetrik olarak iki özdeş reaktif gruba bağlanması ile oluşturulmuştur (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi(Hermanson, 1996).

Arabulucu moleküler bir ip gibi bir protein molekülünü diğer bir moleküle ortak reaktif gruplarına saldırarak kovalent olarak bağlamaktadır. Örneğin, bir proteindeki lizine ait ϵ -amino ya da N-ucundaki amino grubu diğer bir moleküldeki amino grubuna homobifonksiyonel bağlayıcı aracılığı ile çapraz bağlanmaktadır. Bu şekilde iki proteini ya da diğer molekülleri birbirine bağlayabilme yetenekleri homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların farklı deneme ya da hedefleme çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bunun yanında

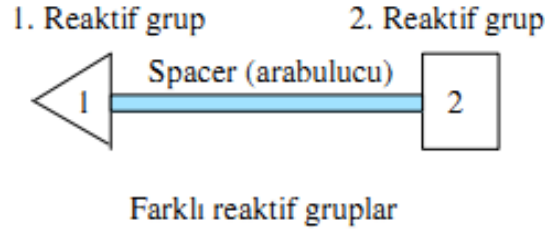
homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların bazı dezavantajları da mevcuttur (Hermanson, 1996).

Bunların başında; genel olarak basit homobifonksiyonel bağlayıcıların kullanılması ile oluşturulan konjugatların yeteri kadar tanımlanamaması, konjugasyon esnasında çapraz bağlayıcı tarafından aktive edilen ilk protein tarafından oluşturulan aktif ara ürünün yine aynı cins protein ile çapraz bağlanabilmesi, aktif ara ürünün kendi içerisinde aynı polipeptid zincirinde diğer bir fonksiyonel gruba çapraz bağlanarak intramoleküler konjugat oluşturabilmesi, diğer bir çapraz bağlayıcının yine bu aktif ara ürüne bağlanması bunun sonucunda aynı molekülün ikili (dimer), l (trimer) vb, oligomerlerinin oluşabilmesi ve bu şekilde polimerize olabilmesi gerekmektedir.

Bu şekilde homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen tek basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında tam olarak tanımlanamayan konjugatların oluşumu önemli bir problemdir. Çünkü bu tip reaksiyonlarda tüm reaktiflerin aynı anda reaksiyon karışımına koyulması gerekmektedir. Tüm bu olumsuz nedenlerden dolayı homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar için iki basamaklı reaksiyon prosedürü geliştirilmiştir (Hermanson, 1996).

Öncelikle ilk protein molekülü homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile aktive edilir ve sonrasında çapraz bağlayıcının fazlası ile yan ürünler (protein monomeri, dimeri, trimeri, vb.) uzaklaştırılarak aktive edilmiş protein saflaştırılır. Sonrasında bağlanacak olan ikinci molekül ya da protein ile konjugat oluşumu için karıştırılır. Ancak burada da aktive edilmiş proteinin saflaştırılması sırasında hidroliz olması ya da ilk molekülün kendi arasında polimerize olması ve reaksiyon veriminin oldukça düşük kalması gibi sorunlar ile karışlaşılmaktadır (Aslam ve Dent 1998).

Heterobifonksiyonel apraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir ara bulucunun iki ucuna farklı reaktif grupların bağlanması ile oluşturulmuştur (şekil 1.7).



Şekil 1.7.Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi(Hermanson 1996).

İki farklı reaktif grup, kovalent olarak bağlanacak farklı moleküllerdeki iki farklı fonksiyonel gruba saldırarak bu moleküllerin çapraz bağlanmalarını sağlarlar. Örneğin çapraz bağlayıcının bir ucu amino grubuna yönelen reaktif grup içerirken, diğer ucu sülfidril ya da karboksil grubuna yönelen reaktif grup içermektedir. Bunun sonucunda hedeflenen molekülün istenilen bölgesinde çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilebilmekte ve böylece konjugasyon işleminde daha iyi kontrol sağlanmaktadır (Hermanson 1996).

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonu birkaç basamaktan oluşmaktadır. Tipik bir konjugasyon reaksiyonunda ilk protein (ya da peptid, makromelekül vb.) heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcının daha reaktif ve reaksiyona meyilli olan ucu tarafından modifiye edilir. Sonrasında modifiye protein, reaktiflerin fazlasının jel filtrasyon ya da diyaliz yoluyla uzaklaştırılması sonucu saflaştırılır. Konjugasyon için ikinci molekül ilave edilmeden aktive edilmiş ara ürünün saflaştırılması sırasında ara ürünün kararlılığını koruyabilmesi için birçok heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar, en az bir tane sulu ortamda uzun süre kararlı kalabilecek reaktif grup içerirler. Örneğin NHS-ester maleimid heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıları, aminlere karşı oldukça reaktif olan NHS ucu ile proteine bağlanıp molekülün modifikasyonunu gerçekleştirirken, maleimid fonksiyonel grubunun kararlılığından dolayı ara ürünün aktivitesi korunmaktadır. Çünkü maleimid grubu sulu çözeltilerde NHS esterlere göre daha kararlıdır. Hızlı bir saflaştırma işleminden sonra ikinci molekül (sülfidril grubu içeren) ortama eklenerek maleimid ucu ile ilk moleküle çapraz bağlanması sağlanır. Bu şekilde çoklu basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında konjugat ürününün molekül boyutu ve

çapraz bağlı üründeki bileşen oranları üzerinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır. Konjugatın konfigürasyonu ve ya da yapısı ilk proteinin başlangıç modifikasyon derecesine bağlı olarak ikinci proteinin konjugasyon reaksiyonuna eklenecek miktarı ayarlanarak düzenlenebilmektedir (Hermanson 1996). Bu şekilde kullanım amacına göre; düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı konjugatlar elde edilebilir.

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar konjugasyon reaksiyonlarında hedef molekülün özel bir bölgesine karşı spesifik yönlendirici olarak kullanılabilirler. Bunun yanı sıra heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar seçici olmayan bağlanma gerçekleştiren ve UV ışınlama ile aktive edilen bir adet fotoreaktif gruba sahip olabilirler. Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar iki farklı fonksiyonel grubun yanı sıra bunları birbirine bağlayan bir adet de arabulucu (spacer) içerirler. Çapraz bağlayıcılar her zaman yalnızca reaktivitelerine göre değil bazen de sahip oldukları arabulucunun boyutuna ve özelliğine göre seçilip kullanılabilirler (Aslam ve Dent, 1998).

Çapraz bağlayıcıların diğer bir grubu ise zero-length olarak da bilinen direkt çapraz bağlama reaktifleridir. Bu alt gruptaki bağlayıcılar iki molekülü arada herhangi bir grup ya da atom olmaksızın birbirine bağlamakta yani ilk moleküldeki bir atom diğer moleküle kovalent olarak bağlanırken arada hiçbir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmamaktadır. Ancak birçok konjugasyon reaksiyonu elde edilen konjugattaki moleküller birbirlerine bağlanırken yapıya yabancı bir madde girmiştir ve bu madde konjugatın kullanılmak istendiği yere göre zararlı olabilmektedir. Örneğin, peptid-protein konjugatları, taşıyıcı proteine bağlanmış olan peptide karşı immün cevap oluşumu amacı ile sentezlenmiştir. Bazı durumlarda oluşturulan antikorların bir kısmı, konjugasyon reaksiyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlara spesifiktir. Direkt çapraz bağlama reaktifleri iki molekülü birbirlerine arada bir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmadan direkt bağladığı için bu tür istenmeyen antikor oluşumlarını engellemektedirler (Hermanson 1996).

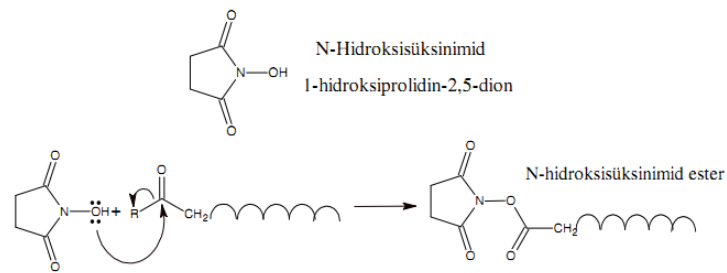
Bu tür çapraz bağlayıcılar; primer amino grubu ile karboksilik asid grubunu, kondenzasyon reaksiyonu sonucu amid bağı oluşturarak, organik fosfat grubu ile primer aminleri fosfoamid bağı üzerinden ya da aldehidler ile primer veya

sekonder amino gruplarını Schiff bazı oluşturarak ve bu bileşiğin indirgenmesi sonucu sekonder ya da tersiyer amin bağları ile bağlamaktadır.

Peptid-protein, protein-protein, konjugatlarının oluşturulmasında kullanılan direkt çapraz bağlama reaktifleri arasında en çok tercih edilen karbodiimidlerdir. Suda çözünebilir ve çözünemeyen formlarının bulunduğu karbodiimidler; karboksilat ve primer aminlerin amid bağı ile, fosfat ve amino gruplarının ise fosfoamid bağı ile bağlanmasına arabuluculuk ederler. Suda çözünebilir özellikteki karbodiimidler daha çok biyokimyasal konjugasyonlarda tercih edilmektedir çünkü biyolojik kökenli birçok makromolekül sulu tampon çözeltilerde çözünmektedir. Sadece karbodiimidler değil aynı zamanda yan ürünler olan üre türevleri de suda çözünen özellikte olduğundan konjugatın saflaştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Bunun yanı sıra suda çözünemeyen özellikteki karbodiimidler genel olarak peptid sentezinde ve moleküllerin sadece organik çözücülerde çözünmesi gereken biyokonjugasyon reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda meydana gelen ürünler ve yan ürünler de sadece organik çözücülerde çözünmemektedir (Hermanson 1996).

1.3.1.1. NHS

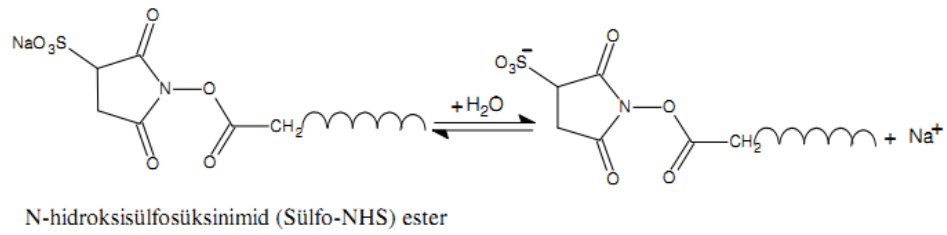
N-hidroksisüksinimid tarafından aktive edilmiş karboksil grupları içeren NHS esterleri nükleofilik aminlere karşı oldukça reaktiftir (Şekil 1.8). Farklı uzunluk ve yapıdaki arabulucuların her iki yanında simetrik NHS esterleri bulunduran bu grup bağlayıcılar ilk olarak 1970'lerin ortalarında tanımlanmışlardır (Bragg ve Hou, 1975; Lomant ve Fairbanks, 1976).



Şekil 1.8. NHS molekülünden NHS ester oluşumu

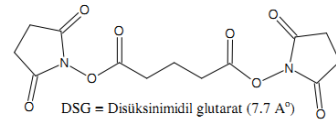
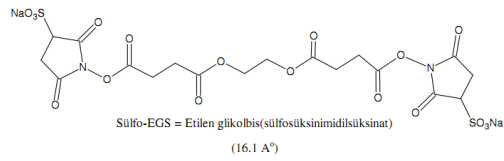
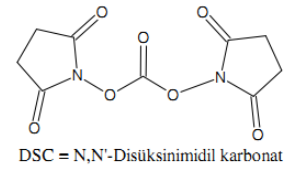
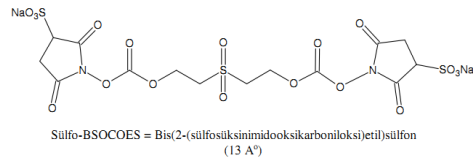
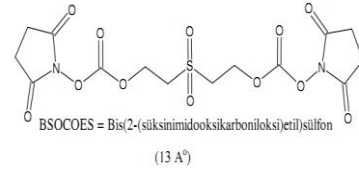
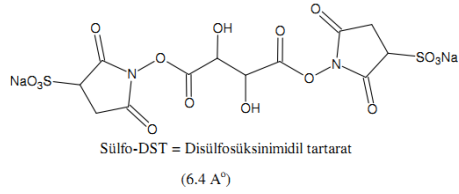
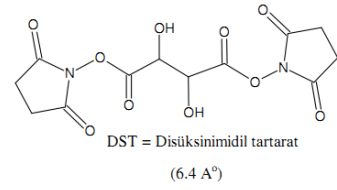
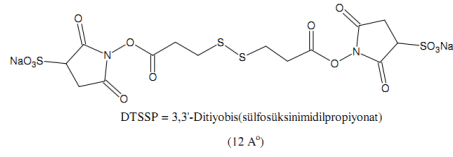
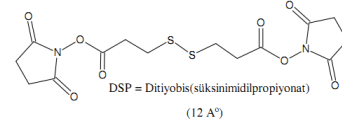
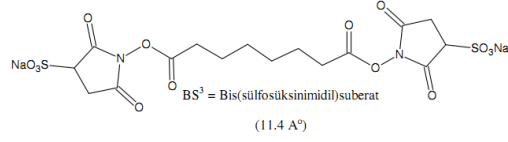
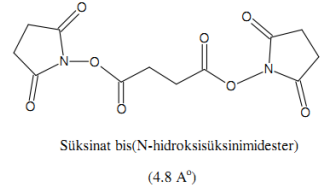
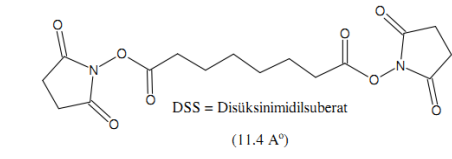
Ancak birçok NHS esteri içeren çapraz bağlayıcılar suda çözünemediklerinden oluşturulan çoğu yöntem NHS esterleri için önce yüksek konsantrasyonda organik çözücülerde çözünmesini sonrasında konjugasyon için saklanmalarını gerekli kılmaktadır.

Çözünme probleminin giderilmesi için 1980’lerde J.V. Staros tarafından bir NHS ester türevi olan, N-Hidroksisülfosüksinimid esterler hazırlanmıştır (Staros, 1982). Sülfon-NHS esterler (Şekil 1.9) süksinimid halkasındaki 2. ya da 3. karbon atomunda negatif yüklü sülfonat grubuna sahiptirler.

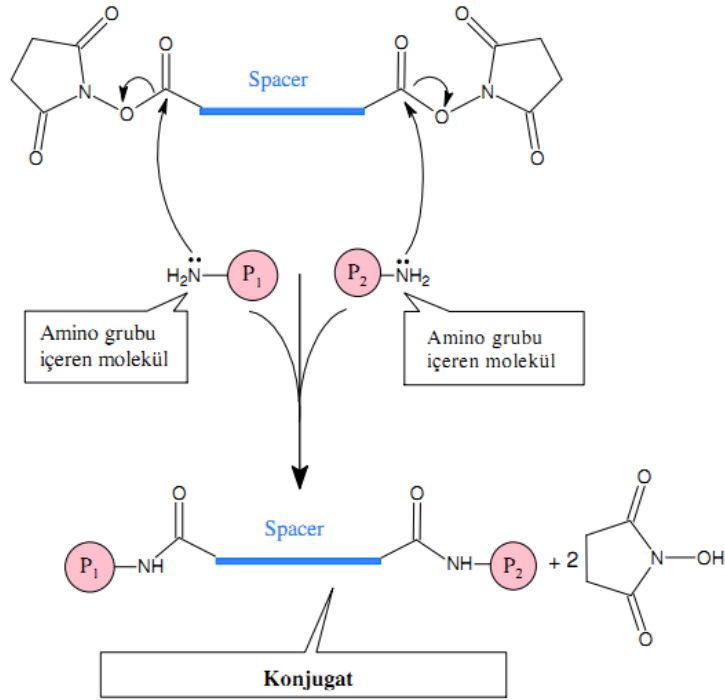


Şekil 1.9. Sülfon NHS ester molekülü

NHS ve sülfon-NHS ester içeren çapraz bağlayıcılar nükleofiller ile reaksiyona girerek NHS ya da sülfon-NHS açığa çıkarılırlar ve bunun yanında açılmış ürün oluştururlar. Bu çapraz bağlayıcıların sülfidril ya da hidroksil grupları ile reaksiyonları ve bunun sonucunda tiyoester ya da ester oluşturmaları olasıdır ancak oluşan ürünler kararlı değildir ve sulu ortamda hidrolizleri söz konusudur. Ancak primer ya da sekonder aminlerle oluşan reaksiyonlar sonucu meydana gelen amid ya da imid bağları oldukça stabildir ve hidrolize karşı daha karardır. NHS esterlerin proteinlerle muamelesinde çapraz bağlayıcılar ilk olarak N-ucundaki α -amino grubunda daha sonrasında da lizin zincirindeki ϵ -amino grubuna saldırırlar. Konjugasyonda kullanılan NHS esterleri Şekil 1.10’da ve konjugasyon reaksiyonları da Şekil 1.11’de gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan N-Hidroksisüksinimid esterleri



Şekil 1.11. NHS ester kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

1.3.1.2. EDC

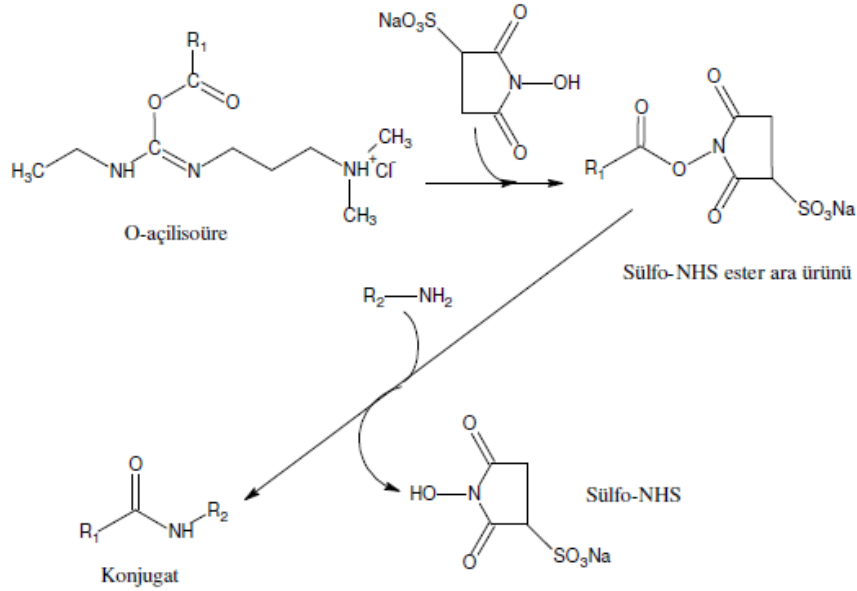
EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür biyolojik moleküllerin konjugasyonunda en sık kullanılan karbodiimid türevidir. Suda çözünabilir özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamında daha önce bir organik çözücünde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri suda çözünabilir olduğundan diyaliz ya da jel filtrasyon ile kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir ve elde edilen konjugatlar saflaştırılabilir. Ancak EDC suyun varlığında kararlı olmadığından kimyasal $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Daha sonrasında kimyasal kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilmeli ve öyle açılmalıdır. Bu EDC'nin erkenden bozunmasını önlemektedir. EDC'nin küçük miktarlarını reaksiyon ortamına eklemek için suda stok çözeltisi hazırlanabilmektedir ancak bu çözeltinin kimyasalın aktivitesini kaybetmemesi için oldukça çabuk hazırlanması ve kısa sürede kullanılması gerekmektedir.

Primer amin ve karboksil grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Konjugat oluşum sürecinde öncelikle N-substitue karbodiimidler (karbon atomuna komşu iki azot atomu karbona göre daha elektronegatif olduğundan karbon atomu + yüklenir ve karboksilat anyonunun saldırması için oldukça uygun bir yapı oluşur) karboksilik asitler ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan O-açilisoüre ara ürününü oluştururlar. Sonrasında bu aktif ara ürün primer amin gibi nükleofil özellikteki gruplar ile reaksiyona girerek amid bağı üzerinden konjugat oluşumunu gerçekleştirir (Williams ve Ibrahim 1981). Reaksiyon esnasında herhangi başka bir nükleofil de reaktif olabilmektedir. Örneğin, sülfidril grupları ara ürüne saldırabilmektedir ancak oluşan tiyoester bağı amid bağı kadar kararlı değildir. Ancak EDC peptidlerin proteinlerle konjugasyonu sırasında moleküllerin kendi içerisinde polimerizasyonu da söz konusudur. Örneğin, peptid molekülü hem karboksil grubu hem de amino grubu içerdiğinden karbodiimid tarafından aktive edilen karboksil grubunun oluşturduğu kararsız ara ürüne yine peptid molekülünün amino grubu saldırabilmekte ve bunun sonucunda peptid-protein konjugatının yanı sıra peptidin oligomerlerinin oluşumu da söz konusu olabilmektedir. Birçok çalışmada karbodiimidler için refere edilen optimum pH aralığı 4,7 ile 6'dır. Bunun yanı sıra karbodiimid reaksiyonları pH 7,5'a kadar daha düşük verimle de olsa gerçekleşebilmektedir.

Konjugasyon pH, kullanılan tampon, reaksiyona giren peptid ya da proteinin oranı, EDC'nin oranı değiştirilerek modifiye edilebilir. Bazı durumlarda ise protokol elde edilen konjugatın çözünürlüğünü ya da aktivitesini kaybetmemesi için modifiye edilmektedir. Örneğin, hidrofobik bir peptidin protein yüzeyine kovalent konjugasyonu sırasında kısmi ya da tümüyle çökme problemi oluşabilmektedir. Bu problem EDC miktarının ya da ortama ilave edilen hidrofobik peptid miktarının düşürülmesi ile azaltılabilmektedir (Hermanson 1996).

Suda çözünabilir özellikteki karbodiimidler; karboksil grubu ile aktif ester ara ürünü oluşturmak için suda çözünabilen sülfon-NHS ile birlikte kullanılırlar (Hermanson 1996). Önce karbodiimid ile karboksil grubunun reaksiyonu sonucu O-açilisoüre kararsız ara ürünü oluşur sonrasında sülfon-NHS ile bu ara ürünün

reaksiyonundan sülfo-NHS ester ara ürünü oluşur ve bu ara ürünün primer amino grubu ile reaksiyona girmesi sonucu amid bağı üzerinden konjugat elde edilir (Şekil 1.12).



Sekil 1.12. EDC Plus Sülfo-NHS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

1.3.2. Antikor-enzim konjugasyon yöntemleri

Enzimler, analiz sistemlerinde tespit bileşeni olarak biyokonjugat kimyasında geniş ölçüde kullanılır. Bir enzimin katalitik aktivitesi substrat molekülünün spektroskopik, mikroskopik ve görüntüleme ile kolaylıkla ölçüm ve tespit edilebilen kromojenik, floresent veya kemilüminesent ürünlere dönüşmesinde kullanılabilir. Eğer bir enzim ilgilenilen analit için spesifik hedef molekül ile konjuge edildiyse sonrasında analiz sistemi, analitin ölçüm ve tespiti için yapılabilir. En sık kullanılan hedef molekül, ölçülebilen substrat için antijen bağlanma spesifikliğine sahip antikordur. Bir antikora konjuge edilmiş bir enzim antijen varlığında gözlenebilir. Bu basit konseptin avantajları nedeniyle, ELISA önemli bir immunolojik test halini almıştır. Bu sistemlerde, absorbans ve floresansları ile ölçülebilen çözünür ürünler üretebilen substratlar tercih edilir. Alternatif olarak, hücre ve doku kesitlerinde bulunan antijenler için yüksek renk

elde edebilen çökeltiler olan çözünmeyen formdaki substratlar kullanılabilir. Enzim temelli test sistemlerinin uygulanabilirliği, enzim konjugat kimyasını biyokonjugat tekniklerinde önemli bir uygulama alanı haline getirir (Hermanson 2008).

1.3.2.1. İmmunoglobulin yapısı ve özellikleri

İmmünglobulinler glukoprotein yapısındadırlar ve yaklaşık % 90'ı polipeptid, % 10'u karbonhidrattır. İmmünglobulinler temelde benzer yapı gösterirler ve bir Ig molekülü "monomer" adı da verilen en az bir temel birimden oluşmuştur. Ig'lerin moleküler yapısının daha iyi anlaşılabilmesi için, üzerinde en çok çalışılmış, incelenmiş ve monomer bir yapı gösteren IgG molekülünün yapısı örnek olarak alınır (Şekil 1.13).

Bir Ig molekülü elektron mikroskopta incelendiğinde Y harfi şeklinde görülür. Ig'ler globulin yapısında protein olduklarından polipeptid zincirlerinden meydana gelmişlerdir. Monomerden oluşan IgG molekülünde iki çeşit polipeptid zinciri vardır ve her bir çeşitten ikişer adet bulunmaktadır.

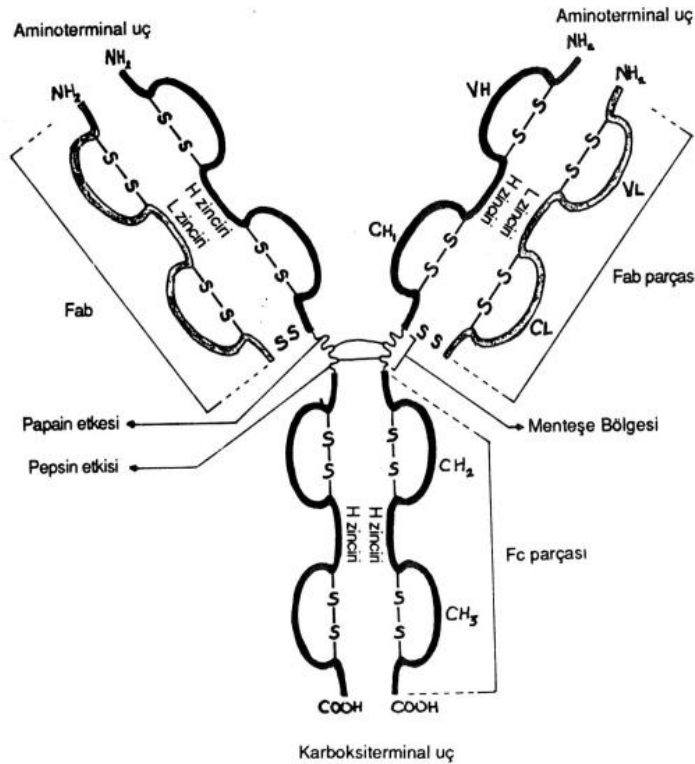
Hafif zincir (L zinciri), molekül ağırlığı daha az olan kısa zincirlerdir. K (kappa) ve (lambda) olmak üzere iki tipi vardır. Her iki tip L zinciri de tüm Ig çeşitlerinde bulunabilir. Ancak bir Ig molekülündeki iki kısa zincirin tipi aynıdır ve birbirine özdeşir, biri diğerinden farklı olmaz. Bir antikor molekülünde her iki tip L zinciri beraber bulunmaz.

Ağır zincir (H zinciri), molekül ağırlığı fazla olan, uzun zincirlerdir. Beş Ig çeşidinin de H zincirleri birbirinden farklı yapıdadır.

Ig molekülünde hafif zincirler Y harfi şeklindeki molekülün kol kısımlarında, ağır zincirler ise hem kol, hem de gövde kısmında bulunurlar. Kollarda hafif ve ağır zincir arasında, gövdede ise iki ağır zincir arasında bulunan disülfid bağları, polipeptid zincirleri bir arada tutarak Ig molekülünü oluştururlar. H ve L zincirlerinde her polipeptid zincirinde olduğu gibi NH₂ ile sonlanan bir aminoterminal uç ve COOH ile sonlanan karboksiterminal uç bulunur. Ig molekülünde Y harfinin iki kolunun uç kısımları aminoterminal uçlardır ve antijenler bu kısımlara bağlanır. H ve L zincirlerinin aminoterminal uca yakın

olan kısımlarındaki aminoasitlerin diziliş sırası değişebilir özellikte olduğundan bu bölgelere V bölgesi (variable, değişken) adı verilir. Bu değişken kısımlar Ig molekülünün oluşumuna neden olan antijen molekülüne uyacak özellikte sentezlenirler. Polipeptid zincirlerinin geri kalan kısımlarında değişkenlik görülmediğinden bu kısımlara C bölgesi (Constant, değişmez) adı verilir.

Ig molekülünün domenler: Ig molekülünü oluşturan polipeptid zincirlerinde ilmiş şeklinde katlanmayla oluşan ve yine disülfid bağlarıncı tutulan kıvrım veya kangal şeklinde yapılar vardır. Bunlara domen adı verilir. Ig'lerin birçok fonksiyonu bu domenlerle ilişkilidir. Değişken bölgedekiler V domenleri (hafif zincirdeki VL, ağır zincirdeki VH), değişmez bölgedekiler ise C domenleri (yine hafif zincirdeki CL, sayıları birden fazla olduğundan ağır zincirdeki CH1, CH2, CH3) olarak adlandırılırlar. Böylece hafif zincirlerde 2, ağır zincirlerde ise 4 adet domen bulunur. IgM ve IgE'de ise 5 adet (ek olarak CH4) domen vardır.



Şekil 1.13. İmmünglobulinin şematik yapısı

Proteolitik enzimlerin immunoglobulinlere etkisi, Ig yapısı incelemelerinde çok yardımcı olmuştur. IgM ve IgE dışında, her Ig molekülünün ağır zincirlerinde, moleküle esneklik veren ve antijenik birleşme durumuna göre gerektiğinde Y çatalının daha fazla açılmasını sağlayan bir menteşe bölgesi bulunur. Menteşe bölgesi oldukça esnektir ve enzim ve kimyasal maddelere maruz kalabilmektedir. Ig'ler proteolitik enzimlerle muamele edildiklerinde, bu menteşe bölgesinin üst veya alt kısmından parçalanırlar.

Papain enzimi menteşe bölgesinin üst kısmından etki ederek, Ig molekülünü birbirine eş iki kol parçası ve bir gövde parçası olmak üzere üç parçaya ayırır. Ig molekülünün birbirine eş iki kol parçası antijen ile bağlanma özelliğindedir. Antijen bağlayabilen bu kol parçalarına Fab (Fragment antijen binding, antijen bağlayan parça) adı verilir. Y şeklindeki molekülün tek parça halinde kalan ve pek çok biyolojik aktiviteden sorumlu gövde kısmına ise soğukta kristalleşme özelliğinden dolayı Fc (Fragment crystallizable, kristalize olabilen parça) adı verilmektedir. Doğal olarak Fab parçasında hem L, hem de H zinciri bulunur, Fc parçasında ise sadece H zincirleri bulunur.

Pepsin enziminin etkisi ise Y şeklindeki molekülün menteşe bölgesinin alt kısmındadır ve Ig molekülü bir Fc gövde parçası ve birbirine bağlı halde iki Fab kol parçası olmak üzere iki kısma ayrılır. İmmünglobulin molekülünün esas yapısını oluşturan monomer yapısını oluşturur. Ancak bazı Ig çeşitlerinde monomerler J polipeptidi (J zinciri) aracılığı ile birleşerek ikili, beşli moleküller oluştururlar. Bunlara dimer (iki temel birimli) veya pentamer (beş temel birimli) adı verilir (Abbas ve ark. 1994; Akan 1992; Bilgehan 1993; Gülmezoğlu ve Ergüven 1994; Kılıçturgay 1994; Yeğen 1990).

Antikoru esas fonksiyonu antijenle bağlanmasıdır. Böylece antijen-antikor bileşiği immünkompleks oluşturarak bunların fagositozla dolaşımdan kaldırılmalarını sağlarlar. Antikorlar enfeksiyon etkenlerine bağlanarak onları hareketsiz hale getirir, aglütine eder ve fagositozunu kolaylaştırır. Antikorlar bağlandıkları toksin moleküllerini ve virusları nötralize eder, etkisiz hale getirirler.

IgG ve IgM sınıfı antikorlar komplemanı klasik yoldan aktive ederler. Kompleman vücut savunmasında çok önemli bir faktördür. Canlıya zarar

verebilecek bazı makromoleküllerin bağırsaktan emilimine engel olurlar. Antikora bağımlı hücrel sitotoksitede rol alırlar (IgG ile kaplı hedef hücreler bu antikorların Fc ucundan sitotoksik hücrelere bağlanmasıyla lizise uğrarlar).

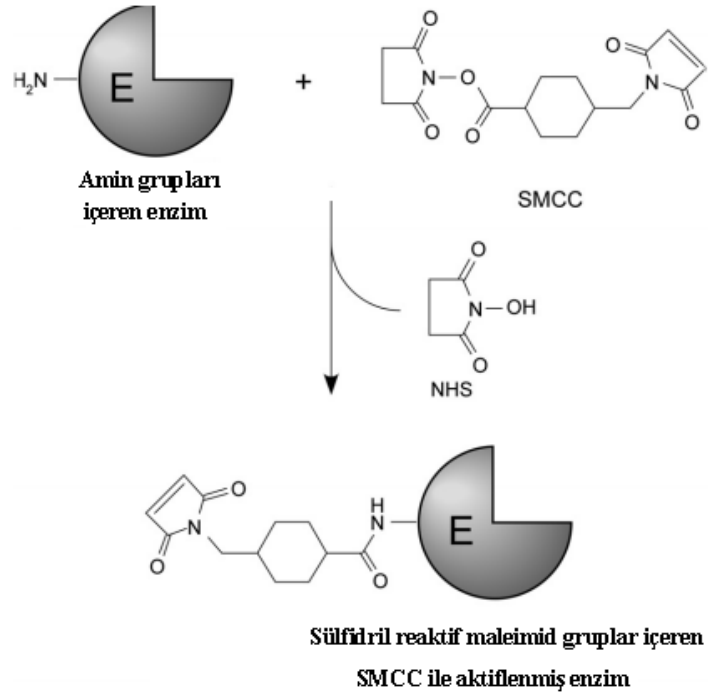
İmmünglobulin molekülü B lenfositlerde antijen reseptörü olarak görev yapar. IgA sınıfı antikorlar mukozal bağışıklıkta önemli rol oynar (Sindirim, solunum ve genitoüriner sistem mukozaları sürekli dışarıdan giren mikroorganizmalarla savaşır).

IgG sınıfı antikorlar plasentadan geçen tek immünglobulin çeşididir ve yenidoğan döneminde bebeği infeksiyonlardan korur. Anne sütündeki IgG'ler de aynı görevi sürdürür (Abbas ve ark. 1994; Akan 1992; Bilgehan 1993; Gülmezoğlu ve Ergüven 1994; Kılıçturgay 1994; Yeğen 1990).

1.3.2.2. Antikor-enzim konjugatlarının hazırlanması

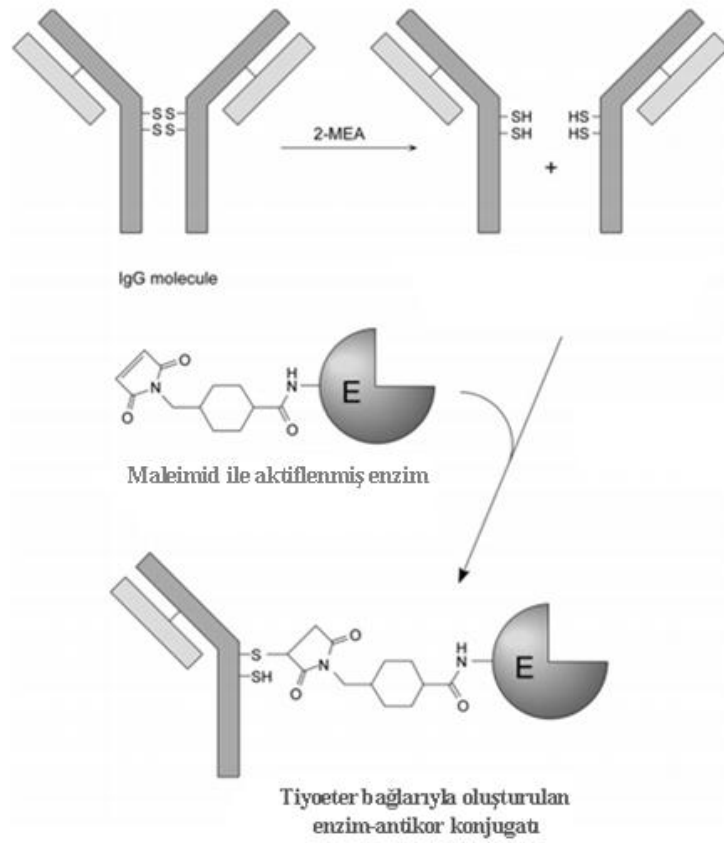
Enzim-antikor konjugasyonlarının elde edilmesinde bir ucunda sülfidril reaktif maleimid grup diğer ucunda amin reaktif NHS ester bulunan heterobifonksiyonel ajanlar genellikle tercih edilir. NHS ester-maleimid çapraz bağlayıcıların en sık kullanılanları; SMCC, MBS ve GMBS dir (Hermanson 2008).

SMCC ile enzim aktivasyonu ve arkasından antikor molekülü ile konjugasyonu içeren protokolde, sülfidril grupları ile enzimdeki maleimid gruplarının birleşmesi sonucu hazırlanan antikor söz konusudur (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Sülfidril içeren antikör molekülü ile birleşmeyi sağlamak için enzim molekülündeki amin grupları ile SMCC'nin reaksiyonu (Hermanson 2008).

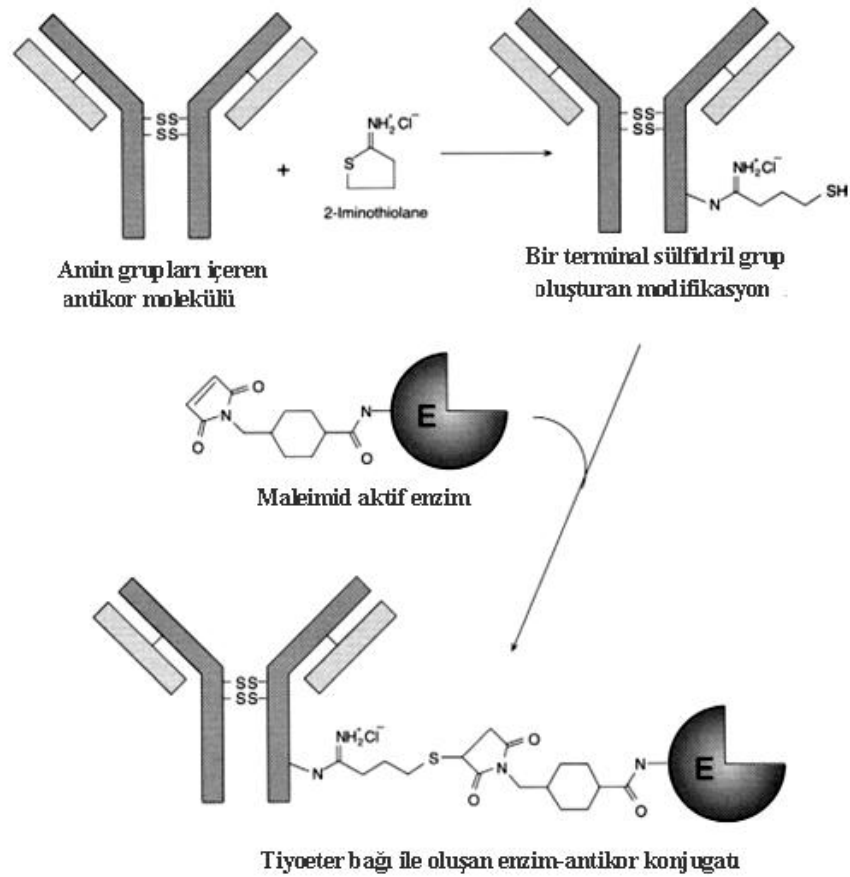
Antikorların yapılarından dolayı konjugasyon için ulaşılabilir serbest sülfidril içermezler, kimyasal yardımcıları ile oluşturulmalıdır. İmmunoglobulin moleküllerine sülfidril fonksiyonlarının eklenmesi için iki seçenek mevcuttur. IgG yapısında eklem bölgelerindeki disülfid kökleri, DTT, TCEP ya da MEA kullanılarak antijen bağlanma bölgesinden antikör molekülünü ikiye ayırır (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Tiol grupları içeren yarı antikor molekülleri elde etmek için IgG molekülünün disülfid bağlarından ayrılması (Hermanson 2008).

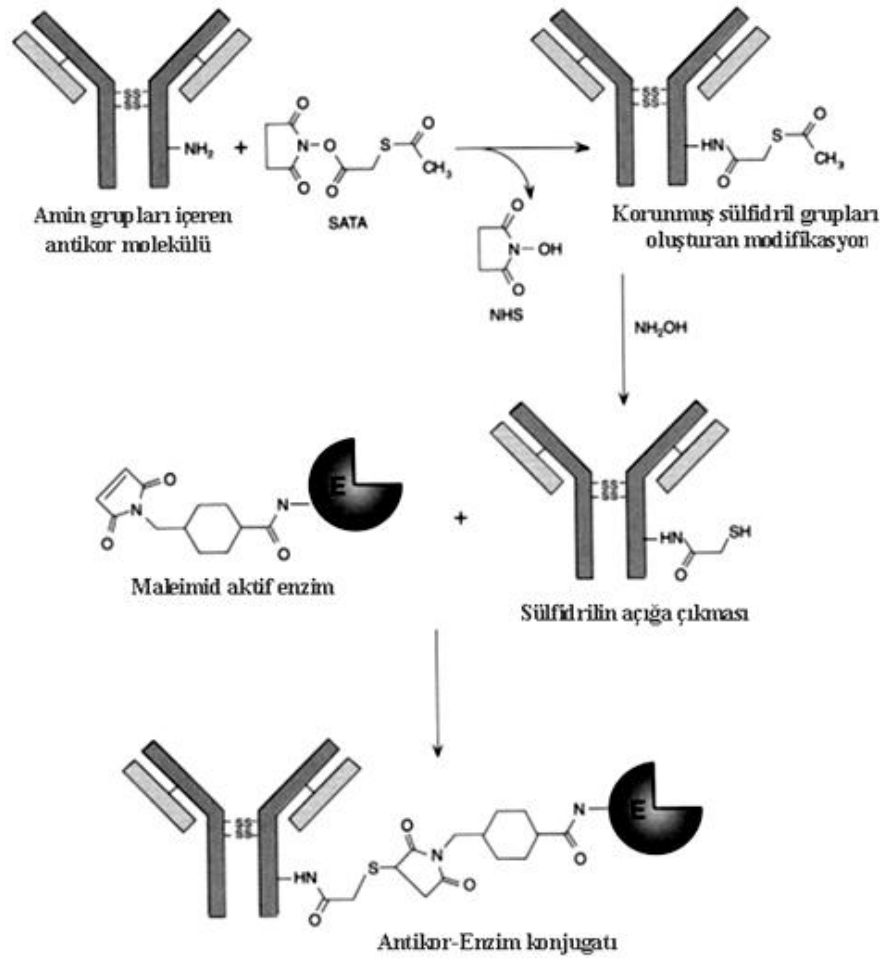
Alternatif olarak, bir tiolasyon ajanı kullanılarak antikora bütün şeklindeyken sülfidril eklenir. Tiolasyon ajanı olarak SATA ve Traut's ajanları kullanılabilir(Hermanson 2008).

Traut's ajan veya 2-iminothiolane bir zincir açılma reaksiyonu ile protein veya diğer moleküllerin amin grupları ile terminal sülfid kökleri içeren kalıcı modifikasyonlar meydana getirir (Şekil 1.16). Önceki işlemin aksine bu protokolda antikor molekülünün divalent doğası korunur. Ancak, antikorların amin modifikasyonlarından dolayı lysine kökündeki ϵ -amin bölgeleri uygun olmayan şekilde yerleşebilir, meydana gelen sülfidriller immunoglobulin yapısı üzerinde rastgele dağılır. -SH grupları ile konjugasyon antikorların antijen bağlanma bölgelerinin kapanmasına veya enzim molekülü ile bloklanmasına neden olabilir. ELISA prosedürlerinde yüksek aktivite içeren komplekslerden oluşan konjugatlarda yeterli serbest antijen bağlanma bölgesi bulunur.



Şekil 1.16. Antikorların SMCC aktif enzimle konjugasyonu için sülfidril oluşturan 2-iminotiolane ile modifikasyonu (Hermanson 2008).

N-Succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA) bir tiolasyon ajanıdır. Primer aminlerle NHS ester yoluyla sabit amit bağlantısı oluşturur. Asetillenmiş sülfidril grupları hidroksilamin ile deasetile edilene kadar stabildir. Böylece, antikor molekülleri bir maleimide aktif enzimle birleşmeye uygun sülfidril hedef gruplar sağlayan SATA ile tiollenebilir (Şekil 1.17). Bu ajanın kullanımında, SATA-modifiye antikorların stok hazırlıkları yapılabilir ve gerektiğinde deasetillenebilir. Serbest sülfidril kökü hemen oluşturan tiolasyon prosedürünün aksine, SATA-modifiye proteinlerin korunan sülfidril grubu bozulmaya uğramadan uzun vadede saklandığında kararlılığını korur (Hermanson 2008).

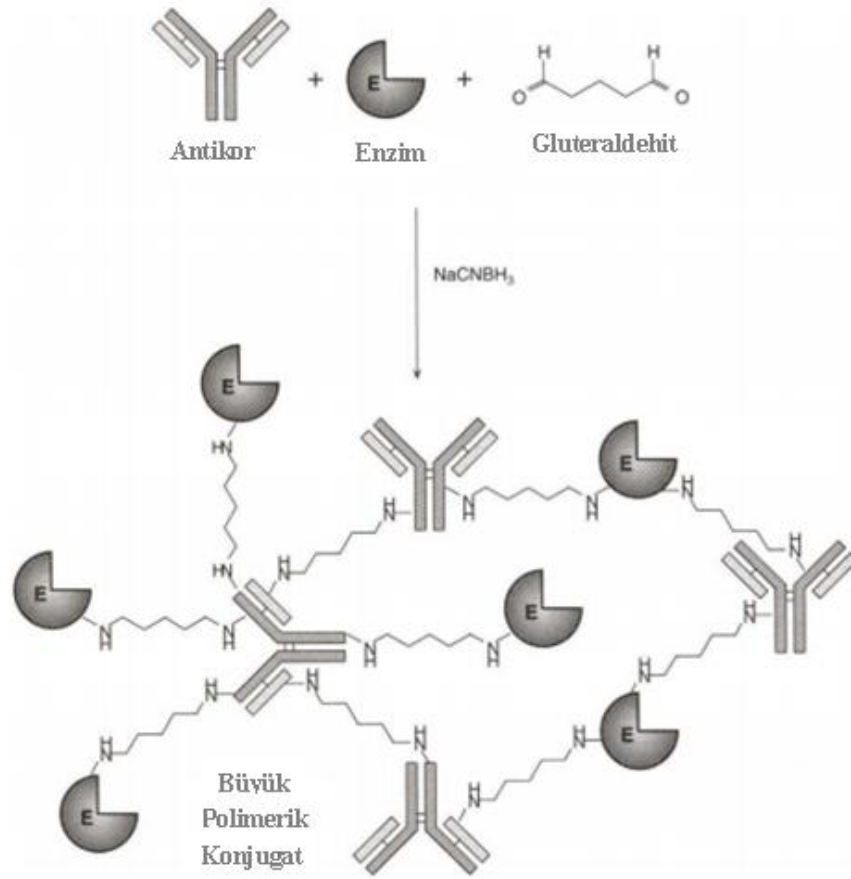


Şekil 1.17. Antikor molekülünde terminal korunmuş sülfidril içeren amit bağı oluşturmak için SATA ajanının NHS ester ucuyla antikorun amin grupların modifikasyonu (Hermanson 2008).

Gluteraldehit, antikor-enzim konjugasyonu oluşturmak için kullanılan ilk ve hala en sık tercih edilen çapraz bağlayıcı ajandır (Hermanson 2008).

Kararsız reaksiyon ürünlerinin problemi gluteraldehit uygulamasında kullanılan tüm konjugasyonlara sorun çıkaran bir yetersizliktir. Bu sorunun bir parçası ajanların homobifonksiyonel yapılarıdır fakat problemin önemli bir kısmı ticari ürünlerin belirsiz yapılarıdır. Alkalın pH'da sulu çözeltide gluteraldehit, α,β -doymamış aldehytler içeren geniş polimer yapısına sahip olduğundan aldol kondensasyon reaksiyonuna uğrar (Şekil 1.18). Bu ajanın bir diğer dezavantajı, çapraz bağlama işlemi boyunca kontrol edilemeyen polimerizasyona dayalı büyük molekül ağırlıklara sahip konjugatlar oluşturma eğilimlerinin olmasıdır. Oluşan konjugatlar, antikor-enzim konjugatlarının hazırlanmasında düşün aktivite ve

verime neden olan çözünmeyen polimerlerin önemli bir miktarını oluşturur. Özellikle bu durum, çapraz bağlanan iki protein içeren bir çözeltiye gluteraldehitin eklendiği tek basamaklı yöntemin kullanıldığı konjugasyonlarda gerçekleşir. Bu yöntemin uygulandığında oluşan enzim-antikor konjugatı kullanıldığında enzimatik aktivite verimi % 10'dan daha düşüktür.

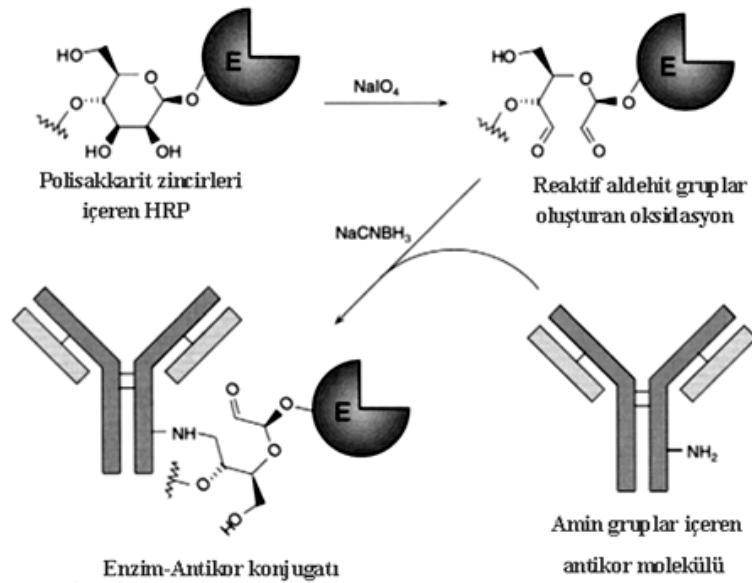


Şekil 1.18. Gluteraldehit antikor-enzim çapraz bağlanma prosesi (tek basamaklı yöntem)
(Hermanson 2008).

Polimerizasyondaki bu problemleri çözmek için iki basamaklı prosedür geliştirilmiştir. Bu prosedür, önce gluteraldehit ile enzimin aktiflenmesini ve fazla ajanların ayrılmasını ardından da ikinci protein yapı olan antikorun eklenmesini içerir. Fakat iki basamaklı prosedür çözelti üzerinde çökelebilen büyük molekül ağırlıklı türlerin oluşumuyla sonuçlanır. Bu eksikliklere rağmen, daha kontrollü heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların gelmesinden önce geliştirilen birçok ticari teşhis ELISA kiti için kullanılan gluteraldehit hala antikor-enzim

konjugasyonunda kullanılmaktadır. Bugün, antikor-enzim konjugasyon oluşumunda tercih edilen diğer yöntemler daha yüksek verim ve aktiviteli konjugatlar elde etmeyi sağlar (Hermanson 2008).

Glikoproteinlerdeki polisakkarit köklerin sodyum periyodat ile oksidasyonu, indirgeyici aminasyon yolu ile amin yada hidrazid içeren moleküller ile konjugasyon için reaktif aldehit grupların üretilmesini sağlar. Monosakkarit oksidasyonu, reaksiyon ortamında periyodatın konsantrasyonunun düzenlenmesiyle gerçekleştirilir. Sodyum periyodatın yüksek konsantrasyonları (oda sıcaklığında) diğer şeker kökleri ile komşu karbon atomlarının bulunduğu hidroksil grupları arasında oksidasyon gerçekleşebilir. HRP, glukozoksidaz veya birçok antikor gibi glukoproteinler periyodatın kısa uygulamaları ile konjugasyon için aktif hale getirilir. Amin içeren protein (antikor) ile çapraz bağlama alkali pH ortamında Schiff baz ara maddelerin oluşumu ile gerçekleşir. Nispeten kararsız olan bu ara ürünler sodyum siyanoborohidril ile ikincil amin bağlara indirgeme yolu ile kararlı hale getirilir (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. HRP gibi glukoprotein olan enzimlerin reaktif aldehit kökleri oluşturan sodyum periyodat ile oksidasyonu (Hermanson 2008).

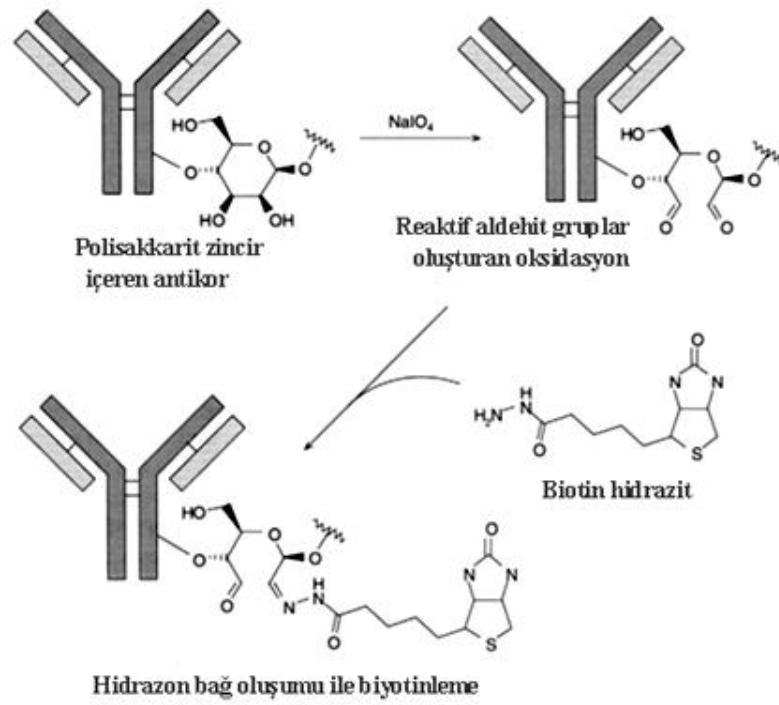
İndirgeyici aminasyon ile çapraz bağlamada sodyum borohidril ve ya sodyum siyanoborohidril kullanılmaktadır fakat siyanoborohidril Schiff bazını indirgemede daha spesifik olması ve aldehitleri indirgememesi açısından tercih

edilir. Lizin, glisin, etanolamin ve Tris gibi küçük bloklama ajanları reaksiyona girmeyen aldehit bölgelerini gidermek için konjugasyon sonrası eklenebilir. Etanolamin ve Tris hidrofilik hidroksil gruplar içerdikleri için daha çok tercih edilen bloklama ajanlarıdır.

İndirgeyici aminasyon reaksiyonunun pH değeri, oluşturulan enzim-antikor kompleks yapısının boyutu ve çapraz bağlama prosesinin etkinliğini kontrol eder. Fizyolojik pH değerinde başlangıçtaki Schiff baz oluşumunun etkinliği düşüktür ve düşük molekül ağırlıklı konjugatlar oluşacaktır. Alkalın pH değerlerine getirildiğinde (pH 9-10) Schiff baz oluşumu hızlı ve yüksek etkinlikte gerçekleşir ve enzimin daha yoğun birleşmeleri ve yüksek molekül ağırlıklı konjugatların oluşumu sağlanır.

Enzim-antikor komplekslerinin boyut seçimi uygulamanın çeşitine göre değişir. Düşük molekül ağırlıklı konjugatlar, immunohistokimyasal boyamalar ve blotlama tekniklerinde önemli yer alırlar. Eğer düşük molekül ağırlıklı konjugat kullanıldıysa yıkama basamakları ajanları daha etkin temizler böylece analizde düşük background sinyallerden korunulmuş olur. Buna karşın yüksek duyarlılığın önemli olduğu mikrolaka ve array formatlarında ELISA prosedürleri için yüksek molekül ağırlıklı konjugatlar daha önemlidir. Artıkların yıkanmasında problem oluşturmaz.

Ayrıca antikorun modifikasyonu sadece antikorun Fc bölgelerinde gerçekleşen glukosilasyon ile olursa antijen bağlanma bölgelerinden uzakta gerçekleşeceği için antikor aktivitesini etkilememiş olur. Örneğin, biyotin hidrazit kullanılarak kısa periyodat uygulamasından sonra bozulmamış antikorların modifikasyonu incelenebilir (Şekil 1.20). Bu teknikte modifikasyon olan bölge antijen-antikor bağlanma bölgesinden uzaktır ve antikor aktivitesi korunur. Bu yöntem için önemli bir nokta, antikorun yüksek pH ortamında indirgenmiş aminasyon uygulandığında periyodat ile oksitlenmiş antikorun kendi aminleri boyunca kendisiyle birleşebileceğidir. Periyodat ile oksitlenmiş antikorun konjugasyonunda, daha düşük pH değerlerinde (hafif asidit-nötral pH) reaksiyon ve kullanılan moleküllerin hidrazit grup içermesi daha doğru bir konjugasyon gerçekleştirmeyi sağlar (Hermanson 2008).



Şekil 1.20. Antikor molekülündeki polisakkarit gruplar aldehit oluşturan periyodat ile okside olur. Hidrozan bağlarında biyotin hidrojid ile modifikasyon (Hermanson 2008).

1.3.2.3. Horseradish Peroksidaz (HRP) yapısı ve konjugasyonu

Peroksidazlar biyoteknoloji alanında ün sahibi durumdadır ve enzimoloji, biyokimya, tıp, genetik, fizyoloji gibi çeşitli araştırma alanları ile bağlantılıdır. 19. yüzyıldan itibaren literatür olarak oldukça geniş bir yer alan ve çalışılan bir enzimdir. Peroksidaz ile ilgili 2000’den fazla yayın mevcuttur ve ağırlıklı olarak 2002 yılında basılmıştır. Peroksidazların önemi, çoklu fizyolojik rolleri ve organizmalardaki dağılımından dolayıdır. Etkileri ve kaynakları göz önüne alındığında 3 anasınıfta toplanabilir; bitki peroksidazları, hayvan peroksidazları ve katalazlar (Azevedo ve ark. 2003).

Peroksidazlar (EC 1.11.1.7), oksidleyici (oksidant) olarak hidrojen peroksit veya organik hidrojen peroksitleri kullanan oksidoredüktazlardır. Peroksidazların çoğu N-bağlı oligosakkarid bulunduran glikoproteinlerdir. Peroksidazlar başlıca tıbbi tanı kitlerinin hazırlanmasında, gıda proseslerinde oluşan reaktif oksijen türleri için indikatör olarak ve ticari amaçlı fenolik reçinelerin sentezinde katalizör

olarak kullanılmaktadır. Yapısında “Hem” grubu bulunduran peroksidazlar, amino asit dizilimleri dikkate alınarak üç gruba ayrılmaktadır.

I. Grup; sitokrom c peroksidaz (CcP), askorbat peroksidaz (APX), ve bakterial katalaz peroksidazları içeren hücre içi peroksidazlardır.

II. Grup; manganaz peroksidaz, lignin peroksidaz (LiP) gibi salgılanan “fungal enzimleri” kapsamaktadır.

III. Grup; bitki peroksidazlarını bulundurmaktadır. Kararlı olması ve yabancı turp (horseradish) köklerinden (Şekil 1.21) kolayca izole edilmesi nedeniyle birçok uygulamada yer alan “horseradish peroksidaz” izoenzim C (HRP) III. Grup’ta yer almaktadır. Peroksidaz ailesinin yapı-fonksiyon ilişkileri ile ilgili çalışmaların çoğu, III. grup’un temsilcisi olan HRP ile gerçekleştirilmiştir (Altıkatoğlu ve ark. 2009)

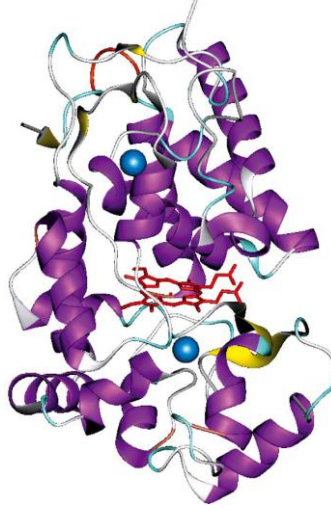
Bayır turbu (yaban turbu, Horseradish, *Armoracia rusticana*) bitkisi, köklerinin besin değeri sebebi ile dünyanın ılıman bölgelerinde yetiştirilen uzun ömürlü, dayanıklı bir bitkidir ve zengin bir peroksidaz kaynağıdır. İmmunotestler için tanı kitlerinin üretilmesinde Horseradish köklerinden peroksidazın büyük ölçekte üretimi ortaya çıkmıştır. Bitki köklerinden elde edilen peroksidazlar içinde en verimli ise HRP izoenzim C dir.



Şekil 1.21. Bayır turbu (yaban turbu, Horseradish, *Armoracia rusticana*) bitkisi (Altıkatoğlu ve ark. 2009)

HRP izoenzim C, 308 amino asit içeren tek bir polipeptid bulundurmaktadır. HRP C iki tip metal merkezi içerir. Bunlardan biri hem grubu olarak adlandırılan

demir (III) protoporfirin IX, diğeri iki kalsiyum atomudur. Her ikisi de enzimin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için önemlidir (Nigel ve Veitch 2009).



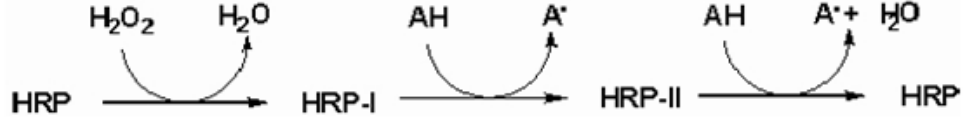
Şekil 1.22. X-ışını kristalografisi ile HRP'nin üç boyutlu molekül yapısı (Nigel ve Veitch 2009)

Şekil 1.22'de görülen her bir hem grubu (kırmızı), kalsiyum atomları (mavi küreler) içeren distal ve proksimal bölgeler (domains) arasında yer almaktadır. Enzimin sarmal (mor) ve katlanmış yaprak (sarı) bölgeleri gösterilmektedir (Nigel ve Veitch 2009).

HRP'nin enzimatik aktivitesi, hem grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve redüksiyonundan ileri gelmektedir. Son zamanlarda HRP'nin aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda da kullanıldığı bilinmektedir (Altıkatoğlu ve ark. 2009).

Horseradish Peroksidaz, başlıca tıbbi tanı kitlerinde kullanılmaktadır. Fenoller, bifenoller, anilinler gibi aromatik bileşiklerin ve azo boyalarının giderilmesinde etkili olduğu da bilinmektedir.

Horseradish Peroksidaz, molekülünde ferriprotoporfirin (protohemin) içeren bir haloenzimdir. Peroksidazlar H_2O_2 ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluşturmaktadır. HRP'nin genel çalışma mekanizması Şekil 1.23'de verildiği gibidir. HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II'yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir (Önder ve ark. 2009).



Şekil 1.23. HRP enziminin çalışma mekanizması (Önder ve ark. 2009).

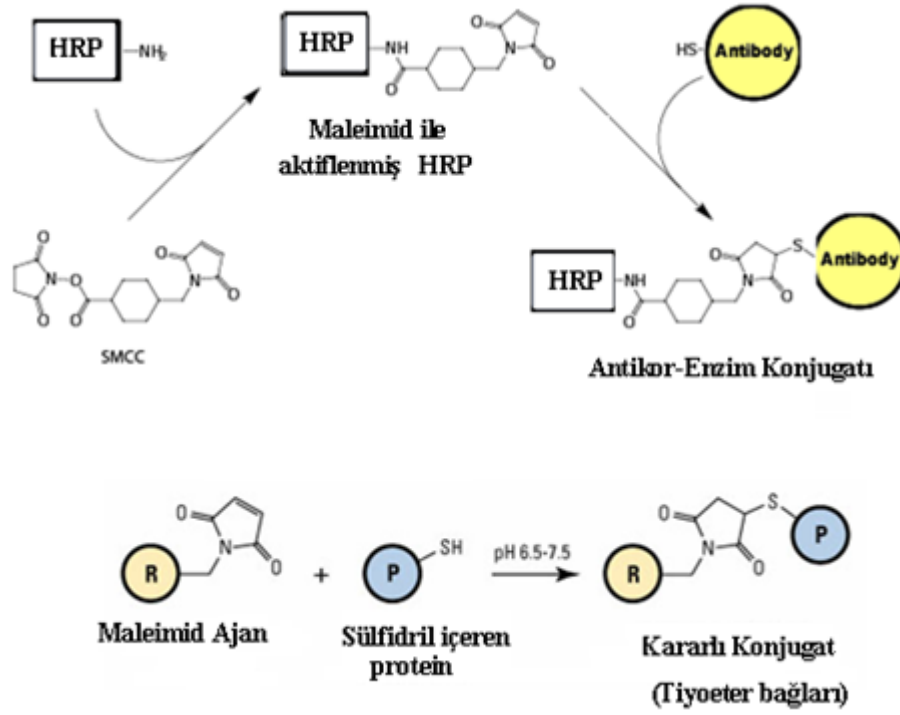
Uzun süre için enzimlerin sadece sulu çözeltilerde etkin çalıştığına inanılırdı. Son yıllarda HRP'nin susuz ortamlarda da etkin ve stabil yapısında olduğu gösterilmiştir (Fricks ve ark. 2009).

HRP enzimi, protein tespitinde bir ikincil antikor ile konjugasyonu sağlanarak işaretlemeye kullanılabilir. Afinite kromatografisi ile horseradish kökünden ekstraksiyonu sağlanabilir. ELISA, Western Blots ve immunohistokimyasal testler için kullanılabilir (Anonim 2000).

HRP, moleküler ağırlığı 40.000 ve önemli miktarlarda karbonhidrat içeren bir glikoproteindir. Onun polisakkarit zincirleri çapraz bağlama reaksiyonlarında sıklıkla kullanılır. Amin içeren moleküllere konjugasyon için kullanılabilen reaktif aldehit gruplar, bağlantılı olduğu şeker kökleriyle sodyum periyodatın hafif oksidasyon ile oluşur. Sodyum siyano borohidrat varlığında antikor moleküllerine oksitlenmiş HRP'nin indirgenmiş aminasyonu, bu enzimin yüksek aktivitede kanjugatlarının hazırlanmasında basit bir method olabilir.

HRP konjugasyonuna diğer bir method SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ve homobifonksiyonel reaktif glutraldehit kullanımını içerir.

Glutraldehit kullanımı, oligomer formasyonunun kapsamında sınırlandırarak kullanılan iki basamaklı bir protokolden oluşur. Ancak, bu method kabul edilemez miktarlarda çökmüş konjugatların oluşumuna neden olur. Bu dezavantaja rağmen, yerleşmiş teşhis yöntemlerinde kullanım için hazırlanan enzim-antikor reaktifleri rutinde hala bu yöntem ile hazırlanmaktadır. N-hydrozysuccinimide (NHS) ester-maleimide çapraz bağlayıcı, SMCC kullanımı konjugasyon yöntemini daha kontrollü tutmayı sağlar. SMCC ilk önce sülfhidril reaktif olan maleimide grupları içeren bir türev oluşturmak için HRP ile tepkimeye girer. Ardından sülfhidril içeren bir antikor ile modifiye edilmiş HRP reaksiyona girer (Şekil 1.24). Maleimide ile aktiflenmiş enzim dondurarak kurutulabilir ve saflaştırılabilir.



Şekil 1.24. Enzim-antikor konjugasyonunda SMCC kullanımı

Antikor- enzim kompleksinin hazırlanmasında HRP büyüklüğü bir avantajdır. Düşük molekül ağırlıklı konjugatlar, hücresel yapılara ağır polimerik komplekslerden daha iyi penetre olabilirler. Bu nedenle HRP immunositokimyasal tekniklerde sıklıkla tercih edilir. Küçük konjugatların doku bölümlerinde bulunan antijenik yapılara ulaşılabilirlikleri yüksektir.

HRP 'nin özellikle çapraz bağlama durumları için diğer bir ayırt edici avantajı, güçlü yapısı ve stabilitesidir. HRP dondurarak kurutma durumunda yıllarca stabil kalır ve saflaştırılmış enzim aktivitesinde önemli bir kayıp olmadan çözelti halinde 4°C 'de aylarca saklanabilir. Çapraz bağlama için kullanılan methoda bağlı olarak HRP konjugatlar yüksek aktivitede ve yüksek oranlarda hazırlanabilir (Hermanson 2008).

HRP ile ilişkili dezavantajlar da vardır. Bu enzim sadece 2 uygun primer ϵ -amin grup içerir. Bu birçok protein için özellikle düşüktür. Bu nedenle amin reaktif heterobifonksiyonellerle aktivite kabiliyeti düşüktür. HRP özellikle azit olmak üzere birçok antibakteriyal ajanın varlığına duyarlıdır. Ayrıca, sülfid ve siyanid ile de geri çevrilebilir şekilde inhibe olurlar. Sonuç olarak HRP'nin enzimatik aktivitesi oldukça yüksek iken, kullanılabilir ömrü veya substrat

gelişme süresi bir miktar sınırlıdır. Substrat dönüşümünden yaklaşık bir saat sonra, bazı durumlarda aktivitesi ciddi olarak azalabilir.

Yine de HRP, antikor-enzim konjugatlarında kullanılan en yaygın enzimdir. Yapılan bir incelemede, diagnostik test sistemlerinde kullanılan tüm antikor konjugatlarının % 80'inin HRP içerdiği belirtilmiştir (Hermanson 2008).

1.4. Fotosensitif amino asit monomerleriyle çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi ile biyokonjugasyon

Yaşam bilimleri ve biyoteknolojide kullanılmak üzere geliştiren ANADOLUCA methodu (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach), fotosensitif (ışığa duyarlı), amino asit monomer ve oligomerlerinin hazırlanması için (protein konjugasyonu) kullanılan bir methodtur ve farklı hücre tiplerini, dokuları ve diğer hedefleri algılamak için adapte edilebilir. Protokol monomer bağlayıcı yapıdaki birçok protein temelindeki rutenyum şelat [bis(2-20-bipyridyl)bis(MATyr)-ruthenium(II) fotosensitif monomer] tarafından çapraz immobilizasyon ve ışığa duyarlı çapraz bağlar yapılarak geliştirilmiştir. Bu methodta fotosensitif monomer, kovalent ve çapraz bağlayıcı ile konjugasyon baz alınarak, hazırlanmış amino asit ve rutenyum şelat monomerleri doğru antikor oryantasyonu için yönlendirme sağlamakta ve bağlandıktan sonra denatürasyonu engellemektedir.

Method, silika materyaller, süperparamanyetik partiküller, QDlar, CNTler, Ag/Au nanopartiküller ve Au yüzeyleri ve polimerik yapıların hazırlanmasında ve yapımında uygulanabilir. Fotosensitif (ışığa duyarlı) amino asit monomer bağlayıcılar sayesinde ışık saçılımı kullanılarak tek adımlı çapraz bağlama reaksiyonuyla biyoyumlu çok sayıda farklı mikro ve nano yüzeyli proteinler oluşturulabilir ve biyomoleküllerde bulunan tirozin, sistein ve triptofana kovalent bağlanarak konjugasyon gerçekleşebilir.

ANADOLUCA, yeniden ayrılabilir katı faz sistemleri, teranostikler (aynı anda tanı ve tedavi=therapi+diagnostik), nanoprotein taşıyıcılar, reseptör hedefli nanokargolar, biyosensörler, biyokataliz uygulamaları, yönetilebilir görüntüleme

ve algılama teknolojileri gibi alanlarda kullanılabilen yeni nesil nanobiyokonjugasyonların oluşturulduğu bir yöntemdir yöntemidir.

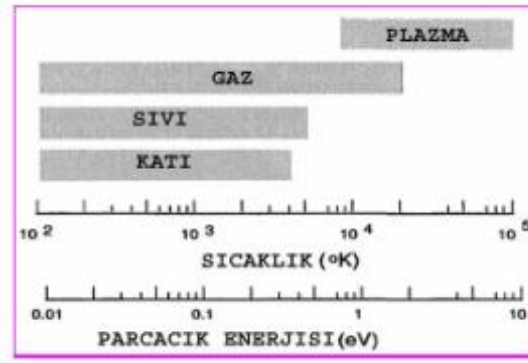
Bu yöntem ile multifonksiyonel, biyouyumlu, stabil ve spesifik mikro ve nano biyokonjugatlar oluşturulabilir. Kataliz ve determinasyonda kullanılır. Birçok materyale uygundur. Proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonundan etkilenmez, pH ve sıcaklıktan bağımsızdır.

ANADOLUCA yöntemine göre nano lipaz sentezi, mikroemülsiyon yöntemi ile yapılmıştır. MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr ile karıştırılan lipaz polivinil alkol dispersiyonu içerisinde senteze bırakılır ve APS ilavesi ile nanolipaz sentezi gerçekleşir.

Yine ANADOLUCA yöntemi ile yapılan konkanavalin ile FTIC biyokonjugasyonu NHS-EDC ile gerçekleştirilmiştir. Sentezi yapılan nano konkanavalin ile 0,1 M NHS ile 0,4 M EDC bir saat karıştırılır ardından konjugasyon yapılacak olan FTIC de eklenerek bir saat daha karıştırılır. Santrifüj ile biyokonjugatlar elde edilir (Say 2009).

1.5. Plazma Yöntemi İle Polistren Plaka Modifikasyonu

Plazma, maddenin dördüncü hali olup, temel veya uyarılmış halde bulunan elektronlardan, iyonlardan, gaz atomlarından ve moleküllerinden oluşan ve toplam yükü nötr olan iyonize gaz olarak tanımlanabilmektedir. Maddenin plazma hali, çok yüksek sıcaklıklarda, güçlü elektrik veya manyetik alanlarda yani, gazlara iyonlaşma için yeterli enerji sağlanması halinde meydana gelmektedir (Şekil 1.25). Plazma elde etmek için gazlara enerji (iyonlaşma enerjisi) vermenin en yaygın yolu elektrik deşarjıdır. Plazma, düşük basınçta ya da atmosfer basıncında, bir elektrot çifti üzerinden doğru akım, mikrodalga, düşük frekans ve radyo frekansı voltajı geçirilerek oluşturulabilir. Plazma teknolojisi kullanılarak materyaller üzerinde çok farklı etkilerde işlemler yapmak mümkündür.



Şekil 1.25. Plazma halin özellikleri

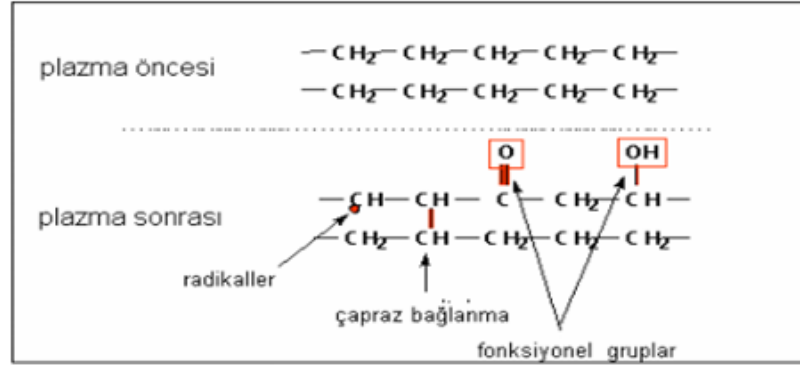
Plazma odacığına hidrokarbon, florokarbon gazları, azot içeren monomerler ya da silikon monomerleri beslenir, ardından bunlar elektronik olarak indirgenerek reaktif türler haline dönüşürler. Plazma polimerizasyonu, plazma içerisindeki reaktif türlerin birbirleri ve substrat ile etkileşimleri sonucunda substrat yüzeyine birikmeleri ile gerçekleşmektedir (Aslantaş,2011).

Plazma işlemi görmüş olan yüzeyin kimyasal içeriği kullanılan malzemeye ve gaz türüne göre değişmektedir. Proseste seçilen gaz türüne göre plazmada oluşacak işlem türü de değişmektedir (Çizelge1.2). Sistemde dolaşan gaz yüzey aşındırma, kaplama (polimerleşme, depolanma), aktivasyon gibi farklı etkilere sahiptir. Gazın akış hızı arttırılarak yüzey aşındırma ve depolanma hızı belli bir değere kadar arttırılabilir. Farklı deneysel parametrelerle değişik yüzey özelliklerine sahip malzemeler elde edilebilir (Yavuz 2007).

Çizelge 1.2. Plazma yönteminde kullanılan bazı gazların kullanım alanları ve etkileri

Uygulama	Gaz	Substrat	Görülen Etki
Yapışma			
	Ar, He, O ₂ , CF ₄	PE	Fiberlerin yapışma etkinliğinin arttırılması(kimyasal işlemlerle karşılaştırıldığında)
Membranlar			
	He, H ₂ , O ₂	PAN	Ters osmoz membranları
	H ₂ , Ar, N ₂	PE,PP, PVDF	Hidrofiliklik ve plazma ile aşılama

Plazma yöntemi, polimerik yapı oluşturan ve oluşturmeyen olarak ikiye ayrılır. Polimerik yapı oluşmayanlara örnek olarak N₂, O₂ plazmalarının kullanımı verilebilir. Bunlar, işlem sonucu yüzeyde farklı fonksiyonel gruplar oluştururlar yani yüzeye tek bir atom veya molekül fragmenti eklenmiş olur. Örneğin oksijen plazması ile polietilen üzerinde hidroksil, karbonil ve diğer oksijen bazlı gruplar oluşturulabilir (Şekil 1.26).



Şekil 1.26. Oksijen plazması sonrası polietilen polimerinin yapısı

Polimer yüzeye biyomoleküllerin kovalent bağlanması için ıslak kimyasal uygulama, silan monomerler, plazma, alev ve UV aşındırması gibi çeşitli metotlar kullanılabilir. Plazma kullanımında Ar, O₂, N₂, NH₃, N₂ + H₂, CO₂ gazları kullanılabilir (Yavuz 2007).

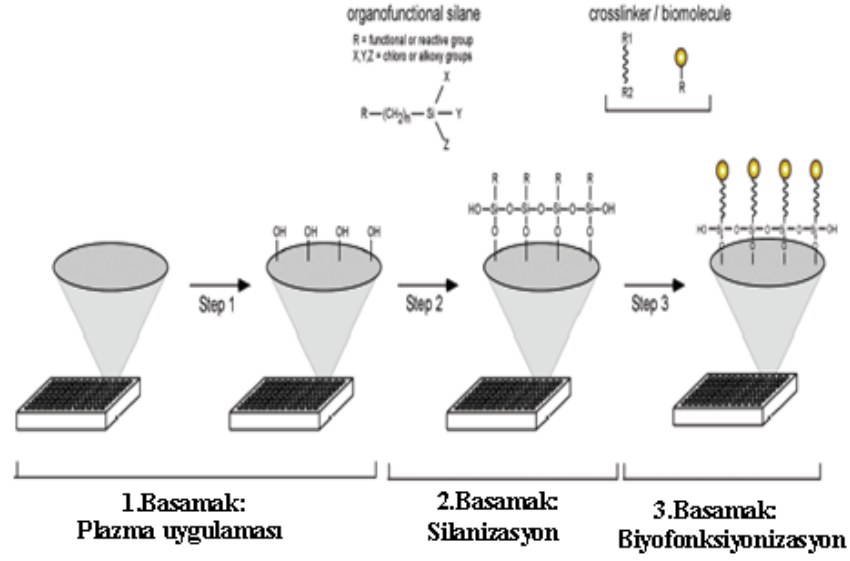
ELISA kullanımları için silanlanmış polistrene biyoimmobilizasyon için yapılan uygulamalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalara örnek olarak; plazma uygulamasına ek olarak silan bağlama işlemi de yapılabilir. Bu uygulama 3 aşamada gerçekleşir (Şekil 1.27):

Plazma uygulaması; argon plazması ile hidroksil grupların eklenmesi

Silanizasyon; organofonksiyonel silan ile silanizasyon

Biyofonksiyonizasyon; uygun çapraz bağlayıcılar ile biyoimmobilizasyon

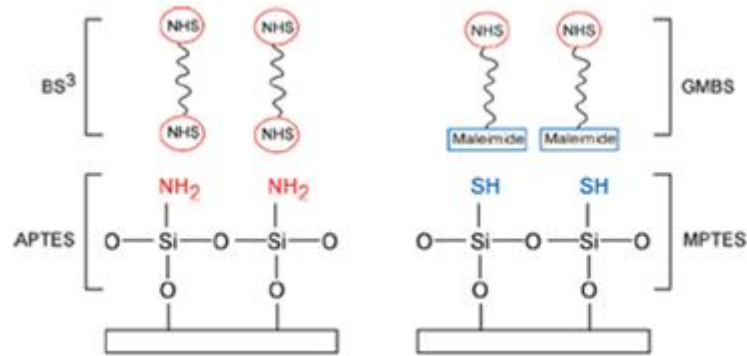
Argon plazma kullanılarak polistren milroplaka yüzeyine hidroksil kısımlar oluşturulur. Silanla fonksiyonlaştırılıp biyomoleküllerin kovalent immobilizasyonu için uygun çapraz bağlayıcı kullanılır. Her basamakta x-ray fotoelektron mikroskobu, su bağlantı açısı analizi, atomik güç mikroskobu, biyoimmobilizasyon etkinliği değerlendirilir (Yavuz 2007; North ve ark. 2010).



Şekil 1.27. Üç basamaklı plazma yöntemi

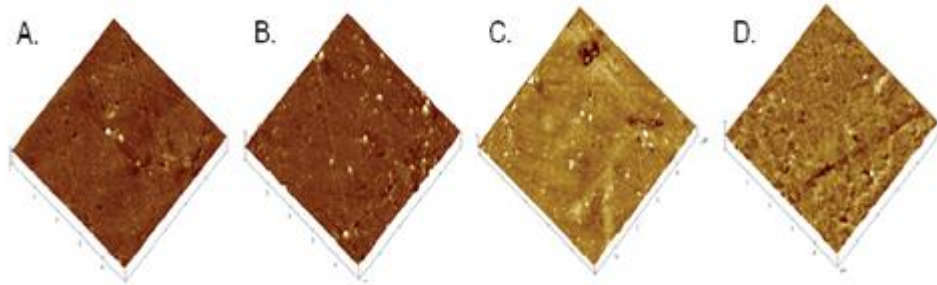
Plaka silanizasyonu ve IgG immobilizasyonu; asetik asit damlaları eklenerek pH 4'e ayarlanan metanolde hazırlanan 100 µL % 2'lik silan solüsyonu (MPTES (3-mercaptopropyl) Trietoksilan ya da APTES (3-aminopropyl) triethoxysilane) ile mikrolaka kaplanır. Azot altında 30 dakika inkübasyondan sonra, 3 kez metanolla yıkanıp kurutulur. Saf etanolde 1 mM GMBS (4-maleimidobutyric acid N-Hidroksisüksinamit ester)'nin 100 µL ile plaka kaplanmasıyla çapraz bağlayıcı uygulanır ve 30 dakika inkübasyona bırakılır (alternatif olarak; pH 6.0 da 10 mM fosfat tamponunda 50 mM BS³ (bis (sülfosüksinimidil) suberate)'in 100 µL kullanılabilir) (Şekil 1.28). Plaka 200 µL deiyonize su ile 3 kez yıkanır ve kurutulur, Cy3 ile işaretli antikorlar (PBS'de) eklenir ve 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. % 0.005'lik Tween 20 de 250 µL PBS ile her kuyu 3 kez yıkanır (North ve ark. 2010).

Silan solüsyonu	Çapraz bağlayıcı	Bağlantılar
APTES((3-aminopropyl)triethoxysilane)	BS ³ (bis (sulfosuccinimidyl) suberate)	Amin gruplar(NH ₂)-NHS
MPTES (3-mercaptopropyl) triethoxysilane	GMBS(4-maleimidobutyric acid <i>N</i> -Hydroxysuccinimide ester)	Tiol gruplar(SH)-Maleimid ve NHS



Şekil 1.28. Silanlama işleminde kullanılan maddeler ve sonrasında yüzeylerin kazandığı özellikler(North ve ark. 2010).

Oluşan yüzeylerin AFM görüntüleri alındığında plazma uygulaması yapılmış ve yapılmamış plakalar arasındaki farklar görülebilmekte (Şekil 1.29).



Şekil 1.29. Afm görüntüleri; A: işlem yapılmamış plaka. B: Silanlanmış plaka. C: Plazma uygulaması yapılmış..D: Plazma uygulanmış silanlanmış plaka (North ve ark. 2010).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Invitrogen ELISA kit içerisinde bulunan malzemeler kullanılmıştır. Bunlar; Rt TNF- α (Tümör Nekroz Faktör) Standart, Standart Diluent Buffer (SDB, Standart Seyreltici Tampon), Incubation Buffer (İnkübasyon tamponu), Rt TNF- α negatif ve pozitif kontrol (High- Low Control), anti-TNF- α antikor kaplı 96 kuyulu mikrolaka, Rt anti-TNF- α Biotin konjugat, Streptavidin-HRP konsantre ve çözücüsü, Wash Buffer (yıkama tamponu) konsantre (PBS'de % 1 Tween 20) ve çözücüsü, Stabilized Chromogen (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin), Stop Solution (durdurma solüsyonu, 0,5M H₂SO₄), Plate Cover (plaka kaplayıcı) olarak sıralanabilir.

ELISA kiti içinden çıkan malzemelerin dışında Amonyum Persülfat (APS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), fotosensitif monomer (MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr), çapraz bağlayıcı (N,N'- metilenbisakrilamid), Sülfürik asit (0,5M H₂SO₄), BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. TNF- α , rekombinant anti-TNF- α antikorları, Standart FcRn reseptör (mouse monoclonal B-8), Streptavidin (from *Streptomyces avidinii*) ve Horseradish Peroksidase (HRP) yüzey kaplamaları ve biyokonjugasyon işlemleri için kullanılmıştır.

Ayrıca bu malzemelerin yanı sıra cam tüpler, temiz filtre kağıdı, 96 kuyulu polistiren mikrolaka, yüksek akışlı selüloz membranlı Branstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmış su, mikropipet tüm çalışmalarda kullanılmıştır.

Mikrolaka kaplamaları yapıldıktan sonra ELISA işleminde elde edilen absorbans değerleri Biotek H1 Synergy model mikrolaka okuyucu ile GEN5 2,00 programı kullanılarak ölçülmüştür.

ELISA işleminde kullanılan mikrolakaların kaplama işlemi için RF Plazma Cihazı kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. İnvitrogen ELISA Kit İçinden Çıkan Protokolün Uygulanması

Öncelikle kitin uygulanabilirliğini test etmek ve kontrol amaçlı veriler elde etmek için Şekil 2.1’de verilen ve Invitrogen ELISA Kit içinden çıkan protokol uygulanmıştır. Toz halde bulunan Rt TNF- α Standart 2,000 pg/mL olacak şekilde SDB ile çözülerek hazırlanmış ve bu çözelti kullanılarak 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL ve 31,5 pg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler elde edilmiştir.

Antikor kaplı mikrolaka kuyularına ilk iki kuyu boş olacak şekilde çiftler halinde hazırlanan standartlar, negatif- pozitif kontroller 100’er μ l eklenmiştir.

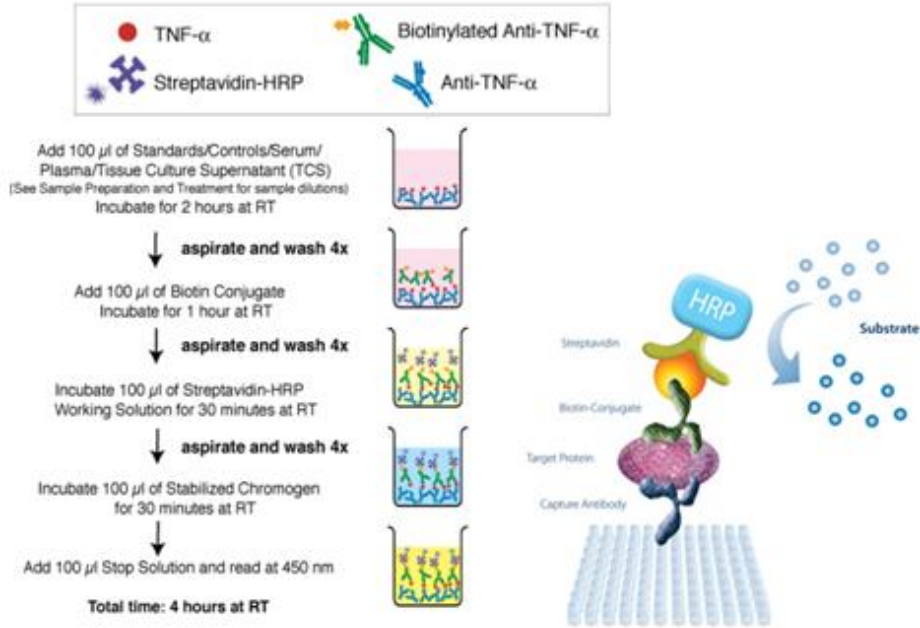
Yıkama solüsyonu hazırlarken 10 mL ‘Wash Buffer’ içerisine 240 mL deiyonize su eklenmiştir. 2 saat inkübasyondan sonra plaka üstü pipet ile çekilmiştir. Hazırlanan yıkama solüsyonu ile kuyularda yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama 4 kez tekrarlanmıştır.

ELISA kiti içinden çıkan Biotinli anti-TNF- α antikordan 100 μ l boş bırakılan ilk 2 kuyu hariç her kuyuya eklenmiştir. Üstü kapatılarak 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

1 saat sonunda mikrolaka ters çevrilerek kuyular boşaltılmış ve yıkama solüsyonu kullanılarak yıkama işlemi 4 kere uygulanmıştır. 40 μ l Streptavidin-Peroksidaz (HRP) konsantreye ve 4ml Streptavidin-Peroksidaz (HRP) çözücüsü eklenerek Streptavidin-Peroksidaz (HRP) kullanım için hazırlanmıştır. Hazırlanan Streptavidin-Peroksidaz (HRP) karışımı ilk kuyular hariç her kuyuya 100 μ l eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika üstü kapalı bekletilmiştir.

Süre sonunda kuyular boşaltılmış ve 4 kez yıkama işlemi uygulanmıştır. TMB her kuyuya 100 μ l eklenmiştir. Boş olan ilk kuyular bu aşamada doldurulmuştur.

Mikroplakanın üstü kapatılarak karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda renkleri maviye dönmüş sıvılar üzerine 100 μ l ‘Stop Solution’ eklenmiştir. Sıvıların rengi maviden sarıya döndüğünde mikrolaka okuyucu kullanılarak 450nm’de absorbands değerleri alınmıştır.



Şekil 2.1. ELISA protokolü

2.2.2. Nano-HRP sentezi ve anti- TNF- α antikorları ile biyokonjugasyonu

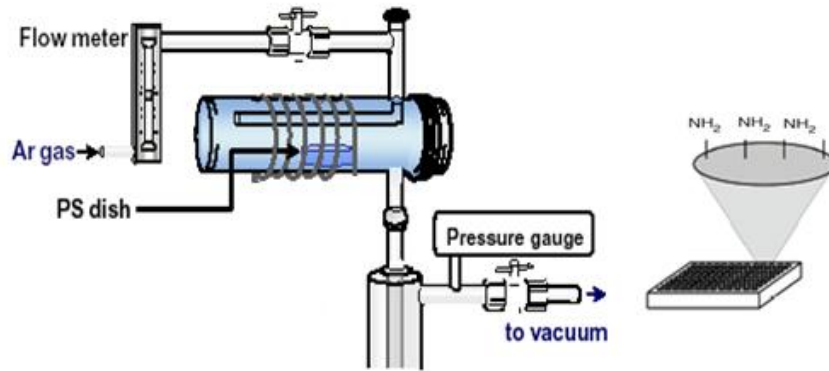
Nano HRP partikülleri, mikroemülsiyon polimerizasyonu tekniğiyle hazırlanmıştır. ANADOLUCA yöntemine göre sentez gerçekleştirilmiştir (Say 2009). 0,5g polivinil alkolün 45ml deiyonize suda dispers edilmiştir. 2000 ppm HRP, MATyr-Ru(bipyridine)₂ –MATyr ile 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 25ml polivinil alkolün dispersiyonunun içine HRP karışımı ilave edilmiş ve 20 dakika karıştırılmıştır. 0,02g APS 40ml deiyonize suda çözülmüş ve hazırlanan çözeltiden 20ml alınarak karışıma eklenmiştir. Elde edilen karışım azot atmosferinde, gün ışığında 2 gün karıştırılmıştır. Sentez sonrasında 1000 devirde 10 dk santrifüjlenmiş ve 3 kez deiyonize su ile yıkanarak nanomalzeme elde edilmiştir.

Sentezlenmiş olan nano-HRP ile anti-TNF- α antikorunun biyokonjugasyonu ANADOLUCA yöntemi referans alınarak yapılmıştır (Say 2009). Deiyonize su ile hazırlanan Nano-HRP dispersiyonuna 0,1M NHS ve 0,4M EDC'den 150 μ L eklenmiş ve 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çalışmalarda kullanılan TNF- α antijeninin antikoru olan anti- TNF- α antikoru karışımın içine eklenerek 1 saat konjugasyon gerçekleştirilmiştir. 1000 devirde 10 dk santrifüjlenmiş ve 3

kez deiyonize su ile yıkanarak nano-HRP konjuge anti- TNF- α antikoru elde edilmiştir.

2.2.3. Radyo Frekans Plazma yöntemi kullanılarak mikropalakaların modifikasyonu

Şekil 2.2’de gösterildiği gibi polisitren malzemedan yapılmış mikropalakaların modifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, mikropalakalar plazma cihazı içerisine yerleştirilmiş ve plazma polimerizasyonu öncesi 20mTorr başlangıç basıncı sağlanmıştır. Çalışma için amin kaplı ve hem amin hem de fotosensitif monomer kaplı plakalar elde edilmiştir. Sadece amin kaplı kuyular elde etmek için hidrazin, hem amin hem de fotosensitif monomer kaplı kuyular elde etmek için de hidrazin ve (MATyr-Ru(bipyr)₂-MATyr) 60mTorr basınç altında RF plazma yöntemi kullanılarak 10 dakika süre ile sistemden geçirilmiş ve plakaların kuyularına kaplanmıştır.



Şekil 2.2. Plazma yöntemi ile plaka kaplama işlemi

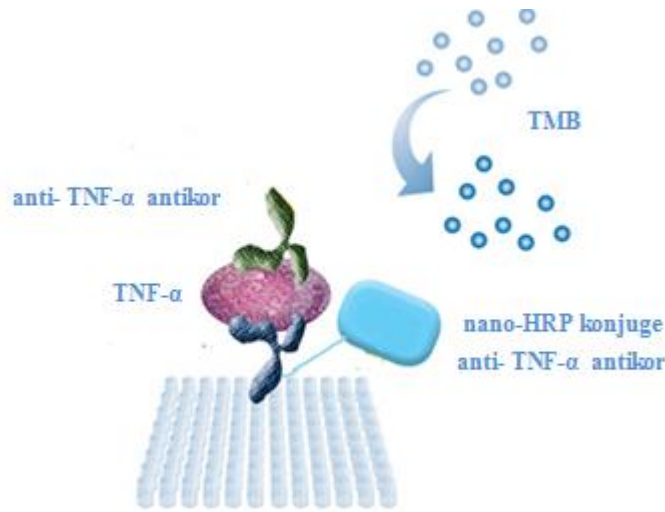
2.2.4. Amin gruplar bağlanmış mikropalaka kuyularına nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikoru kaplanması ve elde edilen modifiye mikropalakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-1)

Plazma yöntemi ile sadece amin grupların bağlandığı mikropalaka kuyularına hazırlanan nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikoru kaplanmıştır.

Bunun için kuyulara 20 µL NHS, 20 µL EDC eklenmiş ve sonrasında 20 µL fotosensitif monomer (MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr) ilave edilmiştir. Fotosensitif monomerli yüzeye 100 µL 100ng/mL olarak hazırlanmış nano-HRP konjuge anti-TNF-α antikor eklenmiştir. APS çözeltisi de eklenerek kaplama işlemi tamamlanmıştır.

Yüzey kaplamasının ardından 1mg/ml PBS içerisinde hazırlanan BSA kuyulara eklenerek bloklama işlemi yapılmıştır.

Yapılan modifikasyon sonrası yüzeye anti-TNF-α antikor ile biyokonjugasyonu yapılmış nano-HRP bağlandığı düşünerek kuyulardan fazla sıvılar alınarak ELISA protokolü uygulanmıştır (Şekil 2.3). 8 farklı konsantrasyonda (1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL ve 31,5 pg/mL) TNF-α standartları plaka kuyularına yüklenmiştir. 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yıkama sonrası TMB eklenerek 30dakika karanlıkta bekletilmiştir. Sıvıların mavi renk almasının ardından 0,5 M olarak hazırlanan H₂SO₄ 'den 100 µL her kuyuya eklenerek 450 nm'de okuma yapılmıştır.



Şekil 2.3. Yüzeye anti-TNF-α antikor konjuge HRP bağlandığı yöntem

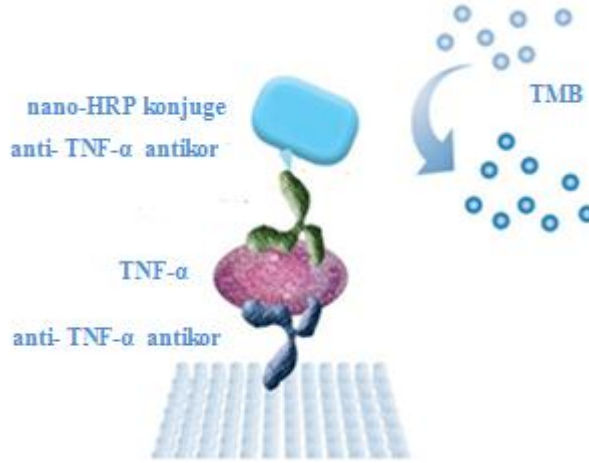
1 gün sonra kuyular 0,1 M NaOH ile yıkanarak yüzeydeki modifikasyonun bozulmadığı düşünülerek ELISA protokolü tekrarlanmıştır.

2.2.5. Amin gruplar bağlanmış mikropilaka kuyularına anti-TNF- α antikoruna kaplanması ve elde edilen modifiye mikropilakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-2)

ELISA sistemleri içerisinde en sık kullanılan yöntem sandviç ELISA yöntemidir. Bu yöntemin temel mantığı tespit edilmek istenen analitin spesifik iki antikor arasında kalması ve analite bağlanan ikinci antikora konjuge edilmiş enzim aracılığı ile ölçüm yapılmasıdır. Bu sistem ele alınarak yapılan çalışmalarda uygun konsantrasyonlarda antikor kaplamalarının yapılabilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Plazma yöntemi ile amin grupların bağlandığı mikropilaka kuyularına antikor kaplaması yapmak için 20 μ L NHS, 20 μ L EDC, 20 μ L fotosensitif monomer (MATyr-Ru(bipyr)₂-MATyr) ve 100 μ L 5 μ g/mL olarak hazırlanmış anti-TNF- α antikoruna eklenmiştir. Ardından APS çözeltisinden eklenerek kaplama işlemi tamamlanmış ve 1mg/ml PBS içerisinde hazırlanan BSA ile bloklama yapılmıştır.

Anti-TNF- α antikoruna kaplanarak hazırlanmış olan mikropilaka kuyularda Şekil 2.4’de gösterildiği gibi sandviç ELISA sistemi uygulanmıştır. Hazırlanan 8 farklı konsantrasyondaki TNF- α standartları (1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL ve 31,5 pg/mL) kuyulara eklenerek 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yüzeydeki antikorlara bağlanamayan antijenlerin ortamdan uzaklaştırılması için yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmıştır. Sentezlenmiş olan nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikoruna 5 μ g/mL olarak 100 μ L kuyulara eklenmiştir ve 1 saat oda koşullarında bekletilmiştir. Süre sonunda hazırlanan yıkama solüsyonu ile yıkamalar yapılmıştır ve 100 μ L TMB kuyulara eklenmiştir. Karanlık ortamda 30 dakika bekletildikten sonra sıvıların renklerinin mavi olduğu görülmüştür. 0,5 M olarak hazırlanan H₂SO₄ 100 μ L olarak kuyulara eklenmiştir. Sıvıların renkleri sarıya dönmüştür ve 450 nm’de mikropilaka okuyucuda absorban değerleri alınmıştır.



Şekil 2.4. Yüzeye anti-TNF- α antikoruna bağlandığı yöntem

Kuyular 0,001 M NaOH ile yıkanmıştır. Yüzeye kaplanan anti-TNF- α antikorunun kuyularda sabit kaldığı düşünülerek yıkama sonrası ELISA işlemi tekrarlanmıştır. Aynı konsantrasyonlarda hazırlanan standart TNF- α antijenleri kuyulara verilmiştir. 2 saat sonra yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmış ve hazırlanan nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikoruna 5 $\mu\text{g/mL}$ olarak 100 μL kuyulara eklenmiştir. Yıkama solüsyonu ile yıkama sonrasında TMB kuyulara verilmiştir. Karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra H_2SO_4 100 μL olarak kuyulara eklenmiş ve mikropilaka okuyucuda absobans değerleri alınmıştır.

0,001 M NaOH ile kuyuların yıkanması ve ELISA yönteminin aynı kuyularda tekrarlanması işlemine 5 kez devam edilmiştir.

2.2.6. Amin gruplar bağlanmış mikropilaka kuyularına FcRn reseptörü kaplanması ve elde edilen modifiye mikropilakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-3)

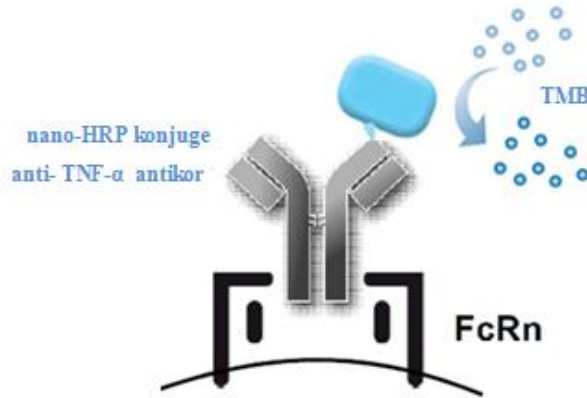
Amin gruplar bağlanmış olan mikropilaka kuyularına FcRn reseptörünün kaplanması için 20 μL NHS, 20 μL EDC, 20 μL fotosensitif monomer (MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr) ve 100 μL 20 $\mu\text{g/mL}$ olarak hazırlanan FcRn reseptörü eklenmiştir. APS eklenmesi ile FcRn kaplı kuyular elde edilmiştir.

FcRn kaplanmış olan mikropilakaya 20 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda hazırlanan nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikorları

eklenmiştir. Böylece FcRn reseptörlerine farklı konsantrasyonlardaki konjugatların bağlanıp bağlanmadığı ve elde edilen FcRn kaplı kuyuların tekrar kullanılabilirliği test edilmiştir.

2 saat inkübasyondan sonra yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. TMB kuyulara eklendikten sonra 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Mavi renk alan sıvıların üstüne 0.5 M H₂SO₄ eklenmiştir. Sıvıların rengi sarıya döndükten sonra 450 nm’de absorbans değerleri alınmıştır.

Modifiye kuyular ile ELISA işlemi gerçekleştirildikten sonra tekrar kullanımı test etmek için kuyular 0,001 M NaOH ile yıkanmıştır. Burada FcRn ile antikor arasındaki bağlantının koparılması ile ELISA işleminin tekrarlanması sonucunda, yüzeydeki FcRn yapıları antikorların tekrar bağlanma miktarları test edilerek FcRn kaplı mikropalakaların tekrar kullanılabilirliği denenmiştir. Aynı konsantrasyonlarda nanoenzim konjuge antikorlar kuyulara tekrar verilmiştir. İnkübasyon ve yıkamalar sonrasında absorbans değerleri alınmıştır. Nanoenzim bağlı antikor ile yapılan çalışma sonucu elde edilen absorbans değerleri konjugatların konsantrasyonları ile orantılı olarak değiştiği için tekrar yıkama ve ELISA işlemleri Şekil 2.5’de gösterildiği gibi nanoenzim konjugatları ile yapılmıştır.



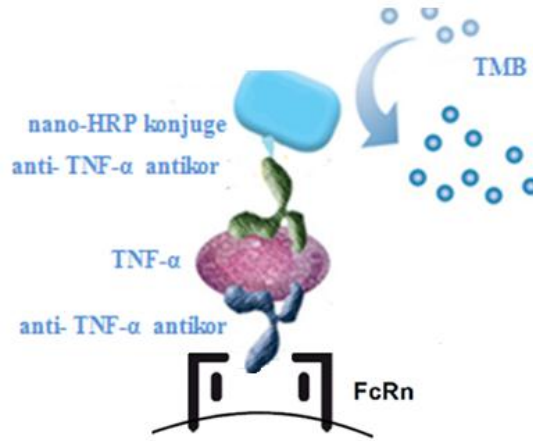
Şekil 2.5. FcRn kaplı mikropalakalarda ELISA işlemi

2.2.7. Amin gruplar ve fotosensitif monomerler bağlanmış mikropilaka kuyularına FcRn reseptörü aracılığı ile anti-TNF- α antikorlarının kaplanması sonucunda elde edilen modifiye mikropilakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-4)

Plazma cihazı kullanılarak hidrazin yardımı ile amin gruplar ve fotosensitif monomer olarak MATyr-Ru(bipyridine)₂ – MATyr kaplanmış olan polisitren plakalara 5µg/ml FcRn reseptörü 100µl eklenmiş ve APS çözeltisi ilave edilerek kaplama işlemi tamamlanmıştır.

FcRn kaplanan kuyulara 10µg/ml anti-TNF- α antikor 100µl eklenerek bir gün oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Antikorlar da FcRn aracılığı ile kuyulara bağlandıktan sonra 1mg/ml BSA (PBS’de) ile bloklama işlemi yapılmış ve sonrasında antikor kaplı plaka hazır hale gelmiştir.

FcRn aracılığı ile antikorların kaplandığı mikropilakalarda Şekil 2.6’de gösterildiği gibi ELISA işlemi gerçekleştirilmiştir. 1000pg/mL, 500 pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62,5pg/mL ve 31,5pg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan TNF- α antijenleri kuyulara 100µl eklenmiştir. 2 saat oda koşullarında inkübasyondan sonra yıkama solüsyonu ile bağlanmayan antijenler kuyulardan uzaklaştırılmıştır. 1µg/ml nanoHRP konjuge anti-TNF- α antikor 100µl eklenmiş ve oda koşullarında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bağlanmayan konjugatlar yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılarak peroksidaz substratı olan TMB kuyulara 100µl eklenmiştir ve reaksiyonun gerçekleşmesi için karanlıkta yarım saat bekletilmiştir. Ölçüm öncesi reaksiyonu sonlandırmak için 5M H₂SO₄ kuyulara eklenmiştir ve kuyulardaki sıvıların renkleri sarıya döndükten sonra 450nm’de mikropilaka okuyucu yardımı ile absorbans değerleri alınmıştır.



Şekil 2.6. FcRn ve antikor kaplı mikrolakalarda ELISA işlemi

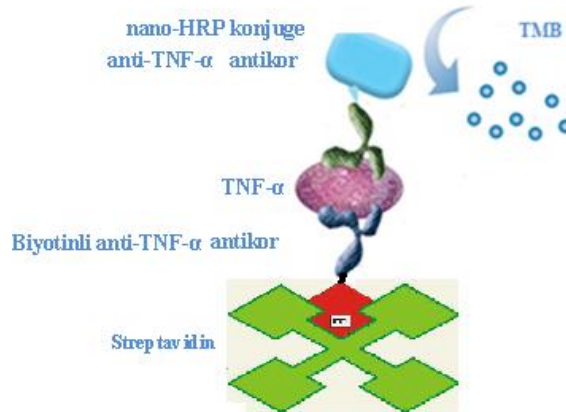
Mikroplaka kuyularında kaplama işlemi ve ELISA işlemi gerçekleştirildikten sonra kuyuların tekrar kullanılabilirliğini denemek için kuyular 0,0001M NaOH (pH 5,5) ile yıkanarak aynı konsantrasyonlarda TNF- α eklenerek ELISA işlemi tekrarlanmıştır. Asidik pH ile çalışılmasının nedeni FcRn ile antikor arasındaki bağlantının 6,5 ve üzeri pH değerlerinde zarar görmesidir. Bu işlemde istenen, kuyulara kaplanan FcRn ve buna bağlı antikora zarar vermeden sadece antijen ile bağlantısını keserek kuyuları tekrar kullanılabilir hale dönüştürülmüştür. Aynı kuyular üzerinde ELISA işleminin 5 kez tekrarlanmıştır.

2.2.8. Amin gruplar ve fotosensitif monomerler bağlanmış mikrolaka kuyularına Streptavidin aracılığı ile Biotinli anti-TNF- α antikorlarının kaplanması sonucunda elde edilen modifiye mikrolakaların ELISA yönteminde kullanılması (Yöntem-5)

Plazma cihazı ile amin gruplar ve fotosensitif monomer olan MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr polisitren plaka kuyularına kaplandıktan sonra 5 μ g/ml streptavidin eklenmiştir ve APS çözeltisi ilave edilerek streptavidin kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Streptavidin kaplanan kuyular üzerinden fazla sıvı alınarak 10 μ g/ml biyotinli anti-TNF- α antikor 100 μ l eklenerek bir gün oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 1mg/ml PBS içerisinde hazırlanan BSA ile

bloklama işlemi yapılmıştır. Biotinli antikörler streptavidin aracılığı ile kuyulara bağlandıktan sonra antikör kaplı plaka hazır hale gelmiştir.

Streptavidin aracılığı ile biyotinli antikörlerin kaplandığı mikrolakalarda Şekil 2.7’de gösterildiği gibi ELISA işlemi gerçekleştirilmiştir. 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL ve 31,5 pg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan TNF- α antijenleri kuyulara 100 μ l eklenmiştir. 2 saat oda koşullarında inkübasyondan sonra yıkama solüsyonu ile bağlanmayan antijenler kuyulardan uzaklaştırılmıştır. 1 μ g/ml nanoHRP konjuge anti-TNF- α antikoru kuyulara 100 μ l eklenmiş ve oda koşullarında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bağlanmayan konjugatlar yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılarak peroksidaz substratı olan TMB kuyulara 100 μ l eklenmiştir ve reaksiyonun gerçekleşmesi için karanlıkta yarım saat bekletilmiştir. Ölçüm öncesi reaksiyonu sonlandırmak için 5M H₂SO₄ kuyulara eklenmiştir ve kuyulardaki sıvıların renkleri sarıya döndükten sonra 450nm’de mikrolaka okuyucu yardımı ile absorbans değerleri alınmıştır.



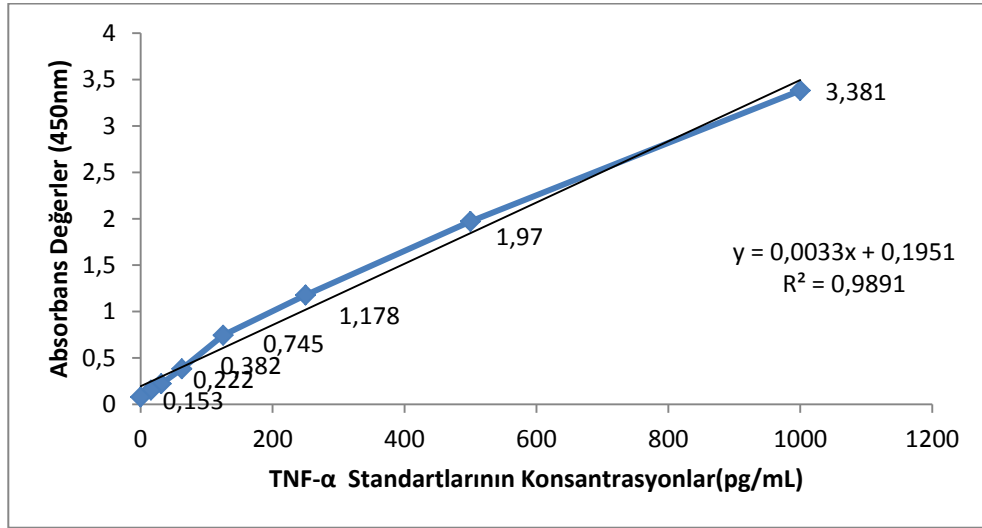
Şekil 2.7. Streptavidin ve Biotinli antikör kaplı mikrolakalarda ELISA işlemi

Mikrolaka kuyularının kaplama işlemi ve ELISA işlemi gerçekleştirildikten sonra kuyuların tekrar kullanılabilirliğini denemek için kuyular 0,0001M NaOH ile yıkanarak aynı konsantrasyonlarda TNF- α eklenerek ELISA işlemi tekrarlanmıştır. Bu işlemde istenen kuyulara kaplanan streptavidin ve buna bağlı biyotinli antikora zarar vermeden sadece antijen ile bağlantısını keserek kuyuları tekrar kullanılabilir hale dönüştürülmüştür. Aynı kuyular üzerinde ELISA işleminin 5 kez tekrarlanmıştır.

3. BULGULAR VE SONUÇLAR

3.1. Invitrogen ELISA Kit protokolünün sonuçları

Invitrogen ELISA kiti içinden çıkan prosedür aynen uygulanmıştır. Uygulama sonunda 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.2 pg/mL ve 15.6 pg/mL konsantrasyonlarında standartlar için mikropilaya okuyucu ile 450 nm’de absorban değerleri elde edilmiştir. Deneyin sağlıklı olması için ikili uygulamalar halinde çalışılmış ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak standartlara göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.1).

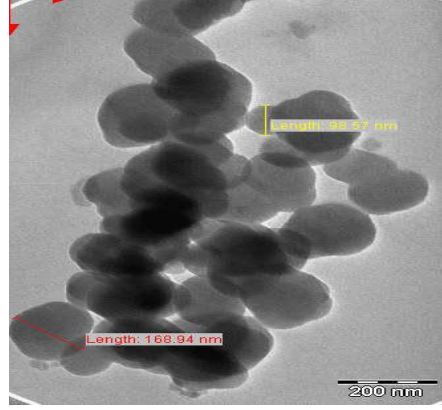


Şekil 3.1. ELISA kit prosedürü uygulandığında elde edilen kalibrasyon eğrisi

Deney sonrasında elde edilen absorban değerleri prosedürde verilen değerlerle neredeyse aynı çıkmıştır. Bu da kitte herhangi bir bozulma olmadığını ve sistemin ileriki çalışmalar için yol gösterici olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Invitrogen ELISA kit duyarlılığına bakıldığında, kör standardın 20 kez tekrarlanan ölçümü sonucunda elde edilen ortalama absorban değeri ve standart sapması kullanılarak hesaplanan minimum tayin dozu yani tayin limiti (Limit of Detection) 1,7 pg/mL olarak bulunmuştur.

3.2.Nano-HRP Karakterizasyonu

Sentezlenen nanopartiküllerin geçirgenlik elektron mikroskop (TEM) görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Nano HRP TEM görüntüsü

3.3. Modifiye Mikroplakalar Kullanılarak Yapılan ELISA Sonuçları

3.3.1. Yüzeylerine nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikoru kaplanan mikroplakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-1)

Deney sonucu oluşan renklerin çok koyu olduğu gözlenmiştir. Mikroplaka okuyucu ile absorbans değerleri alındığında tüm kuyular için 0.602 değeri elde edilmiştir. Standart içermeyen kuyu için bile aynı değerin elde edilmesi, antijen varlığına dayanan bir ölçüm yapılmadığını, sadece enzim-substrat ilişkisine dayalı renk oluşumu gerçekleştiğini göstermiştir. Antijen miktarıyla orantılı olarak değerlerde azalma olmadığı için kullanılabilir bir kalibrasyon grafiği elde edilememiştir.

NaOH ile yıkama yapıp ELISA işlemi tekrarlandığında değerlerde azalma olduğu görülmüştür.

Yapılan deneylerde yüzeye HRP bağlandığı için antijen tutunmamış olsa da substrat eklendiğinde enzim substrat bağlantısından dolayı renk değişiminin gerçekleştiği görülmüştür. Fakat klinik çalışmalar için enzim-substrat ilişkisiyle

orantılı olarak antijen miktarının tayin edilebilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem terkedilmiştir.

3.3.2. Yüzeylerine anti-TNF- α antikorü kaplanan mikropalakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-2)

Amin kaplanmış olan mikropalaka kuyularına anti-TNF- α antikorü bağlanmıştır. ELISA işlemlerinden sonra yıkamalar ile kuyular tekrar kullanılmıştır.

5 μ g/mL konsantrasyonda antikor ile kaplı plaka kuyularına TNF- α standartları 1000 pg/mL, 500 pg/ml, 250 pg/mL, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml ve 15.6 pg/ml konsantrasyonlarda kuyulara yüklenmiş ve 5 μ g/ml nano-HRP konjuge anti-TNF- α antikorü kullanılarak ELISA işlemi yapılmıştır.

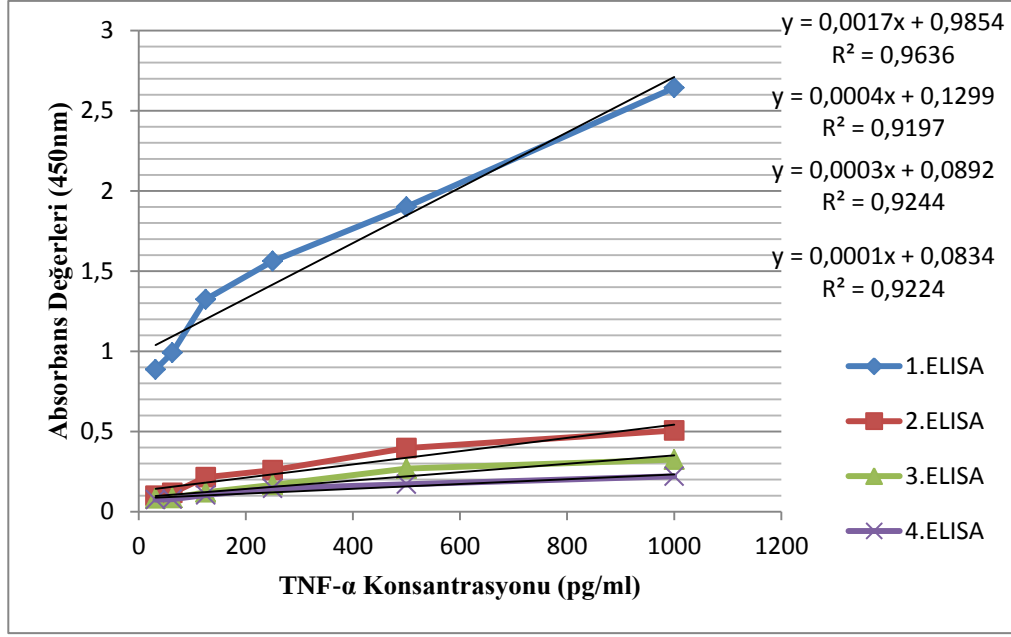
Oluşan mavi renk orjinal ELISA sonucuna daha yakın çıkmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3.Yüzey kaplaması Anti-TNF- α antikor ile yapılan çalışma sonuçları



Şekil 3.4. 4.ELISA sonucu oluşan renk değişimleri



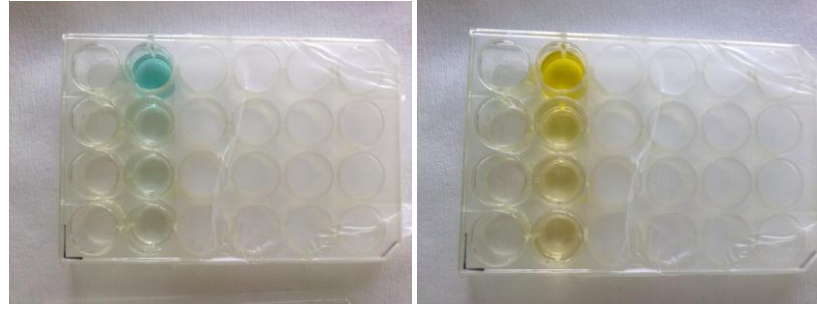
Şekil 3.5. Anti-TNF- α antikorlu ELISA sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrisi

NaOH ile yıkamalar yapıp sonuçlar alınmıştır. Renk oluşumlarının (Şekil 3.4) düzgün çıkmasının yanında değerlerde yıkamalar ilerledikçe düşmeler olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5). Değerlerdeki bu düşme, 1. ELISA sonrası yapılan yıkamanın ardından yüzeye kaplanan antikorların da ortamdan uzaklaştığını göstermiştir. Fakat bu çalışmada absorbans değerlerinin konsantrasyonlar ile orantılı olarak değişmesi, yüzey kaplamasının etkin bir şekilde yapıldığını ve sandviç sisteminin çalıştığını göstermiştir.

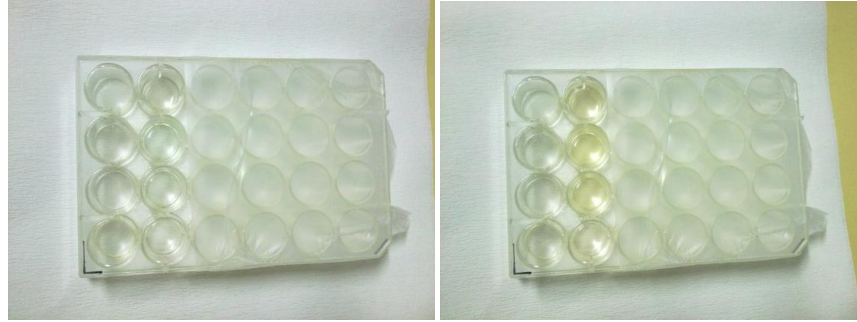
3.3.3. Yüzeylerine FcRn reseptörleri kaplanan mikropalakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-3)

Bu çalışmada amaç FcRn kaplı mikropalakaların eldesi ve tekrar kullanılabilirliklerinin test edilmesidir. FcRn kaplanan mikropalaka kuyularına 20 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında nanoHRP konjuge anti-TNF- α antikorları verilmiştir. Elde edilen absorbans sonuçları ve renk dönüşümlerinden (Şekil 3.6) FcRn reseptörü aracılığı ile nanoenzim bağlı antikorların yüzeye etkin bir şekilde bağlandığı görülmüştür.

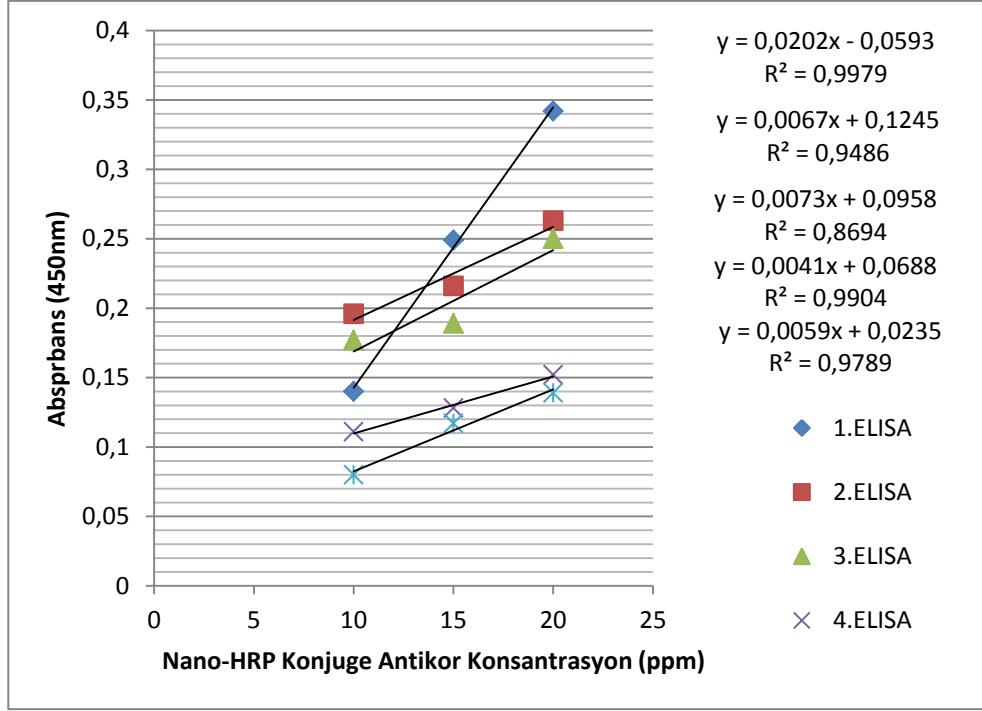
NaOH ile kuyular yıkandıktan sonra FcRn ile antikorların bağlantısı koparılmış ve FcRn kaplı kuyular tekrar kullanıma hazır hale getirilmiştir. Aynı konsantrasyonlarda nanoenzim bağlı antikorlar sisteme tekrar verildiğinde yine konsantrasyonla orantılı renk dönüşümleri gözlenmiştir (Şekil 3.7). Absorbans değerlerinde düşmeler olsa da değişen konsantrasyon değerleriyle orantılı olarak absorbans değerlerinin de değişmesi kuyulardaki FcRn reseptörlerine antikorların bağlanabildiğini göstermiştir. Kuyuların yıkanması ve elde edilen FcRn kaplı plakanın tekrar tekrar ELISA işleminde kullanılması işlemi 5 kez gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. FcRn kaplı kuyularda yapılan ELISA işleminde oluşan renk dönüşümleri



Şekil 3.7. FcRn kaplı kuyularda yapılan 5. ELISA işleminde oluşan renk dönüşümleri



Şekil 3.8. FcRn kaplı kuyular kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen absorptans değerleri

Renk değişimlerine ve kalibrasyon eğrisine (Şekil 3.8) bakıldığında FcRn reseptörlerine antikorların etkin bir şekilde bağlandığı ve orantılı absorptans değerlerinin elde edildiği görülmüştür.

3.3.4. Yüzeylerine FcRn reseptörleri aracılığı ile anti-TNF- α antikorlu kaplanan mikrolakalar ile yapılan ELISA sonuçları(Yöntem-4)

Bir önceki çalışmada FcRn kaplı kuyuların kullanılabilirliği test edildikten sonra sandviç yöntemine geçilmiştir. Yapılan çalışmada amaç, FcRn ve ona bağlı antikorlar ile kaplı mikrolaka eldesi ve tekrar kullanılabilirliğinin denenmesidir.

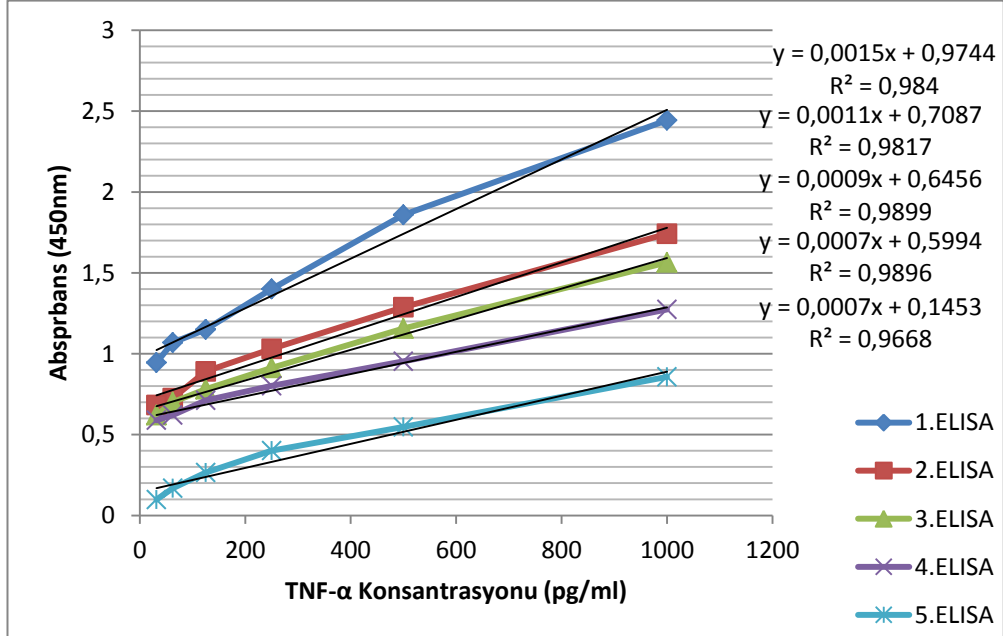
Yüzey modifikasyonundan sonra ELISA işlemi gerçekleştirilmiştir ve değişen konsantrasyonla orantılı olarak absorptans değerlerinde de değişimler gözlemlenmiştir. Aynı kuyular üzerinde 5 kez ELISA işlemi gerçekleştirilmiş ve absorptans değerleri alınmıştır.



Şekil 3.9. FcRn reseptörleri ve anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 1.ELISA sonuçları



Şekil 3.10. FcRn reseptörleri ve anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 5..ELISA sonuçları

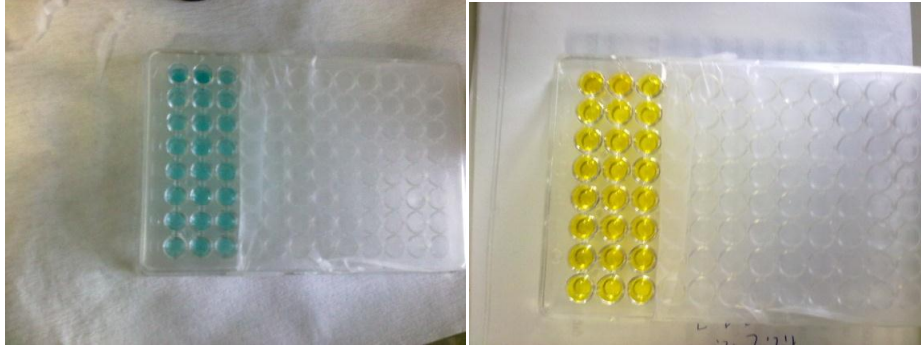


Şekil 3.11. FcRn ve Anti-TNF- α antikoru ile kaplı kuyular ile yapılan ELISA sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrisi

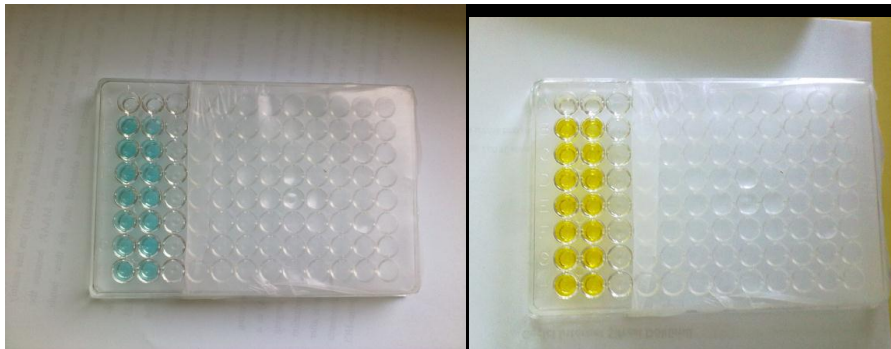
FcRn ile antikorların arasındaki güçlü bağlanma özelliği kullanılarak mikrolaka kuyularına antikorlar kaplanmıştır. Yapılan ELISA işlemleri ardından absorbans değerlerinde bir miktar azalma olsa da konsantrasyonlar ile orantılı absorbans değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.11). Bu da antikor kaplı kuyular elde ederken FcRn reseptörlerinden faydalanabileceğini göstermiştir.

3.3.5. Yüzeylerine Streptavidin aracılığı ile Biotinli anti-TNF- α antikoru kaplanan mikrolakalar ile yapılan ELISA sonuçları (Yöntem-5)

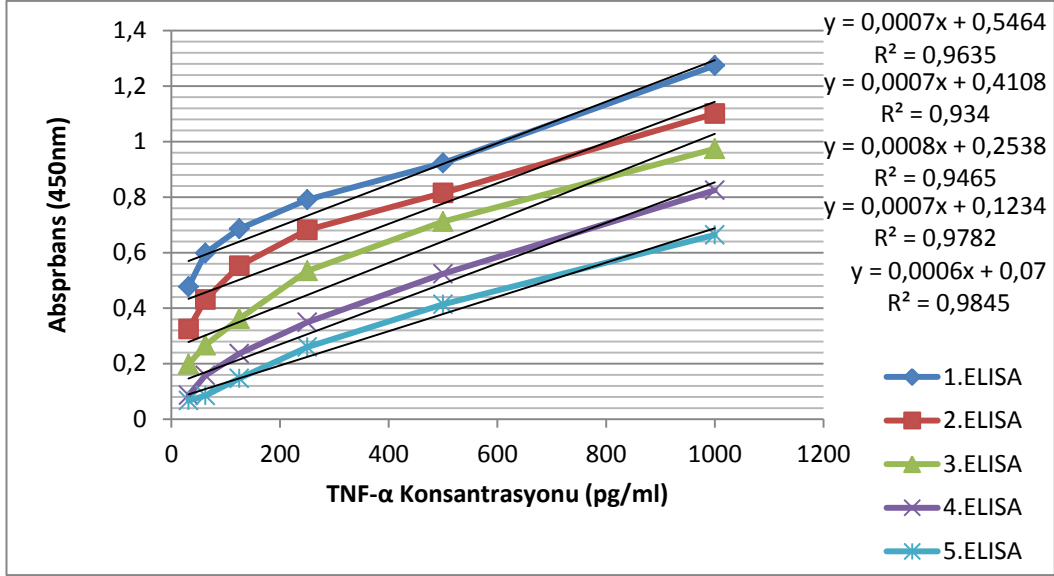
Streptavidin-biotin arasındaki güçlü bağlanma kapasitesi kullanılarak çalışmanın iyileştirilmesi için kuyular streptavidin aracılığı ile biyotin bağlı antikorlar ile kaplanmıştır. Yıkama işlemleri gerçekleştirilerek ELISA işlemi aynı kuyular üzerinde tekrarlanmıştır. Aynı konsantrasyonlar için elde edilen absorbans değerlerinin çok düşmemesi ve orantılı değişmesi streptavidin aracılığı ile antikor kaplı plakaların eldesinin gerçekleştirilebildiğini ve tekrar tekrar kullanılabildiğini göstermiştir.



Şekil 3.12. Streptavidin ve biyotinli anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 1..ELISA sonuçları



Şekil 3.13. Streptavidin ve biyotinli anti-TNF- α antikoru kaplanan kuyularda 5..ELISA sonuçları



Şekil 3.14. Streptavidin ve Biotinli Anti-TNF- α antikorlu ile kaplı kuyular ile yapılan ELISA sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrisi

Elde edilen renk değişimleri sisteme verilen antijen konsantrasyonu ile orantılı olarak yüzeye bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 3.12). Yıkamalar ardından yapılan ELISA işlemlerinden sonra oluşturulan kalibrasyon eğrisi de değerlerde düşmeler olsa bile kuyuların tekrar tekrar kullanılabildiğini göstermiştir (Şekil 3.14). Streptavidin ile biyotin arasındaki bağlanma özelliği kullanılarak yüzeye kaplanan antikorların daha etkin bir şekilde sistemde kalması sağlanmıştır.

3.4. Sonuçların Analitik Olarak Değerlendirilmesi

Tayin limitinin test edilmesi sistemin duyarlılığı açısından önemlidir. Tayin limitini elde etmek için LOD (Limit Of Detection) değeri hesaplanmıştır. Tayin limiti, ölçülebilen (sinyal olarak okunabilen) fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Tayin limitin belirlenmek için kör örnek 20 defa ölçülmüş ve ölçümlerin aritmetik ortalaması ve standart sapması bulunarak tayin limiti hesaplanmıştır.

Oluşturulan sistemde kullanılan standart antijen konsantrasyonları 1000pg/ml ile 31,2pg/ml arasında değişmektedir. Kör standartın 20 kez tekrar alınan absorbans değerinden elde edilen ortalama değeri ve standart sapması kullanılarak

hesaplanan tayin limiti yani ölçülebilir en düşük konsantrasyon değeri antikor kaplı mikrolakaların kullanıldığı sistem (Yöntem-2) için 2,15pg/ml, FcRn aracılığı ile antikor kaplı mikrolaka kullanılan çalışma (Yöntem-4) için 2,13pg/ml ve streptavidin aracılığı ile yüzeye biyotinli antikorların bağlandığı mikrolaka ile yapılan çalışma (Yöntem-5) için 2,11pg/ml olarak bulunmuştur. Invitrogen ELISA Kiti için tayin limiti 1,7pg/ml olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca ölçüm limiti (Limit Of Quantitation) değeri de hesaplanmıştır. Ölçüm limiti, analitin kabul edilebilir düzeyde doğru ve kesin olarak metot koşullarında belirlenebildiği en düşük seviyedir. Invitrogen ELISA kit için bu değer 4,1pg/ml iken elde edilen tekrar kullanılabilen mikrolaka kuyuları için hesaplandığında, antikor kaplı mikrolakaların kullanıldığı sistem (Yöntem-2) için 6,45pg/ml, FcRn aracılığı ile antikor kaplı mikrolaka kullanılan çalışma (Yöntem-4) için 6,39pg/ml ve streptavidin aracılığı ile yüzeye biyotinli antikorların bağlandığı mikrolaka ile yapılan çalışma (Yöntem-5) için 6,33pg/ml olarak bulunmuştur.

4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

ELISA sistemlerinde kullanılan mikropalakalar analizin özelliğine göre çeşitlendirilmektedir. Piyasada çalışmaya spesifik olarak seçilen pek çok modifiye plakalar mevcuttur. ELISA işleminde araştırmacı, kaplama işlemini kendi yapabileceği gibi piyasada mevcut bulunan çeşitli yapılar ile kaplı plakaları satın da alabilmektedir fakat bu plakaların satın alınması maliyet açısından büyük bir külfet haline gelebilmektedir. Bireysel düşünmenin dışında ülke ekonomisi açısından olaya bakıldığında ise, bu plakaların üretiminin Türkiye’de olmaması ve yurt dışından temin edilmesi, maliyet açısından yine büyük önem kazanmalarına neden olmaktadır.

ELISA testi için ticari olarak alınan kit içerisinde 2 adet çalışmanın amacına uygun olarak kaplanmış mikropalaka bulunur. Bu plakalar çalışma bitiminden sonra atılır. Deneylere devam edilmek istendiği takdirde kit içinden çıkan kaplı mikropalaka sayısı az olduğu için boş plaka üzerine uygun antikor ya da antijen kaplanır fakat bu durumda da deney sonunda plaka çöpe atılır. ELISA kitlerinin fiyatlarının yüksek olmasının yanında alınan herhangi bir polistren plaka da yüksek fiyatlara sahiptir. Bu çalışma sonucunda elde edilen mikropalakalar ile deney sonunda araştırmacı plaka kuyularını yıkamaya tabi tutarak sonraki çalışmalarında da kullanabilecek böylece her deney için yeni plaka almasına gerek kalmayacaktır.

İki firmanın çeşitli kaplamalarla piyasaya sunduğu plakaların fiyatları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de verilmiştir (Bioword 2012, Thermo 2012).

Çizelge 4.1. Thermo Firması Ürünleri

Plaka tipi (5 adet)	Fiyatı		Maliyeti
Protein-A kaplı mikropalakalar	192,96 €	457,32₺	1006,093₺
Biotin kaplı mikropalakalar	170,74 €	404,65₺	890,23₺
Streptavidin kaplı mikropalakalar	187,11 €	443,45₺	975,59₺
Protein G kaplı mikropalakalar	215,18 €	509,94₺	1121,94₺

Çizelge 4.2. Bioword Firması Ürünleri

Plaka tipi (5 adet)	Fiyatı		Maliyeti
Protein-A kaplı mikrolakalar	\$98.67	177,2113₺	389,865₺
Biotin kaplı mikrolakalar	\$129.03	231,7379₺	509,823₺
Streptavidin kaplı mikrolakalar	\$162.69	292,1912₺	642,821₺
Protein G kaplı mikrolakalar	\$178.40	320,4064₺	704,894₺
Cobalt kaplı mikrolakalar	\$167.18	300,2553₺	660,562₺
Concanavalin A kaplı mikrolakalar	\$195.79	351,6388₺	773,605₺
COOH- kaplı mikrolakalar	\$109.96	197,4882₺	434,474₺
Copper kaplı mikrolakalar	\$178.40	320,4064₺	704,894₺
Fibronectin kaplı mikrolakalar	\$177.28	318,3949₺	700,469₺
Gelatin kaplı mikrolakalar	\$157.94	283,6602₺	624,052₺
Glutathione kaplı mikrolakalar	\$173.91	312,3424₺	687,153₺
Heparin kaplı mikrolakalar	\$98.45	176,8162₺	388,996₺
Jacalin kaplı mikrolakalar	\$218.79	392,9468₺	864,483₺
Nickel kaplı mikrolakalar	\$178.40	320,4064₺	704,894₺
Poly-Lysine kaplı mikrolakalar	\$164.44	295,3342₺	649,735₺
Calmodulin kaplı mikrolakalar	\$185.13	332,4935₺	731,486₺
Wheat Germ Agglutinin kaplı mikrolakalar	\$164.05	294,6338₺	648,194₺
Zinc kaplı mikrolakalar	\$167.18	300,2553₺	660,562₺
Heparin kaplı white mikrolakalar	\$120.45	216,3282₺	475,922₺

Dolar ve euro üzerinden hesaplandığında 5 adet plaka için yüksek fiyatlarda harcamalar yapmak gerekmektedir. Örneğin, protein A kaplı plaka ile çalışan araştırmacı 5 adet plaka içeren ürünü satın aldığı anda ödediği miktar 389,865₺ ve çoğu çalışmanın sadece 5 analizle bitmeyeceği düşünülürse fiyatlar çok yükselecektir. Ayrıca hastanelerde ve kriminal laboratuvarlarda da sıklıkla kullanılan ELISA sistemlerinde çok fazla miktarda plaka kullanılmaktadır.

Plakaların tek kullanımlık olması ve yurt dışından temin edilmesi maliyeti çok arttırdığından dolayı hem kuyuların kaplamalarının istenildiği gibi yapılarak elde edilen ürünün raf ömrünün uzatılması hem de tekrar kullanılabilir olması büyük önem taşımaktadır.

Mikroplakaların polisitren yüzeyleri ile protein moleküllerin hidrofobik amino asit yüzeyleri arasındaki hidrofobik bağlantılar sayesinde immobilizasyonu yapılabilir. Fiziksel absorpsiyon, basit hazırlanma basamakları ve yüksek kararlılık gibi avantajlara sahiptir. Fakat küçük proteinlerin ve peptidlerin fiziksel absorpsiyon işlemleri sırasında bozulmaları mümkün olmaktadır. Bu nedenle bu moleküllerin immobilizasyonu için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Plazma yöntemi ile polistrene plakaların yüzeyine karboksilik asit, hidroksil ve amin grupları gibi fonksiyonel grupların bağlanması ile proteinlerin ve peptidlerin kovalent immobilizasyonu sağlanabilmektedir (Jeon ve ark. 2010).

Bu tezle anlatılan çalışmalarda, radyo frekans plazma yöntemi ve çeşitli kimyasal modifikasyonlar kullanılarak, protein yapılar mikroparka kuyularına bağlanmış ve ELISA yöntemi ile kullanılabilirlikleri denenmiştir.

Yapılan denemelerde adım adım sistem iyileştirilmiştir. Her aşamada öncelikle kuyulara yapılan modifikasyonların etkin bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği test edilmiş sonrasında tayin için kullanılabilir bir sistem olan sandiviç ELISA aşamasına geçilmiştir. Her çalışmada, daha etkin yüzey kaplamalarını sağlamak için farklı konsantrasyonlarda kaplama malzemeleri ve çapraz bağlayıcılar denenmiştir. Amaç en etkin sistemi oluşturabilmektir. İyileştirmeler sonucunda verimli sonuçlar elde edilmiştir. Yöntem-2 de plazma yöntemi ile modifiye edilmiş kuyulara antikor kaplanarak çalışma yürütülmüştür. Bu sistemin çalıştığı fakat yüzeydeki antikorların yıkamalar sonrasında uzaklaşabildiği görüldükten sonra antikorları sistemde tutmak için iyileştirmeler yapılmıştır. Bu amaçla FcRn reseptörü ile çalışılmıştır. Yöntem-3'de FcRn reseptörü kuyulara bağlanmış ve yıkamalar yapıldıktan sonra bu reseptörlerin sistemde kalıp kalmadığına bakılmıştır. FcRn reseptörlerinin kuyulara kaplanabildiği ve yıkamalardan sonra da yüzeyde kaldığı görüldükten sonra sandiviç sistemine geçilmiştir. Yöntem-4'de FcRn reseptörü kullanılarak antikorlar yüzeye bağlanmış ve kullanılabilirliği ELISA sistemiyle denenmiştir.

Ardından Yöntem-5 ile de antikorları yıkamalardan sonra sistemde tutmak ve streptavidinin yapısı kullanılarak bağlanma yüzdesini arttırarak sistem iyileştirilmiştir. Yöntem-4 ve Yöntem-5, Yöntem-3’de elde edilen sistemi daha da iyileştirmek için yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, modifiye edilen kuyuların ELISA sistemlerinde kullanılabilir olduğunun test edilmesinin yanında kuyuların birden fazla kez kullanılabildiği de gösterilmiştir.

ELISA işlemi sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerinin yanında tayin ve ölçüm limitlerinin de piyasadaki ürün için elde edilen değere yakın çıkması, elde edilen modifiye kuyuların klinikte ve araştırma çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.; Poher, J., *Cellular and Molecular Immunology*, W.B.Saunders Company 2nd Edi. Philadelphia, 1994.
- Akan, E., *Genel Mikrobiyoloji ve Immunoloji*, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yayınları, No: 16, Adana, 1992.
- Akkılıç, N., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., *High performance liquid chromatography study of water soluble complexes and covalent conjugates of Polyacrylic acid with bovine serum albumin*. Journal of Applied Polymer Science.105: 3108-20, 2007.
- Altıkatoğlu, M., Başaran,Y., Arıöz,C., Kuzu,H., *Thermal Stabilization Of Horseradish Peroxidase By Covalent Conjugation With Dextran*, Journal Of Engineering And Natural Sciences 27: 216-225, 2009.
- Altınışik, M., *İmmunolojik Teknikler*, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 2004.
- Anonim, *ELISA*, 2011,<http://www.ekitapyayin.com/id/053/birincibolum.htm>
- Anonim, *Horseradish Peroxidase*, 2000,
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Rizi/project%201.htm>
- Aslam, M., Dent, A., *“Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”* Macmillan Reference LTD, 1998.
- Aslantaş, S., *Plasma Technology*, 2011,
<http://www.selcukaslantas.com/tekstilmuh/nanotekstil/50-nanosizesurface-makingup>
- Azevedo, A.M., Martins, V.C., Prazeres, D. M. F., Vojinovi , V., Cabral , J.M.S., Fonseca, L.P., *Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology* Biotechnology Annual Review,9: 199-247, 2003.

Bilgehan, H., *Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi*, 6. Baskı, Barış Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1993.

Bioword, *Coated Microplate*, 2012, http://www.bioworld.com/index.php?main_page=advanced_search_result&search_in_description=7&keyword=coated+microplate&x=0&y=0

Bragg, P.D., Hou, C., “*Subunit composition, function and spatial arrangement in the Ca²⁺, and Mg²⁺, activated adenosine triphosphatases of Escherichia coli and Salmonella typhimurium*”.Arch. Biochem. Biophys. 167, 311-321, 1975.

Carraway, K.L., Koshland, D.E., Jr. *Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents*, Biochim. Biophys. Acta. 26;160(2):272-4, 1968.

Carraway, K.L., Triplett, R.B., *Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups*, Biochim. Biophys. Acta. 31;200(3):564-6, 1970.

Çırak, M., *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Elisa) Systems*, T Klin J Med Sci , 19:242-248, 1999.

Dilgimen A.S, Mustafaeva Z, Demchenko M, Kaneko T, Osada Y, Mustafaev M. *Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly(N-isopropylacrylamide) and their immunogenicity*. Biomaterials 22(17): 2383-92, 2001.

Fricks ,A. T., Oestreicher, E. G Filho ,L. C., Feihrmannb,A. C., Cordeiroc, Y., Darivad, C., Antunesa, O.A.C., *Effects of compressed fluids on the activity and structure of horseradish peroxidase*, J. of Supercritical Fluids , 50 : 162–168, 2009.

Gülmezoğlu, E., Ergüven, S., *İmmünoloji*, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. şti. Ankara,1994.

Hermanson, G.T., *Antibody Modification and Conjugation, Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, Academic Pres, 20 :783–806, 2008.

- Hermanson, G.T., *Enzyme Modification and Conjugation, Bioconjugate Techniques (Second Edition)*, Academic Pres, 26 :961–968, 2008.
- Hermanson, G.T., *Part II-Bioconjugate Reagents*, Bioconjugate Techniques, Academic Pres, 3-4: 187-286, 1996.
- Hermanson, G.T., *Preface*, Bioconjugate Techniques, Academic Pres, xxi–xxiii, 1996.
- Jeon, B.J., Kim, M.H., Pyun, J.C., *Parylene-A coated microplate for covalent immobilization of proteins and peptides*, *Journal of Immunological Methods*, 353:44-48,2010.
- Ji, T.H., *The aplication of chemical cross-linking for studies of cell membrane and the identification of surface reporters*, *Biochim. Biophys. Acta* 559,39, 1979.
- Kılıçturgay, K., *İmmünolojiye Giriş*, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri, 3. Baskı, Bursa,1994.
- Kızılbey, K., Mansuroğlu, B., Derman, S., Budama, B.Y., Mustafaev, A.Z., *Conjugation of BSA Protein and VP/AA Copolymers*. *IJNES* 3(2):36-40, 2009.
- Kiehm, D., Ji, T.H., *Photochemical cross-linking of cell membranes*, *J. Biom.Chem*, 252, 8524-8531, 1977.
- Liu, F.T., Zinnecker, M., Hamaoka, T., Katz, D.H., *New procedures for preparationand isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-amino acids andimmunochemical characterization of such conjugates*, *Biochemistry*, 20;18(4):690–693, 1979.
- Lomant, A.J., Fairbanks, G., *Chemical probes of extended biological structures:Synthesis and properties of the cleavable cross-linking reagent[35S]dithiobis(succinimidylpropionate)*. *J. Mol. Biol.*, 104, 243-261, 1976.

- Mustafaev, M.I., Sarac, A.S. *The Polymeric Materials Encyclopedia: Synthesis, Properties and Application*. s. 5771-77, CRC Press., 1996.
- Nigel, C. Veitch, N.C., *Molecules of interest Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*, *Phytochemistry* 65:249–259, 2009.
- North, S. H., Lock, E.H., Cooper, C.J., Franek, J.B. , Taitt, C.R., Walton, S.G., *Plasma-Based Surface Modification of Polystyrene Microtiter Plates for Covalent Immobilization of Biomolecules*, *Applied Materials and Interfaces*, 10:2884-2891, 2010 .
- Okay,G., *HIV/AIDS Hastalarında Elisa Yöntemi İle Cryptosporidium Türlerinin Sıklığının Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 2006.
- Önder, R.S., Çelebi, M., Altıkatoğlu, M., Kuzu, H., *The Effect Of Horseradish Peroxidase (Hrp)-Dextran Conjugate On Naphtol Blue Black*, *Journal Of Engineering And Natural Sciences*, 27: 18-25, 2009.
- Rafikov, R.Z., Sakhibov, A.D., Akhmedzhanov, R.I, Aliev, U., *Pharmacokinetics of copolymers of n-vinylpyrrolidone with acrylic acid*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 20(3): 157-9, 1986.
- Say,R., *Photosensitive Aminoacid-monomer Linkage and Bioconjugation Application In Life Sciences and Biotechnology*, PCT/IB2009/055707,2009.
- Staros, J.V., *N-Hydroxysulfosuccinimide active esters: Bis(Nhydroxysulfosuccinimide esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membraneimpermeant, protein cross-linkers*, *Biochemistry* 21,3950-3955, 1982.
- Thermo, Pierce Coated Microplates for ELISA,2012, <http://www.piercenet.com/>
- Tümer, A., Ünal,S., *HIV/AIDS Epidemiyolojisi ve Korunma*, *Sted* ,12:488, 2001.

- Wilbur, D.S., *Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling*, Bioconjugate Chem. 3, 433-470, 1992.
- Williams, A., Ibrahim, I.A., *A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)*, J. Am. Chem. Soc. 103,7090-7095, 1981.
- Yavuz, H., *Plazma polimerizasyon yöntemiyle polimerik malzemelere yanmazlık özelliğinin kazandırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 2007.
- Yeğen, O., *Temel İmmünoloji ve İmmün Eksikli Hastalıkları*. Palme Tıp Kitabevi, Ankara, 1990.