



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**PATOJEN *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
NÖRAMİNİDAZ ENZİMİ MONOKLONAL ANTİKOR
VE TANI KİTİ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI**

Yasin KIZILYER

BURDUR, 2022

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**PATOJEN *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*
NÖRAMİNİDAZ ENZİMİ MONOKLONAL ANTİKOR
VE TANI KİTİ GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI**

Yasin KIZILYER

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

BURDUR, 2022

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Patojen *Clostridium Perfringens* Nöraminidaz Enzimi Monoklonal Antikor ve Tanı Kiti Geliştirme Çalışmaları**” başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

24 / 01 / 2022

(İmza)

Yasin KIZILYER

TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışmasının gerçekleştiği laboratuvarı kuran ve Prof. Dr. Özlem ÖZMEN hocamızla birlikte projenin fikir sahipliğini yapan, ilgili teknik ve teknolojileri öğreten, bilgisi ve tecrübesi ile akademik gelişimime büyük katkılar sağlamış, 2019 yılında emekli olan ilk tez danışmanım Prof. Dr. Aynur BAŞALP'e teşekkür ederim.

İlk tez danışmanı hocamın emekliliği ile gelen geçiş döneminde projeyi sahiplenerek yol gösterici ve problem çözücü olan, çalışmanın devamı ve gelişmesine katkı sağlayan ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Deniz İNNAL'a teşekkür ederim.

Bilgisi, ilgisi ve sabrı ile çalışmanın yönlendirilmesi, verilerin anlamlandırılması ve ürüne dönüştürülmesi konusunda büyük katkılar sağlayan üçüncü ve son tez danışmanı hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ'a teşekkür ederim.

0523-DR-18 No'lu proje ile tezimi fonlayan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, bütçesini arttıran Bölgesel Kalkınma Odaklı Misyon Farklılaşması ve İhtisaslaşması Programı, Proje Yürütme Kurulu'na ve bu program kapsamındaki 2017K121000-11 No'lu proje ile çalışma giderlerinin büyük kısmını karşılayan proje yürütücüsü Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tüm aşamalarındaki maddi, manevi ve akademik desteklerinden dolayı tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e ve Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Gece gündüz birlikte çalıştığımız ekibimiz Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN, Doç. Dr. Hidayet TUTUN ve Öğr. Gör. Ceren YAMAN'a teşekkür ederim. Bizlere ev sahipliği yapan, MAKÜ BİLTEKMER akademik ve idari kadrosuna teşekkür ederim.

Evliliğimizle kendisini doktora çalışmamın ortasında bulan sevgili eşim Merve KIZILYER ve çocuklarımız Mehmet Emin ve Sare'ye de yorgun biten günler ve uykusuz gecelerin tuzu, biberi ve ortağı oldukları için teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni destekleyen aileme, ülkeme ve ismini saymadığım hoca ve arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ocak, 2022

Yasin KIZILYER

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ÖZET	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Clostridium Perfringens</i>	3
2.1.1. <i>Clostridium Perfringens</i> Patolojisi	4
2.1.2. <i>Clostridium Perfringens</i> Tanısında Kullanılan Yaklaşımlar	7
2.1.3. <i>Clostridium Perfringens</i> ile Mücadele	9
2.2. Nöraminidazlar	10
2.2.1. <i>Clostridium Perfringens</i> Nöraminidaz Enzimi.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	15
3.1.2. Tamponlar.....	17
3.1.3. Besiyerleri.....	18
3.1.4. Hücreler	19
3.1.5. Deney Hayvanları	20
3.1.6. Antijenler	20
3.2. Aletler ve Cihazlar.....	20
3.3. Yöntem	22
3.3.1. Antijenin Hazırlanması ve İmmünizasyon	22
3.3.2. Farelerde Kuvvetli Yanıt Oluşturan İmmünizasyon Dozunun Belirlenmesi	23
3.3.3. Fare Plazmalarının İndirekt ELISA Testi ile Analizi	24
3.3.4. Besleyici (Feeder) Hücrelerin Hazırlanması	24
3.3.5. Füzyon İçin Miyelom Hücrelerinin Hazırlanması.....	25
3.3.6. İmmünize Olmuş Farelerin Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi.....	26
3.3.7. Hücre Sayımı	26
3.3.8. Füzyon	27
3.3.9. Füzyon Takibi.....	27
3.3.10. Çapraz (Kross) Reaksiyon Analizi ve Hibritlerin Geniş Ölçekte Üretimi	27
3.3.11. Hücrelerin Dondurulması	29
3.3.12. Hücrelerin Tek Düşürme İşlemi ile Klonlanması.....	30
3.3.13. Antikor Tiplendirme ve Alt Tiplendirme Çalışmaları.....	30
3.3.13.1. Isostrip Kiti Kullanımı ile Antikor Tiplendirme ve Alt Tiplendirme: ...	30
3.3.13.2. İndirekt ELISA Yöntemi ile Antikorların Tiplendirilmesi:	31
3.3.14. Antikorların saflaştırılması.....	31
3.3.15. Saflaştırılan Antikorların Miktar Tayini.....	34
3.3.15.1. UV Spektrofotometre Yöntemi ile Antikor Miktar Tayini	34
3.3.15.2. Bradford Yöntemi ile Antikor Miktar Tayini	35
3.3.16. Antikorların Biyotin ile İşaretlenmesi	36

3.3.17. Çift Antikor Sandviç ELISA Tekniği.....	36
3.3.18. Çift Yakalamalı Antikor Sandviç Yöntemi	37
3.3.19. Hücrelerden Proteinlerin Saflaştırılması	38
3.3.20. SDS-Page ile Proteinlerin Ayrıştırılması.....	38
3.3.21. Membran Transferi	39
3.3.22. Western Blot Yöntemi	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	41
4.1. Farelerde Kuvvetli Yanıt Oluşturan İmmünizasyon Dozunun Belirlenmesi	41
4.2. Füzyon Çalışmasına Alınacak Farelerin Seçimi	41
4.3. İmmünizasyonların Fare Vücut Ağırlığı Üzerine Etkisi	44
4.4. Füzyon ve Hibridoma Hücrelerinin Eldesi.....	45
4.5. Çapraz (Kross) Reaksiyon Analizi	47
4.6. Antikor Saflaştırma Çalışmaları	64
4.7. Saflaştırılan Antikorların Biyotin ile İşaretlenmesi.....	70
4.8. Sandviç ELISA Optimizasyonu Çalışmaları	71
4.9. Ticari <i>C. Perfringens</i> Nöraminidazlarının İndirekt ELISA İle Karakterizasyonu	76
4.10. Ticari <i>C. Perfringens</i> Nöraminidazları ve Antikorların Western Blot ile Karakterizasyonu	79
5. SONUÇ	92
KAYNAKLAR	96

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>C. perfringens</i> nöraminidazlarının şematik gösterimi.....	12
Şekil 3.1. Besleyici hücrelerin hücre kültürü ortamındaki görüntüsü.....	25
Şekil 3.2. FO miyelom hücrelerinin kültür ortamındaki görüntüsü	25
Şekil 3.3. Füzyon işlemi sonucunda elde edilen hücrelerin kültür ortamındaki görüntüsü	28
Şekil 3.4. Hitachi CP100NX ultrasantrifüj cihazı ve kontrol menüsü	32
Şekil 3.5. Manyetik karıştırıcı ve diyaliz düzeneği	32
Şekil 3.6. Proten G kromatografisi ve benzeri şekilde gerçekleştirilen IgM afinite kromatografisi öncesi hazırlık işlemleri	33
Şekil 3.7. Kullanılan protein G kolonu ve kısımları.....	34
Şekil 3.8. Düşük hacimler örneklerin UV dalga boylarında analizini yapabilen Thermo µDrop plate görüntüsü.	35
Şekil 3.9. Örnek Bradford analizi standart eğrisi.	35
Şekil 4.1. 20 µg nöraminidazın etkin immün yanıt uyarımı için yeterli olduğunu gösteren doz analizi çalışması sonucu.....	41
Şekil 4.2. II. immünizasyon sonrası BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı grafiği	42
Şekil 4.3. III. immünizasyon sonrası BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı grafiği.	42
Şekil 4.4. IV. immünizasyon sonrası BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı grafiği.	43
Şekil 4.5. Tekrar eden immünizasyonların BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı kuvveti üzerine etkisi	44
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan nöraminidazın BALB/c farelerinin vücut ağırlığı üzerindeki etkisi	45
Şekil 4.7. Prototip aday 1C7 ve bazı diğer örneklere ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	55
Şekil 4.8. Prototip aday 5A9, 1C6, 5E12 ve 3C5'e ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	55

Şekil 4.9. Prototip adayı 1A5, 1C3, 1C8 ve 1B4'e ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	56
Şekil 4.10. Prototip adayı 6D1, 3C2, 1D2 ve 1B9'a ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	56
Şekil 4.11. Prototip adayı 1F7, 1C10, 1D11 ve 1D12'ye ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	57
Şekil 4.12. Prototip adayı 1F9 ve 8F8'e ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	57
Şekil 4.13. Prototip adayı 1C6, 1C7 ve bazı diğer örneklere ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	58
Şekil 4.14. Prototip adayı 5E12, 1C8, 1C3, 5A9 ve 3C5'e ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	58
Şekil 4.15. Prototip adayı 1D2, 1B4, 1B9, 1C7, 1A5 ve 1D12'ye ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	59
Şekil 4.16. Prototip adayı 1D11, 6D1, 1F9, 3C2, 1C10 ve 8F8'e ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu	59
Şekil 4.17. Yalnızca BSA bloklaması ile çalışan 1A4, 1C9 ve 1B6'ya ait çapraz reaksiyon sonucu	60
Şekil 4.18. Yalnızca süt tozu bloklaması ile çalışan 2C8, 1G5, 1B1 ve 1G4'e ait çapraz reaksiyon sonucu	60
Şekil 4.19. 4F3 hibrit hücrelerine ait, BSA ve süz tozu bloklamaları ile gerçekleştirilmiş çapraz reaksiyon analizi sonuçları	62
Şekil 4.20. 4F3 hibrit hücrelerine ait, 6 farklı bloklama yöntemi kullanılarak elde edilmiş çapraz reaksiyon analizi sonuçları	63
Şekil 4.21. 4F3 hibrit hücrelerinin, 6 farklı bloklama yöntemi kullanılarak elde edilmiş, artan miktardaki BSA'ya özgü yanıtını gösterir ELISA analizi sonuçları.	64
Şekil 4.22. Roche IsoStrip kiti kullanılarak 4F3 hibrit hücrelerinin ürettiği antikor alt tipinin belirlenmesi	65
Şekil 4.23. Saflaştırılan IgM örneklerinin, saflaştırma öncesi üst sıvıları ve sonrasındaki ürünlerinin indirekt ELISA ile analizi sonuçlarının grafik görünümü.	67
Şekil 4.24. Farklı saflaştırma uygulamaları ve ürünlerin dilüsyona dair indirekt ELISA sonuçları.....	69

Şekil 4.25. 1C10-Kolon ürününün farklı sulandırılmalarının 1:5000 oranında Anti IgM sekonder antikoru kullanılarak gerçekleştirilen indirekt ELISA analizi sonuçları	70
Şekil 4.26. 1C10-Kolon ürününün farklı sulandırılmalarının 1:1000 oranında Anti IgM sekonder antikoru kullanılarak gerçekleştirilen indirekt ELISA analizi sonuçları.....	70
Şekil 4.27. Optimizasyonu denenen indirek sandviç, çift yakalamalı antikor sandviç yöntemlerine ve ideal prototipe ait basitleştirilmiş şematik gösterim	72
Şekil 4.28. IgG ve IgM tipindeki antikorların yapısı	74
Şekil 4.29. Sandviç ELISA’larda kullanılan antijen tipi deney sonucunu etkilemektedir..	77
Şekil 4.30. Antijenler arasında farklılık olup olmadığının anlaşılması amacı ile gerçekleştirilen indirekt ELISA testi birinci grafiği.....	78
Şekil 4.31. Antijenler arasında farklılık olup olmadığının anlaşılması amacı ile gerçekleştirilen indirekt ELISA testi ikinci grafiği	78
Şekil 4.32. Deneyler sırasında yaygın olarak kullanılan AP ile konjuge edilmiş sekonder antikorlara ait Western blot analizleri	81
Şekil 4.33. Sekonder antikor tarafından oluşturulan spesifik olmayan bant süt tozu bloklamasına bağlı olmayıp, nöraminidaza bağlıdır.....	82
Şekil 4.34. Ticari tavşan anti-nöraminidaz poliklonal antikoru ile gerçekleştirilen Western blot analizi sonucu	84
Şekil 4.35. Yüksek saflıktaki nöraminidaz antijeni immünizasyonu ile geliştirilen keçi poliklonal antikoru ile orta saflıktaki nöraminidaz antijenik immünizasyonu ile geliştirilen 1D10 HT antikorlarına ait Western blot analizi sonucu.....	85
Şekil 4.36. 1C7, 3C5 ve 5A9 NanI’ya özgü monoklonal antikorlardır.....	86
Şekil 4.37. 5A9 antikorunun kısmi saflaştırma ürünü ile 1C10 antikoru ileri saflaştırma ürünü ve hibrit üst sıvısının çalışmayan Western blot analizi sonucu.....	89

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. <i>C. perfringens</i> tarafından üretilen enzimler ve toksinler. Mehdizadeh vd.'den yeniden düzenlenmiştir (Mehdizadeh Gohari vd., 2021).	5
Tablo 2.2. <i>C. perfringens</i> suşlarının toksin üretim profillerine göre gruplandırılmaları ve bu grupların hastalıklarla olan ilişkisi	6
Tablo 2.3. <i>C. perfringens</i> nöraminidaz enzimine karşı geliştirilmiş olan ticari antikorlar. 14	
Tablo 3.1. Antijen dozaj denemesi grupları ve gruplardaki hayvan sayıları	24
Tablo 3.2. Çapraz reaksiyon analizlerinde kullanılan antijenler.....	29
Tablo 3.3. SDS-Page için hazırlanan kesikli jel içeriği	39
Tablo 3.4. Western blot analizi sırasında kullanılan birincil ve ikincil antikorlar.....	40
Tablo 4.1. Füzyon koşulları ve sonuçları.....	46
Tablo 4.2. Örneklerle ait, %0,5 BSA bloklaması ve yeni hazırlanmış antijenler kullanılarak gerçekleştirilen, 3. detaylı çapraz reaksiyon analizi sonuçları	48
Tablo 4.3. Tüm dönemlerde, %0,5 BSA bloklaması kullanarak gerçekleştirilen, çapraz reaksiyon analizlerinin toplu değerlendirilmesi	49
Tablo 4.4. Örneklerle ait, %0,5 süt tozu bloklaması ve yeni hazırlanmış antijenler kullanılarak gerçekleştirilen, 3. detaylı çapraz reaksiyon testi sonuçları	51
Tablo 4.5. Tüm dönemlerde, %0,5 süt tozu bloklaması kullanarak gerçekleştirilen, çapraz reaksiyon analizlerinin toplu değerlendirilmesi	52
Tablo 4.6. Hibrit hücrelerince üretilen antikorların BSA ve süt tozu bloklamaları ile gerçekleştirilen çapraz reaksiyon analizi çalışmalarının toplu değerlendirmesi, alt tipi ve dondurulmuş hücrelerin kalite durumu bilgisi.	54
Tablo 4.7. Bradford yöntemi ile elde edilen, kısmi saflaştırma ve protein G kromatografisi işlemlerine ait sonuçlar	65
Tablo 4.8. Saflaştırılan IgM örneklerinin, saflaştırma öncesi üst sıvıları ve sonrasındaki ürünlerinin indirekt ELISA ile analizi sonuçları	67
Tablo 4.9. Farklı örnek – koşul ve tarihlerde gerçekleştirilmiş olan 18 farklı sandviç ELISA optimizasyon deneyine ait toplu değerlendirmeler	73
Tablo 4.10. Çalışmalar sırasında kullanılan farklı ticari nöraminidaz antijenleri.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Amino asit
Ab	: Antikor
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ANOVA	: Varyans Analizi
AP	: Alkalın Fosfataz
APS	: Amonyum persülfat
BCIP	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat
BSA	: Bovin serum albumin
<i>C. perfringens</i>	: <i>Clostridium perfringens</i>
CBB	: Coomassie parlak mavisi
CH	: Ağır zincir sabit bölgesi
CHO	: Çin Hamster Ovaryum
CL	: Hafif zincir sabit bölgesi
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre kare
Da	: Dalton
dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EB	: Elüsyon tamponu
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FBE	: Fen Bilimleri Enstitüsü
FBS	: Fetal sıgır serumu
FCA	: Freund's complete adjuvant
FIA	: Freund's incomplete adjuvant
FO	: Fare miyelom hücre hattı, FO, ATCC CRL-1646
g	: Gram

H₂SO₄	: Sulfürik asit
HAT	: Hipoksantin aminopterim timidin
HCl	: Hidroklorik asit
HGPRT	: Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz
HGPRT	: Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz
HRP	: Yaban turpu peroksidazı
HT	: Hipoksantin timidin
IgA	: İmmün globulin A
IgG	: İmmün globulin G
IgM	: İmmün globulin M
K₂HPO₄	: Dipotasyum fosfat
kDa	: Kilo dalton
KH₂PO₄	: Monopotasyum fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
M	: Molar
mAb	: Monoklonal antikor
MAKÜ	: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
MAKÜ-TTL	: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Tanı Teknolojileri Laboratuvarı
mg	: Miligram
mg/ml	: Miligram / mililitre
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaH₂PO₄	: Sodyum fosfat
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NBT	: Paranitroblue Tetrazolium Klorür
ng	: nanogram
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
OD	: Optik dansite

OD₄₀₅	: 405 nanometredeki optik dansite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Phosphate buffered saline
PBST	: Phosphate buffered saline-Tween 20 tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen glikol
PEG-4000	: Polietilen glikol-4000
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu logaritmik değeri
PNPP	: P-nitrofenil fosfat
PVDF	: Polivinilidin diflorit
RPM	: Dakikadaki döngü sayısı; Revolutions per minute
SD	: Standart sapma
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-Page	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TBS	: Tris-buffered saline
TBST	: Tris-buffered salin - Tween 20 tamponu
TD	: Tek düşürülmüş, alt klonlaması yapılmış
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetrametil etilen diamin
TK	: Timidin kinaz
V	: Volt
v/v	: Hacim / hacim oranı
w/v	: Ağırlık / hacim oranı
ZnCl₂	: Çinko klorür
€	: Euro
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram / mililitre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

ÖZET

Doktora Tezi

Patojen *Clostridium Perfringens* Nöraminidaz Enzimi Monoklonal Antikor ve Tanı Kiti Geliştirme Çalışmaları

Yasin KIZILYER

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

Ocak, 2022

Clostridium perfringens insan ve hayvanların enterik sisteminin doğal bir parçası olan, belirli koşullar altında hızla çoğalan ve çok sayıda toksin üreten önemli bir patojendir. Ortaya çıkacak olan patojenitenin tipi ve şiddeti, bakteri tarafından üretilen toksinlerle yakından ilişkilidir. Patolojilerinin hızlı seyretmesi, ciddi ekonomik kayıplara yol açması ve ölümle sonuçlanabilmesi ise etmenin hızlı tanısını önemli kılmaktadır.

Nöraminidazlar, bütün *C. perfringens* suşları tarafından üretilen, hem bakteri metabolizmasında hem de virülansında işlev gören, patojeniteye elverişli koşullarda ise üretimi arttırılan bir toksin grubudur. Bu doktora tez çalışmasında, *C. perfringens* nöraminidazlarını tanıyabilecek monoklonal antikorların hibridoma tekniği kullanılarak geliştirilmeye çalışılması ve üretilebilecek antikorlar ile nöraminidaz aracılı *C. perfringens* tanısının incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, başarılı monoklonal antikor üretimi halinde, *C. perfringens* için ELISA tanı kiti prototiplerinin oluşturulması da hedeflenmiştir.

Çalışmalar sonucunda 26 hibrit hücresi elde edilmiş, bunlardan seçilen prototip adaylarının antikorları ise, geniş ölçekte üretilmiş, saflaştırılmış ve tiplendirilmiştir. Bu antikorların kullanıldığı, sandviç ELISA tekniğine dayanan sahada *C. perfringens* tanısı denemeleri ve *C. perfringens* tanı kiti prototiplerinde ise başarı elde edilememiştir. Western blot tekniği kullanılarak yapılan ek incelemeler üretilen 1C7, 3C5 ve 5A9 monoklonal antikorlarının NanI'ya özgün olduğunu, çalışmalar sırasında kullanılan ticari nöraminidaz ürününün safsızlıklar taşıdığını ve bu safsızlıklara karşı da antikor yanıtı geliştiğini göstermiştir. Ek olarak, çalışmalar sırasında tesadüfen sığır serum albüminine yüksek afinite gösteren, IgM tipindeki 4F3 monoklonal antikoru da elde edilmiştir. Sonuçlar, çok yönlü doğrulama yapmanın antikor geliştirme çalışmaları için önemini de ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium perfringens*, nöraminidaz, monoklonal antikor, hibridoma, ELISA, Western blot.

Hazırlanan bu Doktora tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0523-DR-18 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

**Monoclonal Antibody and Diagnostic Kit Development Studies for Pathogen
Clostridium Perfringens Neuraminidase Enzyme**

Yasin KIZILYER

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ

January, 2022

Clostridium perfringens is an important pathogen that is a natural part of the enteric system of humans and animals, which can divide rapidly and produces a large array of toxins under permissive conditions. The type and severity of its emerging pathogenicity are closely related to these toxins produced by the bacteria. The rapid progression of their pathologies, which may cause serious economic loss and mortality makes rapid diagnosis of *C. perfringens* crucial.

Neuraminidases are a group of toxins produced by all *C. perfringens* strains, involved in both bacterial metabolism and virulence, and whose production in pathogenic conditions increases. The aim of this doctoral thesis is to try to develop monoclonal antibodies, through hybridoma technique, that can recognize *C. perfringens* neuraminidases, and to examine the neuraminidase-mediated diagnosis of *C. perfringens* with these antibodies. In addition, in case of successful production of monoclonal antibodies, it is aimed to create ELISA diagnostic kit prototypes for *C. perfringens*.

As a result of this study, 26 hybrid cells were obtained, of which prototype candidates were selected, antibodies produced in large-scale, purified, and isotyped. However, attempts to diagnose *C. perfringens* from diseased-animal specimens using these antibodies, and production of a *C. perfringens* diagnostic kit prototype based on sandwich ELISA technique have not been successful. Further investigations using western blot showed that the 1C7, 3C5 and 5A9 monoclonal antibodies obtained were specific to NanI, the commercial neuraminidase product used during the studies contained impurities and antibody responses developed against these impurities. In addition, an IgM type monoclonal antibody, 4F3, with high affinity for bovine serum albumin was incidentally obtained. These results also demonstrate the importance of multi-faceted validations for antibody development studies.

Keywords: *Clostridium perfringens*, neuraminidase, monoclonal antibody, hybridoma, ELISA, Western blot.

The present Ph. D. Thesis was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Scientific Research Projects Unit, Under the Project number of 0523-DR-18.

1. GİRİŞ

Clostridium perfringens doğada yaygın olarak bulunan, bütün memeli ve kuş türlerinin bağırsak florasında yer alan, anaerobik, çubuksu ve spor oluşturan bir bakteridir. İnsan ve birçok hayvanın enterik sisteminin doğal üyesi olan *C. perfringens*, uygun koşullar altında hızla çoğalarak ve 21 kadar farklı toksin üreterek toksin-enfeksiyöz patolojilere yol açabilmektedir (Lucey ve Hutchins, 2004; Freedman vd., 2016). *C. perfringens* türü bakteriler, üretebildikleri toksinlere göre 7 farklı toksin tipi altında gruplandırılmaktadır (Rood vd., 2018). Gelişen hastalığın çeşidi ve şiddeti, üretilen bu toksinlerin tipi ve miktarına bağlıdır. Ortaya çıkan patolojiler, genel olarak hızlı seyretmekte, ani ölüme yol açabilmekte, klinik bulguları ise diğer hastalıklarla karıştırılabilmektedir (Lucey ve Hutchins, 2004; Freedman vd., 2016).

C. perfringens'in yol açtığı hastalıklardan yalnızca birisi olan nekrotizan enterokolitin, dünya çapında kanatlı ekonomisinde 6 milyar dolara yakın zarar oluşturduğu tahmin edilmektedir (Wade ve Keyburn, 2015; Daneshmand vd., 2021). İnsan sağlığını da etkileyen *C. perfringens*'in Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde görülen gıda zehirlenmelerinin en yaygın ikinci sebebi olduğu, yıllık 1 milyon kişiyi etkilediği ve 385 milyon dolarlık kayba yol açtığı bildirilmiştir (Hoffmann ve Ahn, 2021).

Günümüzde hem beşeri hem veteriner hekimlikte *C. perfringens*'in hızlı çoğalma kapasitesi ve ürettiği farklı toksin profilleri hastalık tanısının doğru teşhisini güçleştirmekte ve dolayısıyla hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmaktadır (Lebrun vd., 2010). *C. perfringens*'in tespiti amacı ile bakteriyel kültür (Gubash ve Ingham, 1997; Adcock ve Saint, 2001) ve üretilen toksinin tanımlanması ve tiplendirilmesi yaklaşımlarından yararlanılmaktadır (Kadra vd., 1999; Lebrun vd., 2010). Ancak, bu yaklaşımlardan bakteriyel kültürler uzun inkübasyon süresine ihtiyaç duymakta ve kültürlerin ayrıntılı mikroskopik, kimyasal ve analitik incelenmeleri gerekmektedir. Toksinlerin tanımlanması ve tiplendirilmesinde ise genel olarak nükleik asit temelli PCR ve hibridizasyon türevi teknikler ile immünolojik temelli ELISA ve benzeri tekniklerden yararlanılmaktadır. Ancak nükleik asit temelli teknikler, *C. perfringens*'in enterik sistemde her zaman bulunması nedeni ile yanlış pozitif, hızlı bölünmeler sırasında çoğunluğu kromozom dışı bölgelerden kodlanan toksin genlerinin kaybedilebilmesi nedeni ile de yanlış negatif sonuç riski taşımaktadır. Klasik immünolojik uygulamalar ise her bir toksin için immünolojik analizin ayrı ayrı tekrarlanmasını

gerektirdiğinden uygulanması hem güç hem de maliyetlidir (Lin vd., 2013; Law vd., 2015; Chen vd., 2020; Wang vd., 2021). Bu sebeplerden dolayı, hızlı ve doğru teşhise olanak sağlayacak yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

C. perfringens bakteri tipi ve toksinlerinin hızlı, doğru ve kapsamlı tespiti, insanlarda özellikle uygulanacak tedavinin belirlenmesi yönünden önemlidir. Hayvanlarda ise ekonomik gerekçeler öne çıkmakta, sürüde etkilenmesi muhtemel diğer hayvanların güvence altına alınabilmesine önem verilmektedir (Richeson vd., 2019; Abdolmohammadi Khiav ve Zahmatkesh, 2021). Bu sebeple hayvancılıkta aşılama gibi önleyici uygulamalar benimsenmiş, hastalığın var olması durumunda ise teşhisinin hızlı yapılabilmesi önemli bulunmuştur (Richeson vd., 2019).

Bakterinin tüm tipleri tarafından üretildiği bilinen protein veya toksinlerinin hedeflenmesi *C. perfringens*'in hızlı teşhisi için önem arz etmektedir. *C. perfringens*'in hızlı teşhisinin sağlanmasında bu bakterinin tüm tipleri tarafından üretilen toksinlerin hedeflenmesi önem arz etmektedir. Nöraminidazlar, bütün *C. perfringens* suşları tarafından üretilen iki ortak toksinden birisi olup, *C. perfringens*'in tespiti ve takibi için nöraminidazın hedeflenebileceği öngörülmektedir. Oligosakkaritlerden siyalik asitleri hidrolize eden nöraminidazlar, önemli bir bakteri virülans faktörü olmalarının yanı sıra, *C. perfringens*'in hücre içi ve hücre dışındaki normal metabolik aktiviteleri sırasında da kullanılmaktadırlar (Boraston vd., 2007). *C. perfringens* tespitinde, nükleik asit temelli tekniklerle oluşabilecek yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların azaltılması yönünden ELISA temelli uygulamalar avantaj sağlamaktadır. *C. perfringens* tespitinde nöraminidaza özgü ELISA uygulaması ise sadece toksisite anında kullanılabilecek klasik toksin ELISA uygulamasına nazaran, *C. perfringens*'in toksisite öncesinde, sırasında ve sonrasında da takip edilmesi imkânı yaratması yönünden avantajlıdır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı *C. perfringens* patojeninin özgün, hassas ve hızlı bir şekilde tanısının yapılmasında bu patojenin ürettiği nöraminidaz hedeflenmesinin incelenmesine olanak sağlayacak antikörlerin üretilmesidir. Bu amaçla, hibridoma tekniği kullanılarak monoklonal antikör (mAb) elde edilmesi çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen aday antikörler geniş ölçekte üretilmiş, saflaştırılmış, tiplendirilmiş ve karakterize edilmiştir. Son olarak, saha örneklerinden de yararlanılarak *C. perfringens* nöraminidazına özgün ELISA tanı kiti prototipi geliştirilmesi çalışmaları yürütülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridium Perfringens*

Clostridium türü bakteriler doğada her yerde bulunabilen, anaerob, çubuksu, spor oluşturan ve genellikle gram pozitif bakterilerdir. Habitatları arasında insan ve hayvanların boşaltım sistemleri, toprak, su, gıdalar ve atıklar bulunmaktadır. Bakteri aleminin firmikütler şubesi, Clostridia sınıfı, Clostridiaceae ailesi ve *Clostridium* cinsinde yer alan bu bakteriler serbest, kommensal, simbiyotik veya patojenik olarak yaşayabilen 177 türü bünyesinde barındırır (Nagano vd., 2012; Guo vd., 2020; Schoch vd., 2020). Tür üyelerine azot bağlayıcı olarak görev yapan *C. pasteurianum* (Winogradsky, 1895), atık endüstrisi ve biyoyakıt üretiminde yararlanılan *C. autoethanogenum* ve *C. tyrobutyricum* (Mitchell vd., 2009; Abubackar vd., 2015), patojenik ve toksik rollere sahip *C. difficile* ve *C. botulinum* örnek verilebilir (Num ve Useh, 2014; Figueiredo vd., 2020). Bunun yanı sıra, insan bağırsak mikrobiyomunun %10-40'ını oluşturan *Clostridium* türleri, probiyotik ve immün düzenleyici olarak birçok canlının bağırsak homeostasisinde de etkin rol almaktadır (Hold vd., 2002; Momose vd., 2009; Nagano vd., 2012; Guo vd., 2020).

C. perfringens, belirli koşullar altında, değişik bulgularla seyreden ve ölümle sonuçlanabilen patojeniteleri ile *Clostridium* cinsinin iyi bilinen diğer bir üyesidir (Parte, 2014). İlk olarak 1892 yılında Welch ve Nuttall tarafından, bir otopsi çalışması sonrasında tanımlanmış olan bu bakteri, sırası ile *Bacillus aerogenes capsulatus*, *Bacillus welchii* ve *Clostridium welchii* olarak da adlandırılmıştır (Welch ve Nuttall, 1892; Lucey ve Hutchins, 2004). Gram pozitif, spor ile çoğalabilen, film oluşturabilen, hidrojen sülfür ve hidrojen gazları üreten, nispeten aerotolerant, pilus taşıyan ve kayma hareketi gösteren *C. perfringens* (McClane vd., 2013; Cortés-Sánchez, 2018; Mehdizadeh Gohari vd., 2021), 7 dakikadan daha kısa bölünme süresi ile bilinen en hızlı çoğalan mikroorganizmalardandır (Labbe ve Huang, 1995; Maida vd., 2013; Corkrey vd., 2018). Enterik sistemin doğal bir üyesi olmasına karşın, *C. perfringens*'in kontamine gıdalarla yüksek miktarda vücuda alınımı veya uygun koşullarda hızlı çoğalması (Smith ve Schaffner, 2004; McClane vd., 2013) bakteriden 21 kadar toksinin salınımına ve konakçısı olduğu insan ve diğer omurgalılarda değişkenlik gösteren patojenik durumlara yol açmaktadır (Li vd., 2011, 2016; Mehdizadeh Gohari vd., 2021). Bu patojenik durumlara insanlarda ve hayvanlarda ölümle sonuçlanabilen nekrotizan enterokolit (Keyburn vd., 2010; McClane vd., 2013), gazlı kangren (McClane ve Rood, 2005; Uzal vd., 2015) ve ishal (Silva vd., 2015) örnek olarak verilebilir. ABD'de gıda

zehirlenme vakaların en yaygın ikinci bakteriyel sebebi *C. perfringens* olup, yılda yaklaşık 1 milyon kişiyi etkilediği ve 385 milyon kayba neden olduğu bildirilmiştir (Scharff, 2012; Hoffmann ve Ahn, 2021). Hayvan hastalıklarından yalnızca birisi olan kümes hayvanı nekrotizan enterokolitinin ise dünya genelindeki yıllık maliyetinin 6 milyar dolara ulaştığı tahmin edilmektedir (Wade ve Keyburn, 2015; Daneshmand vd., 2021).

2.1.1. *Clostridium Perfringens* Patolojisi

C. perfringens genel olarak bölgesel dokunun etkilendiği histopatolojik, yalnızca bağırsak sisteminin etkilendiği enterik veya bağırsakta üretilmiş olan toksinlerin bağırsakların yanı sıra dolaşıma da karışarak aralarında beyin, akciğer ve böbreklerin de yer aldığı çeşitli organları da etkileyebilmesi ile karakterize edilen enterotoksemik patojenitelere yol açar (Uzal vd., 2010). Bütün memeli ve kuş türlerinin yanı sıra balıkları da etkileyebilen bu bakterinin sebep olduğu hastalıklar, bakterinin ürettiği toksinler ile yakından ilgilidir (Li vd., 2016; Prescott, 2016; Abdelsalam, 2017). Tablo 2.1’de *C. perfringens* tarafından üretilen toksinler listelenmiştir. Bunlardan, *C. perfringens* alfa toksini (CPA) insan ve hayvanlarda gazlı kangrende, *C. perfringens* beta toksini (CPB) ve iota toksini (ITX) bağırsak epiteline zarar vererek bakterinin patojenitesinin artmasında (Fernandez-Miyakawa vd., 2007; Sayeed vd., 2008; Garcia vd., 2012; Redondo vd., 2017), epsilon toksini (ETX) koyun ve keçilerde enterotoksemide, *C. perfringens* enterotoksini (CPE) insanlarda gıda zehirlenmesi, ishal ve ani bebek ölümü sendromunda ve nekrotik enterit β benzeri toksin (NetB) kanatlı hayvanlarda nekrotik enteritte önemlidir (Keyburn vd., 2008; Zaragoza vd., 2019; Mehdizadeh Gohari vd., 2021). Bunların yanı sıra bakteri tutunma, büyüme ve kolonizasyonu destekleyici, mikroçevre ve immün sistem düzenleyici, virulans artırıcı roller üstlenen diğer birçok enzim ve toksini de üretmektedir (Uzal vd., 2014; Wang, 2020).

C. perfringens tarafından üretilen 21 kadar toksinden (Tablo 2.1) bakterinin farklı suşların belirli toksinleri üretebildiklerinin görülmesi, bu suşların üretebildikleri toksinlere göre gruplandırılmalarına olanak tanımıştır (Li vd., 2016). Buna göre bakteri *C. perfringens*, majör toksinler olarak da adlandırılan alfa, beta, epsilon ve iota, enterotoksin, ve nekrotik enterit β benzeri toksinlerini üretebilme kapasitesine göre 7 ana gruba (A-G) ayrılır (Tablo 2.2) (Zaragoza vd., 2019; Mehdizadeh Gohari vd., 2021). Buna göre, örneğin tüm *C. perfringens* toksin tip alt grupları CPA’yı üretirken, yalnızca toksin tip G NetB üreticisidir.

Tablo 2.1. *C. perfringens* tarafından üretilen enzimler ve toksinler.
Mehdizadeh vd.'den yeniden düzenlenmiştir (Mehdizadeh Gohari vd., 2021).

Toksin / Enzim	Biyolojik aktivite	Hücredeki Hedefi	Moleküler Boyutu (kDa)	Gen Lokasyonu
CPA	Fosfolipaz C ve sfinfomiyelinaz	Hücre zarı	42.5	Kromozomal
CPB	Por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	35	Plazmit
ETX	Por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	33	Plazmit
ITX	Aktine özgü ADP-riboziltransferaz	Hücre iskeleti	Iota-a: 47.5 Iota-b: 71.5	Plazmit
CPE	Por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	35	Kromozomal veya plazmit
NetB	Por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	33	Plazmit
NetF	Por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	31.7	Plazmit
NetE	Olası por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	32.9	Plazmit
NetG	Olası por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	31.7	Plazmit
BEC	Aktine özgü ADP-riboziltransferaz	Hücre iskeleti	BEC-a: 47 BEC-b: 83	Plazmit
TpeL	Ras-specific mono-glukoziltransferaz	Rho sinyal yolağı	~206	Plazmit
CPB2	Olası por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	28	Plazmit
PFO	Por oluşturuucu toksin; kolesterola bağımlı sitoliz	Hücre zarı	54	Kromozomal
Delta toksini	Por oluşturuucu toksin	Hücre zarı	32	Plazmit
NanI	Siyalidaz	Mukus/Yüzey glikolipidleri	77	Kromozomal
NanJ	Siyalidaz	Mukus/Yüzey glikolipidleri/glikoproteinleri	129	Kromozomal
NanH	Siyalidaz	Mukus-yüzey glikolipidleri/glikoproteinleri	43	Kromozomal
Kappa toksini	Kollajenaz	Yüzey glikolipidleri/glikoproteinleri	~ 80	Kromozomal
Mu toksini	Hyaluronidaz	Hyaluronic acid	182.6	Kromozomal
Lambda toksini	Proteaz	?	36	Plazmit
α-clostripain	Sistein proteaz	?	59.6	Kromozomal

CPA, *C. perfringens* alfa toksini. CPB, *C. perfringens* beta toksini. ETX, epsilon toksini. ITX, iota toksini. CPE, *C. perfringens* enterotoksini. NetB, nekrotik enterit β benzeri toksin. NetF, nekrotik enterit F benzeri toksin. NetE, nekrotik enterit E benzeri toksin. NetG, nekrotik enterit G benzeri toksin. *C. perfringens* binary toksini. TpeL, *C. perfringens* L sitotoksini. CPB2, *C. perfringens* beta2 toksini. PFO, perfringolizin O toksini. NanI, nöraminidaz I. NanJ, nöraminidaz J. NanH, nöraminidaz H.

C. perfringens'in majör toksinleri haricinde kalan diğer enzim ve toksinleri minör toksinler olarak adlandırılmakta, toksemi seyrinde etkili olmalarına karşın gruplandırmaya dâhil edilmemektedirler. Bu minör toksinlerden bazıları *C. perfringens* C ve A suşlarınca üretilen ve nekrotizan enteritte ve gıda zehirlenmelerinde de rol oynayan Beta-2 toksini (Gibert vd., 1997; Fisher vd., 2005), kollajenaz ve jelatinaz aktivitesi ile doku nekrozunu hızlandıran Kappa toksini (Matsushita vd., 1994), hücre zarında porlar oluşturarak hücre ölümüne yol açan Teta toksini (Flanagan vd., 2009), bir hemolizin olan Delta toksini, *C.*

perfringens enterotoksini, TpeL, Mu ve Lambda toksini ve sistein proteazları ile tüm *C. perfringens* toksin tipleri tarafından üretilen nöraminidaz tipindeki enzimlerdir (Popoff ve Bouvet, 2009; Mehdizadeh Gohari vd., 2021).

Tablo 2.2. *C. perfringens* suşlarının toksin üretim profillerine göre gruplandırılmaları ve bu grupların hastalıklarla olan ilişkisi. Mehdizadeh vd.’den yeniden düzenlenmiştir (Mehdizadeh Gohari vd., 2021).

Alt Tip		Üretilen Toksin						
	Hastalıklar ve Etkilenen Türler	CPA	CPB	ETX	ITX	CPE	NetB	Nöraminidaz (NanJ-NanI-NanH)
A	İnsan ve bazı hayvanlarda gazlı kangren; ruminant, at ve domuzlarda enterotoksemi ve GI rahatsızlıklarında olma olasılığı; köpek ve atlarda hemorajik gastroenterit	+	-	-	-	-	-	+ / + / +
B	Kuzu dizanterisi	+	+	+	-	-	-	+ / + / +
C	Bazı hayvan yeni doğanlarında hemorajik ve nekrotizan enterit; enterotoksemi, insanlarda nekrotizan enterit (pig-bel, Darmbrand)	+	+	-	-	±	-	± / ± / +
D	Koyun, keçi ve ineklerde enterotoksemi, keçilerde enterokolit	+	-	+	-	±	-	+ / + / +
E	İnek ve tavşanlarda, olasılıkla gastroenterit	+	-	-	+	±	-	+ / + / +
F	İnsan gıda zehirlenmelerinde, normal ve antibiyotik kullanımı ile ilişkili ishalde	+	-	-	-	+	-	± / ± / +
G	Kanatlı nekrotik enteritinde	+	-	-	-	-	+	+ / + / +

Tüm *C. perfringens* toksin tipleri hayvanlarda hastalıklara yol açarken yalnızca *C. perfringens* toksin tip A, tip C ve tip F’nin insanlarda patolojilere yol açtığı bilinmektedir. Gelişen hastalığın tipi, şiddeti, histopatolojik, enterik veya sistemik olarak gelişimi ise *C. perfringens*’in bakteri toksin tipine, etmenin ve ürettiği toksinlerinin miktarına, üretilen major ve minör toksin profiline ve toksinlerin nerelere ulaşabildiğine göre değişkenlik gösterir. Örneğin, insan ve hayvanlarda yara enfeksiyonları klostridiyal miyonekroz olarak da bilinen gazlı kangren ile sonuçlanabilirken, bağırsakta *C. perfringens* miktarının artması ishale, ileri bağırsak enfeksiyonları ise toksinlerin kana karışmasına ve sistemik sonuçlar doğurmasına neden olabilir (Li vd., 2016; Kiu ve Hall, 2018; Zaragoza vd., 2019).

C. perfringens kaynaklı hastalıklar *C. perfringens* ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi, ani beslenme, yem tipi veya rejimi değişiklikleri ve buna bağlı olarak ortamın enterik *C. perfringens*’in çoğalmasına uygun hale gelmesi, yaralanmalar, antibiyotik kullanımı gibi sebeplerle ortaya çıkabilir (Zaragoza vd., 2019). *C. perfringens* kaynaklı

hastalıkların hızlı teşhis ve tedavisi ise, hastalığın tip ve ciddiyetine göre ölümcül olabilmesinden ötürü büyük önem arz etmektedir. Örneğin, *C. perfringens* toksin tip C'nin koyunlarda yol açtığı enterotoksemi hayvanın ani kaybı ile sonuçlanabilmektedir (Mehdizadeh Gohari vd., 2021). Kontamine gıda ve yemleme rejimi değişikliği nedeni ile tetiklenen hastalıklar ise genellikle çok sayıda hayvanı etkileme potansiyeli taşıdığı için risklidir. *C. perfringens*'in patolojilerinin hızlı ilerleyebilmesinin yanı sıra, hastalık profillerinin diğer bakteriyel etmenlerinki ile benzerlikler taşıması, bakterinin enterik sistemin doğal bir üyesi olması, hızlı çoğalabilmesi, karmaşık toksin profillerinin bulunması, ETX, ITX gibi major toksinleri ile TpeL, nöraminidazlar, kollajenazlar, hiyaluronidazlar gibi minör toksinlerinin diğer canlılarca da üretilmesi ve benzeri yapı ve fonksiyonların birçok toksin tarafından paylaşılması *C. perfringens*'in hastalık etmeni olarak tespitini zorlaştırmaktadır (Popoff, 2016). Ek olarak, hastalık anında ise bakterinin yanı sıra, bakteri tarafından halihazırda üretilmiş olan toksinlere karşı olan mücadele edilmesi gerekliliği *C. perfringens* patojenitelerinin diğer zorluklarındandır (Lebrun vd., 2010).

2.1.2. *Clostridium Perfringens* Tanısında Kullanılan Yaklaşımlar

C. perfringens kaynaklı hastalıkların hızlı teşhis ve tedavisi, hastalığın tip ve ciddiyetine göre ölümcül olabilmesi, hızlı ilerlemesi ve çok sayıda hayvanı etkileyerek büyük maddi kayıplara yol açabilmesi nedeni ile büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla kullanılan iki ana yaklaşım bakteriyel kültür (Gubash ve Ingham, 1997; Adcock ve Saint, 2001) ile üretilen toksinin tanımlanması ve tiplendirilmesi yaklaşımlarıdır (Kadra vd., 1999; Lebrun vd., 2010).

Patojenik durumlarda, *C. perfringens* tanısı bağırsak içeriği kullanılarak hazırlanan kültürde yüksek miktarda ilgili morfolojiye sahip gram pozitif basillerin varlığına dayanmaktadır. Sonraki aşamada, özel besiyeri ve belirteçler varlığında kantitatif anaerobik büyüme potansiyeli incelenir ve belirli sayıda *C. perfringens* varlığı aranır. Genel olarak yüksek doğruluğa sahip olan bu kültürler uzun inkübasyon, ek boyama prosedürleri, mikroskopik analiz ve yine alternatif metodlarla toksin tiplerinin tanımlanmasına ihtiyaç duymaları sebebi ile pratik değildir (Gubash ve Ingham, 1997; Adcock ve Saint, 2001). Ek olarak, *C. perfringens* bakteri kültürleri ve diğer bir çok mikrobiyal kültürler düşük hassasiyete sahiptir (Vernacchio vd., 2006; Nair vd., 2010; Chen vd., 2020).

Toksinlerin tanımlanması ve tiplendirilmesi çalışmalarında ise nükleik asitlere dayalı yöntemler, immünolojik yöntemler ve hücre kültürüne dayalı yöntemlerden yararlanılmaktadır. Kullanılan güncel nükleik asite dayalı yöntemler standart Polimeraz

Zincir Reaksiyonu (PCR), gerçek zamanlı PCR, mikro-dizileme ve ilmek aracılı izotermal çoğaltma (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)'ı içermektedir (Albini vd., 2008; Janvilisri vd., 2010; Chen vd., 2020; Sridapan vd., 2021). İmmünolojik yöntemlere ise klasik ELISA'nın yanı sıra, ters pasif lateks aglütinasyon (RPLA) testleri, jel difüzyonu testleri ve immüno PCR gibi modifiye teknikler örnek verilebilir (Berry vd., 1988; Das vd., 2019; Ishioka vd., 2020; Wang vd., 2021). Vero hücrelerinin kullanımına dayanan hücre kültürü yöntemleri ise bakteriyel kültürler gibi pratiklik sorunu yaşadıklarından az tercih edilmektedir (Berry vd., 1988; Haque vd., 2018; Chen vd., 2020).

İmmünolojik teknikler, spesifik hedefleri tanıyabilen antikorların kullanımına dayanmaktadır. Temel immünolojik tekniklerden olan ELISA ölçülebilir yanıtların elde edilebildiği, yaygın kullanıma sahip, güçlü ve hassas bir tekniktir. *C. perfringens* tanısına yönelik ELISA uygulamaları izolatlarda ve hayvana ait bağırsak içeriği, dışkı veya serum gibi biyolojik sıvılarda toksinlerin varlığının tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek doğruluk ve hassasiyetine karşın, her toksine karşı özel antikora ihtiyaç duyması ve doğru tiplendirme için birden fazla toksinin ayrı ayrı analiz edilmesi gerekliliği, ELISA tekniğinin *C. perfringens* tanısında kullanımını zorlaştırmaktadır (Lebrun vd., 2010). Ek olarak, bakteriyel toksinlerin bağırsak proteazlarınca hızlı şekilde yıkıma uğratılması, bağırsak içeriği ve dışkıda toksinlerin tespitini zorlaştırmaktadır (Popoff, 1998). Serum ile gerçekleştirilen analizler ise ancak toksinlerin enterik sistemden dolaşıma karışarak diğer organları etkilediği ve hızla ölüme sebebiyet verdiği enterotoksemik durumlar ile ölecek veya ölmüş hayvanlarda kullanılabilir olmasından dolayı sınırlı avantajlara sahiptir. Bu sebepler, toksinlerin doğrudan tanınmasına ihtiyaç duyan mevcut ELISA uygulamalarının ciddi dezavantajlarındandır (Lebrun vd., 2010).

Nükleik asite dayalı yöntemler, spesifik gen dizilerinin varlığının incelenmesine ve çoğaltılmasına olanak veren ve giderek yaygınlaşan güçlü tekniklerdir. Örneğin, bu tekniklerin temelinde yer alan PCR, tek bir nükleik asit kopyasından milyarlarca kopyanın elde edilmesine olanak tanır. Ancak bu teknikler doğası ve sahip oldukları yüksek hassasiyeti gereği ölü hücre DNA'sını, uyku halindeki hücre DNA'sını veya ilgili DNA dizisinin kodladığı proteininin sentez edilip edilmediğini ayırt edememektedir. Dolayısıyla, enterik sistemin doğal bir üyesi olan *C. perfringens*'ten ve benzeri diğer hücrelerden yanlış pozitif sonuçlar alınmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, hızlı hücre bölünmeleri sırasında toksin genlerini taşıyan plazmid veya transpozon gibi yapılar da kaybedilebilmekte, bu

ve birden fazla *C. perfringens* suşu veya toksini içermekte olup, genellikle ineklere yılda 2 doz (Lebrun vd., 2010), keçilere yılda 3-4 doz, koyunlar için ise yılda bir doz olarak uygulanmaktadırlar (Miyashiro vd., 2007; Abdolmohammadi Khiav ve Zahmatkesh, 2021; Noor Mohammadi vd., 2022). Sık uygulama ihtiyacının da getirdiği yüksek maliyete rağmen, aşılar özellikle orta ve büyük ölçekteki çiftliklerde salgınların önlenmesine veya kontrolüne olanak sağlayan en etkin mücadele yöntemidir. Aşılamamanın gerçekleştirilmediği veya yetersiz kaldığı durumda ise yaklaşım, antibiyotik uygulaması veya serum tedavisi yolu ile hastalığı gösteren ilk hayvan ile benzeri koşullara maruz kalmış, ancak hastalık belirtilerini henüz sergilemeyen diğer hayvanların korunmaya çalışılmasıdır (Lebrun vd., 2010). Bunlardan antibiyotik tedavisi yeni *C. perfringens* ve toksin oluşumunu engelleyebilmesine rağmen üretilmiş toksinlere karşı etkisizdir (Fleming, 1985; Popoff, 1998). Serum tedavisi ise dolaşımdaki toksinleri etkisiz hale getirmekte, ancak hücrelere bağlanmış toksinlere karşı etkisiz kalmaktadır. Bunun yanı sıra doğru toksine karşı uygun serum tedavisi için gereken toksin tiplendirmesinin karmaşıklığı ve zorluğu, tedavinin yüksek maliyeti ve immün yanıt riski bu yaklaşımın diğer dezavantajlarını oluşturmaktadır. Ek olarak *C. perfringens* ile ilgili hastalıklarda genellikle ölümün çok hızlı gerçekleşmesi, hem antibiyotiklerin hem de serum tedavisinin yavaş ve etkisiz kalmasına yol açmaktadır (Lebrun vd., 2010). Aşılamaya rağmen etkin bağışıklığın oluşmaması durumu ise (Miyashiro vd., 2007) önlem alınabilmesi için doğru teşhisi daha da önemli kılmakta, böylelikle de hem aşıları hem de aşısız hayvanlarda da hızlı ve doğru teşhise ve buna olanak tanıyacak yeni yaklaşımların geliştirilmesine gerek duyulmaktadır.

Hastalık durumunda *C. perfringens* teşhisinin yapılabilmesi amacıyla tüm *C. perfringens* tiplerince üretildiği bilinen protein veya toksinlerin hedeflenmesi hem etmenin varlığının hem de patojenik profilin aktifliğinin kontrolünü sağlamada avantaj kazandırabilir. Bu uygulama, insanda doğru tedavinin uygulanabilmesi açısından yetersiz kalacak iken, hayvancılıkta en ekonomik, uygulanabilir seçenek olabilir (Richeson vd., 2019; Abdolmohammadi Khiav ve Zahmatkesh, 2021). Tüm *C. perfringens* tipleri tarafından üretilen toksinler CPA ve nöraminidazlardır (Tablo 2.2).

2.2. Nöraminidazlar

C. perfringens tarafından salgılanan toksinlerden olan nöraminidazlar, diğer mikroorganizmalar, virüsler, mantarlar, omurgasız ve omurgalı canlılar tarafından da sentezlenmektedir (Schwerdtfeger vd., 2010; Gerwig, 2021). Siyalidazlar olarak da adlandırılan bu enzimler (E.C.3.2.1.18) polisakkarit, glikoprotein ve glikolipitlerin

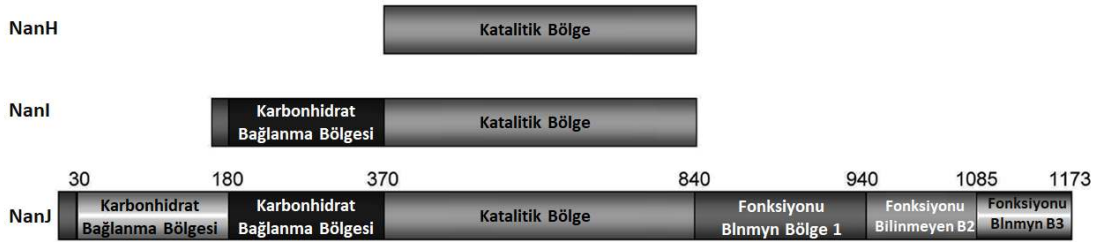
yapısındaki uç siyalik asitleri hidrolize eder. Siyalik asit taşıyan oligosakkaritlerin metabolizmasında kilit rol oynayan bu enzimler serbest siyalik oluşumunu katalizlerler (Vimr vd., 2004; Lewis ve Lewis, 2012). Siyalik asitler ise nöraminik asitlerin 9 karbonlu türevlerinden oluşan ve 50'den fazla üyeye sahip bir karbonhidrat monomer ailesidir (Traving ve Schauer, 1998; Severi vd., 2007; Yang vd., 2021). Glikanların doğal bir bileşeni olan siyalik asit, böylelikle mukopolisakkaritlerin, hücre zarı ve hücre yüzeyinin, bazı hücrel protein ve reseptörlerin ve hücrel salgıların yapısında bulunur. Hücreler arası sinyalleşme ve etkileşim, yük taşıyıcılığı ve antijenik yanıtın düzenlenmesinde rol alan siyalik asit aynı zamanda birer enerji, karbon, azot kaynağı olması ve diğer maddelere öncüller sağlaması nedeni ile metabolik işleve de sahiptir (Traving ve Schauer, 1998; Vimr vd., 2004; Schwerdtfeger vd., 2010).

Nöraminidaz enzimleri dizi benzerliklerine göre 4 farklı aileden oluşur. Gruplar arasında dizi benzerliği düşük olmasına karşın, proteinin fonksiyonel yapısı korunmuştur. Örneğin mikrobiyal nöraminidazlar %40'tan daha az genel dizi benzerliğine sahipken, yüksek oranda korunmuş bir katalitik domaine ve harici ortak dizi bölgelerine sahiptir (Roggentin vd., 1993; Feng vd., 2017). Her bir aileye ait üyelerin 3 boyutlu protein yapısının karşılaştırıldığı bir çalışma, proteinlerin 6 kanatlı β pervane katlanmasına sahip olduğunu göstermiştir (Buschiazzo ve Alzari, 2008). Mikrobiyal nöraminidazlara karşı geliştirilmiş antikörlerin viral ve memeli nöraminidazlarını da tanıyabildiğinin gösterilmesi, farklı canlılar arasında yapının korunduğunu işaret etmektedir (Feng vd., 2017).

2.2.1. *Clostridium Perfringens* Nöraminidaz Enzimi

C. perfringens, kromozomda farklı bölgelerde bulunan 3 ayrı nöraminidaza sahiptir. Bunlardan NanH 43 kDa boyutunda ve sitoplazmik olup, NanI ve NanJ ise sırası ile 77 kDa ve 129 kDa boyutlarında ve hücre dışına salgılanan nöraminidazlardır (Wang, 2020). Yapılan çalışmalar birçok *C. perfringens* suşunun 3 nöraminidaz tipini de üretebildiği belirtilmesine rağmen yalnızca tek tip, veya iki tip nöraminidaz üreten suşların da bulunduğu gösterilmiştir (Chiarezza vd., 2009; Li vd., 2011; Li ve McClane, 2014). Örneğin, yapılan dizileme çalışmalarıyla *C. perfringens*'in A tipine ait suşlardan ATCC 13124'ün her 3 nöraminidaz genine de sahip olduğu (Myers vd., 2006), ancak suş 13'ün NanI ve NanJ'ye (Li vd., 2016), SMS101'in ise yalnızca NanH'a sahip olduğu gösterilmiştir (Myers vd., 2006). Farklı *C. perfringens* suşlarına ait nöraminidaz dizilerinin karşılaştırılması ise NanH, NanI ve NanJ genlerinin sırası ile %93-100, %98-100 ve %96-100 oranında benzer olduklarını göstermiştir (Shimizu vd., 2002; Myers vd., 2006; Wang, 2020).

C. perfringens nöraminidazları kendi aralarında yapısal benzerlik ve farklılıklar taşımaktadır. Katalitik bölge amino asit dizisi, her 3 nöraminidaz arasında da korunmuştur (Şekil 2.1). Bunun yanı sıra, enzimlerin farklı substratlara bağlanma afinitesini arttıran karbonhidrat bağlanma bölgeleri NanH’de bulunmazken, NanI’da bir adet, NanJ’de ise iki farklı karbonhidrat bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Ek olarak, NanJ üç adet fonksiyonu bilinmeyen bölge taşır. Bunlardan ilki fonksiyonu bilinen diğer proteinlerle düşük dizi homolojisine sahip iken, ikinci bölge kohezin benzeri, üçüncü bölge ise fibronektin tip 3 benzeri dizi homolojisi taşımaktadır (Boraston vd., 2007; Wang, 2020).



Şekil 2.1. *C. perfringens* nöraminidazlarının şematik gösterimi. Boraston vd.’den yeniden düzenlenerek hazırlanmıştır (Boraston vd., 2007).

Bakteriyel kromozomda farklı bölgelerden kodlanan *C. perfringens* nöraminidazları birbirleri arasında işlevsel ve fonksiyonel farklılıklar da taşır. Örneğin, her üç nöraminidazı da üreten bakterilerde, ekstrasellüler nöraminidaz aktivitesinin %70’i NanI kaynaklıdır. Ek olarak, NanH ve NanJ daha yüksek ısı dirence sahiptir. Bunun yanı sıra, kimyasal ve metal iyonlarına karşı dirençleri ve yıkıma uğrattıkları bağ/substrat tipleri yönünden de farklılıklar taşırlar (Li ve McClane, 2014).

C. perfringens nöraminidazları, bakteri kolonizasyonunda, tutunmasında, toksinlerin bağlanma kapasitesini arttırarak bakteri patojenitesi ve serbest siyalik asitler oluşturarak bakteri metabolizmasında önemli roller oynamaktadır (Wang, 2020). Yapılan çalışmalar, salgılanan nöramidazlar olan NanI ve NanJ’nin bağırsak mukozası ve hücre yüzeylerinden siyalik asitlerin serbestleştirilmesini, böylece bakteriyel sağ kalımı ve çoğalmayı desteklediğini ortaya koymuştur. Serbestleştirilen siyalik asitler ise hem doğrudan karbon, azot, enerji ve aminoasit kaynağı olarak kullanılabilmekte, hem de siyalik asitin uzaklaştırıldığı makromolekülleri diğer hidrolaz ve proteazlara açık hale getirmektedir (Li ve McClane, 2014, 2018). NanI, NanJ ve NanH ile gerçekleştirilen tekli, çiftli ve üçlü mutant çalışmaları özellikle NanI’nın bakterinin tutunması, kolonizasyonu ve yüzeylerden siyalik

asitin ayrıştırılması için önemli olduğunu ortaya koymuştur (Navarro vd., 2018). Üçlü mutantlar ve NanH tekli mutantları ile yapılan çalışmalar ise, sitoplazmik olan NanH'nin aslen diğer hücre yüzeylerinden siyalik asitlerin serbestleştirilmesinde etkisiz olmasına karşın adezyonu etkilediğini göstermiştir (Li vd., 2011; Li ve McClane, 2014; Navarro vd., 2018; Wang, 2020). NanI aynı zamanda CPA aktivitesini doğrudan, CFB, ETX, NetF ve CPE'nin sitotoksitesini ise bu toksinlerin hücre yüzeylerine tutunmasını artırarak dolaylı yoldan kuvvetlendirmektedir (Li vd., 2011; Theoret vd., 2018; Mehdizadeh Gohari vd., 2021). Bakteri, aynı zamanda logaritmik çoğalma veya bağırsak enfeksiyonu dönemlerinde ishale bağlı olarak azalan besin ortamlarında rekabet gücünü arttırmak için özellikle NanI üretimini de arttırmaktadır (Wang, 2020).

Özetle, tüm *C. perfringens* suşları en az bir olmak üzere çoğunluğu her üç nöraminidaza da sahiptir. Nöraminidazlar, hem metabolik hem de virülans aktiviteler için etkin olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, nöraminidazlar fonksiyonel olduğu enterik sistemde, salgılanan diğer toksinlere nazaran daha düşük proteaz baskısına maruz kalma potansiyeli taşımaktadır. Tüm bu sebepler, nöraminidazı *C. perfringens* tespiti ve takibi için potansiyel bir hedef haline getirmektedir. *C. perfringens* nöraminidaz proteinine karşı geliştirilecek ELISA uygulamaları doğrudan bakteriyel toksinlerin hedeflendiği uygulamalara nazaran bazı avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlardan bazıları:

- ELISA uygulamaları, nükleik asit temelli uygulamalara kıyasla düşük hassasiyete sahip olsa da nükleik asit temelli tekniklerin *C. perfringens* özelinde taşıdığı hatalı pozitif veya negatif sonuç riskini taşımaması yönünden avantajlıdır.
- Nöraminidaz enzimleri sadece toksisite anında değil, bakterinin normal siyalik asit metabolizması için de üretilen bir enzim olmasından ötürü, bakteri popülasyonunun normal koşullarda da takibine olanak verebilir. Böylelikle yem tipi veya miktarı değişimlerinde ek bir kontrol aracı olma özelliği taşıyabilir.
- Toksinlere yönelik ELISA uygulamaları patojenik koşulların oluşmasına ihtiyaç duyarken nöraminidaza yönelik uygulamalar toksisite öncesinde, anında ve sonrasında da kullanılabilir.
- Bağırsak proteazlarınca hızlı yıkım baskısı altında bulunan toksinler yerine düzenli olarak salgılanan veya salgılanmayarak hücre içerisinde stabil olarak tutulan nöraminidazların hedeflenmesi, *C. perfringens*'i takip kapasitesini arttırabilir.

- Geliştirilecek iyi hassasiyetteki bir *C. perfringens* nöraminidaz ELISA kiti, tüm toksin tiplerini tanıma kapasitesi taşıyacak, *C. perfringens*'ten etkilenen tüm canlılarda tanı için kullanılabilecektir.

Başarılı bir ELISA uygulaması için en önemli bileşen, istenilen hedefi hassas ve başarılı bir şekilde tespit edebilecek, standardizasyona olanak verebilecek, yüksek afiniteli antikorların geliştirilmesidir. Bu amaçla geliştirilecek bir *C. perfringens* nöraminidaz antikoru yalnızca istenilen tip veya tiplerdeki *C. perfringens* nöraminidazını tanımalı ve insan ve diğer hayvanlar da dahil konakçısı olabileceği canlıya ait nöraminidaz ve proteinleri ise tanınamalıdır. Piyasada bulunan *C. perfringens* nöraminidaz antikorları Tablo 2.3'te verilmiştir. Var olan bu antikorların kapsamlı reaktivlik testlerine dair veri bulunamamış, kullanıldıkları herhangi bir yayın ise tespit edilememiştir.

Tablo 2.3. *C. perfringens* nöraminidaz enzimine karşı geliştirilmiş olan ticari antikorlar.

Katalog No	Üretici Firma, Menşei	Antikor Tipi	Antijen	Bilinen Reaktivlik	Referans
11680-RP01	Sino Biological, Çin	Tavşan, poliklonal, IgG	<i>C. perfringens</i> rekombinant nöraminidazı, (P10481.1 protein dizisi) (Cys2-Gln382)	-	-
11680-RP02		Tavşan, poliklonal, IgG		-	-
11680-R112		Tavşan, monoklonal, IgG		-	-
11680-MM04		Fare, monoklonal, IgG1		<i>E. coli</i> 'ye karşı yok	-
PA1-85712	Invitrogen, ABD	Tavşan, poliklonal, IgG	<i>C. perfringens</i> nöraminidazları	-	? (Li vd., 2011)

Bu doktora tez çalışmasında *C. perfringens* patojeninin özgün, hassas ve hızlı tanısında nöraminidaz proteininin hedeflenmesinin incelenmesine olanak tanıyacak antikorların üretimi ve denenmesi amaçlanmıştır. İstenilen kalite ve miktarda antikor elde edilebilmesi için monoklonal antikor (mAb) geliştirilmesi hedeflenmiş, bu amaçla da hibridoma tekniği kullanılmıştır. Elde edilen antikorlar geniş ölçekte üretilmiş, saflaştırılmış ve tiplendirilerek karakterize edilmiştir. Ardından, saha örneklerinden de yararlanılarak *C. perfringens* spesifik nöraminidazına özgün ELISA tanı kiti prototipi geliştirilmesi çalışmaları yürütülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

- K_2HPO_4 (Merck, 105101)
- KH_2PO_4 (Sigma, 04243)
- NaCl (Sigma, 31434)
- Tween-20 (Sigma, P1379)
- Na_2HPO_4 (Carloerba, CE.480141)
- Sitrik asit (Merck, 1.00244.1000)
- $MgCl_2$ (Sigma, M8266)
- $ZnCl_2$ (Merck, 1088151000)
- Glisin (Sigma, G8898)
- KOH (Sigma, 484016)
- 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB; Sigma, 860336)
- DMSO, kimyasalların hazırlanmasında (Tekkim, 914.036.2501)
- Hidrojen peroksit (Tekkim, TK.060171)
- Sülfürik asit (Sigma, 258105)
- Streptavidin-HRP (Jackson Immuno Research, 016-030-084)
- Gliserol (BioShop, GLY001.500)
- $NaHCO_3$ (Sigma, S5761)
- HCl (Tekkim, TK.090231.01001)
- NaN_3 (Sigma, S2002)
- NaOH (Merck, 1.06498.1000)
- PEG (PEG-4000; Merck, 8074901000)
- DMEM sıvı besiyeri (Sigma, D6171)
- L-Glutamin (Gibco, 25030-024)
- HAT (Gibco, 21060-17)
- HT (Gibco, 41065-012)
- Fetal bovin serum (FBS; Sigma, F7524)
- DMSO (Hücre dondurma sıvılarında; Sigma, D5879)
- DMEM toz besiyeri (Sigma, D5648)

- Hepes (Sigma, H3375)
- Sodyum piruvat (%1; Gibco, 11360-070)
- Gentamisin (Gibco, 15750045)
- Tripan mavisi (Sigma, T8154)
- Freund's Complete Adjuvant (FCA; Sigma F5881)
- Freund's Incomplete Adjuvantı (FIA; Sigma F5506)
- p-nitrofenil fosfat (PNPP, Sigma, N3254)
- Süt tozu (Pınar, 8690565003404)
- Bovine serum albümin (BSA; Sigma, A2153)
- Antikor alt tiplendirme strip kiti (Roche IsoStrip; 11493027001)
- Amonyum sülfat (Sigma, A4418)
- Protein G afinite kolonu (GE Healthcare, GE17-0404-01)
- IgM spin kolonu kiti (LigaTrap, LT-145KIT)
- Bradford solüsyonu (Biorad, #500-0205)
- BSA protein standartları (Biorad, #500-0207)
- Tek kullanımlık polistiren küvetler (LP Italiana, LP111117)
- Biotin (Biotin-N-succinimidyl ester, long-armed biotin; Sigma H1759)
- IgM afinite kolonları (LigaTrap, LT-145)
- Protein marker, 30-270 kDA (GeneDirex, PM00-0500)
- RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu (Thermo Scientific, 89900S)
- Halt proteaz inhibitor kokteyli (Thermo Scientific, 87786)
- Tris, Trizma base (Sigma, T6066)
- Amonyum persülfat (APS; Sigma 09913)
- %30 akrilamid/bis solüsyonu (Biorad, 1610158)
- Tetrametil etilen diamin (TEMED; Sigma, T7024)
- İzobütanol (Tekkim, TK.201801)
- Metanol (Tekkim, 947.046.2500)
- Coomassie parlak mavisi (CBB; Sigma, 27815-25g-F)
- Bromfenol mavisi (Sigma, B0126)
- Ponceau S (Sigma, P3504)
- 2-Mercaptoethanol (Sigma, M6250)
- PVDF membran, 0,45 µm por büyüklüğünde (Biorad, 1620264)

- Jel yükleme pipeti (Biorad, 2239917)
- Hammarsten Casein (Sigma, E0789)
- Fare anti nöraminidaz monoklonal antikoru (Sino Biological, 11680-MM04)
- Tavşan anti nöraminidaz poliklonal antikoru (Invitrogen, PA1-85712)
- AP konjuge Keçi Anti-Fare Polivalen (Sigma, A0162)
- AP konjuge Keçi Anti-Fare IgM (Sigma, A9688)
- AP konjuge Keçi Anti-Fare IgG (Sigma, A3438)
- AP konjuge Rabbit Anti-Fare IgG (Abcam, ab6729)
- AP konjuge Rabbit Anti-Keçi IgG (Abcam, ab6742)
- AP konjuge Keçi Anti-Rabbit IgG (Abcam, ab6722)
- AP için Western substratı (BCIP/NBT; Sigma, B5655)
- Keçi Anti-Rabbit IgG-HRP Konjugatlı (Advansta, R-05072-500)
- ECL Select Substrat (Cytiva, RPN2235)
- BCIP/NBT Substratı (Sigmafast BCIP / NBT, Sigma, B5655)

3.1.2. Tamponlar

• PBS (Phosphate Buffered Saline): 10 mM K_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl içerecek ve pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlandı. İhtiyaca göre, doğrudan veya otoklavlanarak kullanıldı.

• PBST (PBS-Tween 20 Tamponu): PBS içerisine %0.05 Tween-20 eklendi manyetik balık yardımı ile karıştırılarak hazırlandı.

• PCB (Phosphate/Citrate Buffer - Fosfat Sitrat Tamponu): 51.4 mM Na_2HPO_4 , 24.3 mM sitrik asit içerecek ve pH'sı 5.0 olacak şekilde ayarlandı.

• Alkalen Fosfataz Substrat Tamponu: 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$ ve 0.1 M glisin içeren çözelti, derişik KOH yardımı ile pH'sı 10.4 olacak şekilde hazırlandı.

• Yaban Turpu Peroksidaz Substrat Karışımı: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) stok solüsyonu, DMSO içerisinde 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu stok solüsyonu PCB tamponu (pH 5.0) ile 1:10 oranında sulandırıldı. Kullanımdan hemen önce her 10 ml'lik karışıma 2 μ l, %30'luk hidrojen peroksit eklenerek kullanıldı.

• Yaban Turpu Peroksidaz Stop Solüsyonu: TMB-HRP reaksiyonunun durdurulması için kuyulara reaksiyon hacmine eşit miktarda 2 M'lık sülfürik asit eklendi.

• Streptavidin-HRP Stok Solüsyonu: Katı Streptavidin-HRP, son hacmi 0.5 mg streptavidin-HRP ve %50 gliserol içerecek şekilde dH₂O ile sulandırıldı ve -20 °C'de sıvı

olarak muhafaza edildi. Bu karışım, ELISA uygulamalarında PBS içerisinde 1 µg/ml streptavidin-HRP içerecek şekilde hazırlandı ve kullanıldı.

- Süksinimid Ester İşaretleme Tamponu: 0.1 M NaHCO₃, 0.1 M NaCl ve pH 8.4 olacak şekilde (derişik HCl kullanılarak), taze olarak hazırlandı. Oda sıcaklığında bir haftaya kadar muhafaza edildi.
- Biyotinleme Sonrası Diyaliz Tamponu: 0.1 M Tris-Cl, pH 7.4; 0.1% NaN₃ (w/v) ve 0.2 M NaCl kullanılarak ve son pH'ı NaOH ile 7.4'e ayarlanarak kullanıldı. Oda sıcaklığında 1 hafta kadar muhafaza edilebilir. Daha uzun süre kullanılmamalıdır.
- PEG çözeltisi: 2 ml PBS, 2 gr PEG4000 ile karıştırılarak otoklavlandı. Otoklavlanan çözelti kullanım anına kadar 37 °C'de muhafaza edildi.
- Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-Page) Yürütme Tamponu (10X): 250 mM Tris, 1.92 M glisin ve %1 SDS içerecek şekilde, pH ayarlaması yapılmaksızın hazırlandı. Elektrofrezde kullanmadan önce 1/10 oranında sulandırıldı.
- 4X Örnek Yükleme Tamponu, Laemmli: 0.125 M Tris, %8 SDS (w/v), %40 gliserol (v/v) içerecek, 355 mM beta-merkaptotenaol içerecek (kullanımdan önce eklenecek) ve pH'sı 6.8 olacak şekilde hazırlandı. Kullanımdan hemen önce 355 mM konsantrasyona denk gelecek (yaklaşık %5) miktardaki beta-merkaptotanol örnek yükleme tamponuna eklendi.
- TBS (Tris Buffered Saline): 200 mM Tris, 1.5 M NaCl içerecek ve pH'sı HCl yardımı ile 7.5 olacak şekilde 10X konsantrasyonda hazırlandı ve kullanılmadan önce 10 kat sulandırıldı.
- TBST (Tris Buffered Saline – Tween 20 Tamponu): TBS içerisine %0.1 Tween 20 eklendi ve manyetik balık ile karıştırılarak hazırlandı.
- Transfer Tamponu (Tris/Glisin; Towbin): 25mM Tris, 192 mM glycine, 20% metanol, 0.1% SDS içerecek ve pH'sı 8.3 olacak şekilde hazırlandı

3.1.3. Besiyerleri

- Fetal Bovine Serum (FBS): Çalışmalar sırasında kullanılan tüm FBS'ler ısı inaktivasyonu işlemine maruz bırakıldı. Bu amaçla, yavaş bir şekilde çözünmesi ve oda sıcaklığına gelmesi sağlanan donmuş FBS, 56 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında, oda sıcaklığına tekrar gelmesi sağlanan FBS'ler 50 ml'lik steril tüplere ayrıştırılarak -20 °C'de muhafaza edildi.
- DMEM Toz Besiyeri: 13.4 gr DMEM toz, 5.96 gr Hepes ve 2 gr NaHCO₃ toplam hacim 1 litre olacak şekilde dH₂O içerisinde hazırlandı. Hazırlanan karışım, steril hava akımı

altında 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de muhafaza edildi.

- DMEM (Hazır) Besiyeri: Steril olarak temin edilen sıvı DMEM doğrudan kullanılmıştır. Bu besiyeri kullanılarak hazırlanan FBS'li karışımlara 4 mM L-Glutamin eklenmiştir.
- Fetal Bovine Serum İçeren DMEM: %5, %7, %10, %15 veya %20 (v/v) FBS içeren DMEM karışımı, son hacimde 1 mM sodyum piruvat, 4 mM L-Glutamin, 50 µg/ml gentamisin içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de muhafaza edildi.
- HAT (Hipoksantin-Aminopterin-Timidin) İçeren DMEM Besiyeri: İstenilen miktarda FBS içeren DMEM besiyeri 1X HAT içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de muhafaza edildi.
- HT (Hipoksantin--Timidin) Besiyeri: İstenilen miktarda FBS içeren DMEM besiyeri 1X HT içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri +4 °C'de muhafaza edildi.
- Hücre Dondurma Çözeltisi: %80 FBS, %10 DMEM (toz veya hazır), %10 DMSO içeren çözelti hücre dondurma besiyeri olarak kullanıldı. Bu besiyeri, her hücre dondurma işlemi öncesinde taze olarak hazırlandı.

3.1.4. Hücreler

Hibridoma çalışmaları sırasında FO miyelom hücreleri (ATCC, CRL-1646) kullanıldı (Şekil 3.1). İmmünize edilmiş BALB/c farelerinden alınan dalak hücreleri süspansiyon haline getirildikten sonra, FO miyelom hücreleri ile füzyona uğratarak hibrit hücreleri üretildi ve kültüre edildi. Üretilen hibrit hücrelerinin *in vitro* uyumluluklarının artırılması amacı ile, her bir füzyon işleminden bir gün önce fare intraperitoneal sıvısı ve hücrelerini barındıran besleyici hücreler hazırlandı. Ek olarak, insan ovaryum kanser hücre hattı SKOV3 (ATCC, HTB-77), elde edilen antikörlerin insan nöraminidazlarında test edilmesinde western blot pozitif kontrolü olarak kullanıldı. Ovaryum dokusu ve SKOV3 hücre hattı dört insan nöraminidazının da (Neu1, Neu2, Neu3, Neu4) anlatımını gerçekleştiren birer doku ("Neuraminidase - The Human Protein Atlas", 2021) ve hücre hattıdır (Koseki vd., 2012; Satyavarapu vd., 2021). Bu amaçla SKOV3 hücreleri çoğaltıldı, protein izolasyonu gerçekleştirildi. Tüm hücreler, 37 °C'de, %5 CO₂ ve %90-93 bağıl nemde inkübe edildi ve aksi belirtilmediği sürece %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde tutuldu.

3.1.5. Deney Hayvanları

Çalışmalar, yaşları 8-12 hafta arasında değişen 24 adet BALB/c faresi ile yürütüldü. Yeterli sayıda aynı cinsiyetten hayvan edinilebilen durumlarda cinsiyet ayrımı yapılmadı. Çalışma için gerekli Etik Kurul İzni, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 353 No'lu karar ile alınmıştır.

3.1.6. Antijenler

Çalışmalar sırasında kullanılan antijenler aşağıda belirtildi:

- *C. perfringens* nöraminidazı, düşük saflık (Sigma N2876)
- *C. perfringens* nöraminidazı, orta saflık (Sigma N3001)
- *C. perfringens* nöraminidazı, yüksek saflık (Sigma N5631)

Ayrıca, çapraz reaksiyon analizleri sırasında aşağıdaki antijenlerden de yararlanıldı:

- Süt tozu (Pınar, 8690565003404)
- Bovine serum albümin (Sigma, A2153)
- Apo-transferrin, bovin (Sigma, T1428)
- γ -globulin, bovin (Sigma, SRE0011)
- Trombin, bovin (Sigma, T4648)
- Fibrinojen, bovin plazmasından (Sigma, F8630)
- Plazminojen, bovin plazmasından (Sigma, P9156)

3.2. Aletler ve Cihazlar

- Biyolojik güvenlik kabini class II (Thermo Safe 2020)
- CO₂ etüv (Thermo Forma Steri-Cycle i160, 51030303)
- Floresans özellikli invert mikroskop (Nikon Eclipse TS2)
- Masaüstü santrifüj (Hettich Rotina 380 R)
- Sıvı azot örnek saklama tankı (Thermo Barnsted BS-CK509X4 BioCane 47)
- Sıvı azot depolama tankı (Thermo Barnsted BS-CK509X4 & BS-AY509X3)
- +4 °C buzdolabı (Bosch KGN56VW30N)
- -20 °C dondurucu (Bosch GSN54AW30)
- -80 °C dondurucu (Daihan UF-D500)
- Besiyeri filtrasyon cihazı (Millipore Glass Vacuum Filtration Set)
- Masa üstü mini santrifüj (Hettich Mikro 200)

- ELISA okuyucu (Thermo Multiscan GO)
- μ Drop plate (Thermo, N12391)
- ELISA mikropılaka yıkayıcı (Thermo 5165040 MIB Wellwash)
- Analitik terazi (Shimadzu U 6200H)
- Hassas terazi (Shimadzu ATX224)
- pH metre (WTW 7110)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı set (Daihan MSH-20D)
- Vorteks (Daihan VM-10)
- Su banyosu (Daihan WB-22)
- Ultrasantrifüj (Hitachi CP100NX)
- Etüv kuru sterilizatör (Thermo Heratherm 51028139)
- Etüv (Daihan ThermoStable IG-105)
- Yatay çalkalayıcı (Thermo ELED-88880026)
- Şarjlı pipetör (Thermo Finnpiette Fp-5901)
- Ultrasonik homojenizatör (SONICS VCX 130)
- Kuru banyo (Wisd, WiseTherm HB-R48)
- Yatay elektroforez tankları ve güç kaynağı (Thermo OWL-B1)
- Dikey elektroforez aparatları ve güç kaynağı (Biorad Mini Protean Tetra Cell)
- Jel görüntüleme sistemi (UVP Biospectrum 515)
- Ultra saf su cihazı (Millipore Direct Q5 UV)
- Otoklav (Hirayama, HV-110L)
- Bulaşık makinesi (Profilo BM5320MA)
- Otomatik pipet seti (Brand Transferpette S)
- Çok kanallı pipet (Brand Transferpette)
- 0,2 μ m'lik besiyeri filtrasyon filtresi, steril (Millipore, GSWG047S6)
- 0,2 μ m'lik enjektör ucu filtre, steril (İsolab, 094.07.003)
- 0,45 μ m'lik enjektör ucu filtre, steril olmayan (Isolab, 094.01.003)
- 1,5 ml santrifüj tüpleri (Isolab, 078.05.002)
- 12 kuyulu hücre kültürü kabı (Thermo Biolite, 130184)
- 15 ml steril tüpler (Sarstedt)
- 175 cm² hücre kültürü kabı (SPL, 72175)
- 2 ml santrifüj tüpleri (İsolab, 078.03.023)

- 225 cm² hücre kültürü kabı (Thermo EasY, 159934)
- 24 kuyulu hücre kültürü kabı (Thermo Biolite, 930186)
- 25 cm² hücre kültürü kabı (SPL, 70025)
- 50 ml steril tüpler (Sarstedt)
- 500 cm² hücre kültürü kabı (Thermo, 132913)
- 6 kuyulu hücre kültürü kabı (Thermo Biolite, 130184)
- 75 cm² hücre kültürü kabı (SPL, 70075)
- 96 kuyulu hücre kültürü kabı (Thermo Biolite, 130184)
- Bistüri (Plusmed, BS 2982)
- Diyaliz membranı (Spectra/Por, 131417)
- Eldiven
- ELISA plakaları (Corning 3590 ve Thermo Maxisorp)
- Enjektör 1 ml, 2 ml, 5 ml (Beybi, Set Inject, Ayset)
- Hücre dondurma tüpü (Isolab, 091.21.102)
- Hücre kazıyıcı (NEST, 710011)
- Hücre sayım lamı (Thoma; Marienfeld, C964730)
- Makas (İsolab)
- Otoklavlanabilir cam şişeler (SH, İsolab)
- Pens (İsolab)
- Petri kabı 100 mm (Sarstedt, 82.1473)
- Petri kabı 60 mm (İsolab, S.081.02.061)
- Pipet ucu (Brand, İsolab)
- Protein A afinite kolonu (GE Healthcare, 17-0402-01)
- Protein G afinite kolonu (GE Healthcare, 17-0404-01)
- Serolojik pipet (Sarstedt, NEST)
- Süzgeç

3.3. Yöntem

3.3.1. Antijenin Hazırlanması ve İmmünizasyon

İstenilen miktarda nöraminidaz proteini içeren 50 µL PBS çözeltileri hazırlanarak, 50 µL Freund's adjuvantına, enjektör yardımı ile, damla damla eklendi ve faz ayrımı ortadan kalkana kadar, vorteks yardımı ile karıştırıldı. Elde edilen karışım, 26 gauge'lık, 1 ml'lik

enjektör yardımı ile, deney grubundaki farelere intraperitonel yolla enjekte edildi. Kontrol grubu farelerine ise 100 µL PBS, 26 gauge'lık, 1 ml'lik enjektör yardımı ile intraperitonel olarak uygulandı.

Nöraminidaza özgü antikor yanıtı oluşumunun takibi için farelerden kuyruk kanı elde edildi. Alınan kan, eşdeğer miktarda sodyum sitrat ile karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma kısmı ayrıştırıldı. Elde edilen plazma, ELISA tekniği ile analiz edilerek immünizasyon etkinliğinin incelenmesinde kullanıldı. Yüksek ELISA yanıtı elde edilene kadar, immünizasyonlar tekrar edildi. En az 3 immünizasyon sonrasında, ELISA analizinde en yüksek antikor yanıtı tespit edilen fareler füzyon için seçildi. Füzyon işleminden 3 gün önce, belirlenmiş optimal antijen dozu, 100 µL PBS içerisinde hazırlanarak, intraperitonel olarak uygulanarak "hatırlatma immünizasyonu" gerçekleştirildi.

3.3.2. Farelerde Kuvvetli Yanıt Oluşturan İmmünizasyon Dozunun Belirlenmesi

Farelerde en güçlü antikor yanıtı uyandıran en düşük antijen miktarının belirlenmesi amacı ile dozaj analizi çalışması yapıldı. Dozaj analizi, immünizasyon çalışmalarında antijen maliyeti yönünden avantaj sağlanmasının yanı sıra, düşük miktarda antijen kullanımına rağmen yüksek afiniteye sahip antikorların üretim ve seçimini sağlaması yönünden önemlidir (Hanly vd., 1995). Bu amaçla, fareler 10 µg, 20 µg ve 35 µg nöraminidaz proteini içeren Freund's adjuvantı ile ~2-3 hafta aralıklarla immünize edildi. Farelerdeki antikor yanıtı gelişimi ELISA testi ile belirlendi. Antijen olarak, birinci immünizasyonda FCA eşliğinde yüksek saflıktaki antijen (Sigma, N5631), 2. ve 3. immünizasyonlarda ise FIA eşliğinde orta saflıktaki antijen (Sigma, N3001) kullanıldı. Güçlü antikor yanıtı sağlayan en düşük antijen miktarı çalışmanın sonraki aşamalarında da referans olarak uygulandı.

Çalışmalar yaşları 8 hafta 6 günlük ile 12 hafta arasında değişen 16 BALB/c faresi ile yürütüldü. Yeterli sayıda aynı cinsiyetten hayvan temin edilememesi sebebi ile 4'ü dişi, 16'sı erkek olmak üzere farklı cinsiyetten hayvanlar kullanıldı. Dişi hayvanlar, gebelik olasılığının önlenmesi amacı ile kendi içinde gruplandı ve antijen uygulaması yapılmayacak olan kontrol grubuna atandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Antijen dozaj denemesi grupları ve gruplardaki hayvan sayıları.

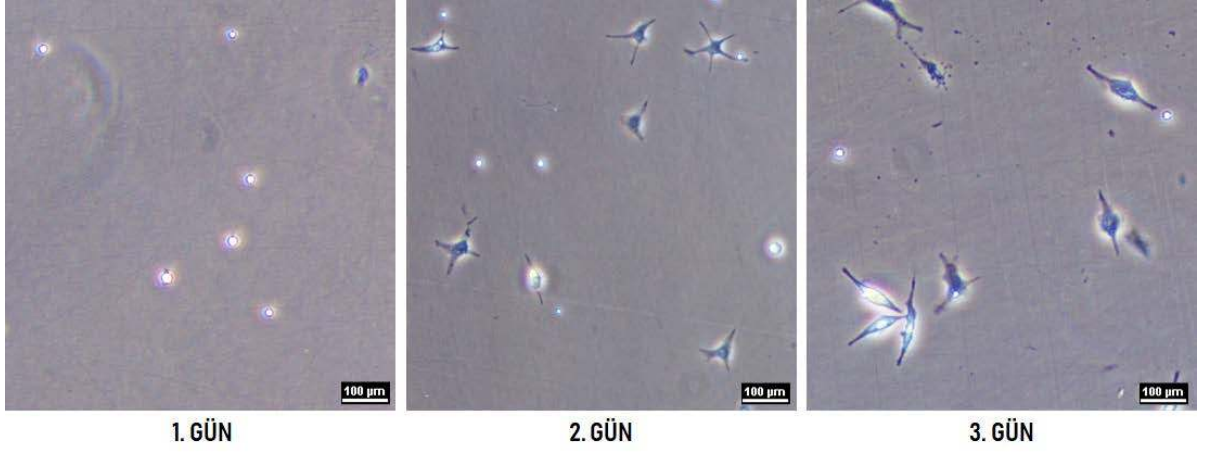
Antijen Dozaj Denemesi Grupları		Gruptaki Fare Sayısı - Cinsiyeti
A Grubu – Kontrol (0 µg antijen)	Kontrol grubu	4 Dişi
B Grubu - 10 µg antijen + adjuvant	Deney grubu	4 Erkek
C Grubu - 20 µg antijen + adjuvant		4 Erkek
D Grubu - 35 µg antijen + adjuvant		4 Erkek

3.3.3. Fare Plazmalarının İndirekt ELISA Testi ile Analizi

96 kuyulu ELISA plakaları, içerisinde 100 ng nöraminidaz (Sigma, N3001) içeren 100 µL PBS/kuyu ile kaplanarak +4 °C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBST ile 3 kez yıkandı. Bloklama işlemi için kuyulara %0,5 BSA içeren, 200 µL PBS çözeltisi eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Kuyular PBST ile 3 kez yıkandı. Her bir kuyuya PBS kullanılarak 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 oranlarında sulandırılmış 100 µL fare plazması (veya hücre kültürü üst sıvısı) örnekleri eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. PBST ile 3 kez yıkanan kuyulara içerisinde 1/1000 oranında alkalen fosfataz (AP) ile konjuge edilmiş Keçi-Anti-Fare polivalen antikor (AP konjuge Keçi Anti-Fare Polivalen antikor; Sigma, A0162) içeren 100 µL PBS uygulandı ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Kuyular PBST ile 5 kez yıkandı. Plakalar, her bir kuyuya substrat tamponu ile 1 mg/ml oranında PNPP içerecek şekilde hazırlanmış çözeltiden 100 µL eklenerek oda sıcaklığında, ışık almayan bir ortamda inkübe edildi. Sonuçlar Thermo Multiscan GO cihazında, 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda, 405 nm’de okutuldu.

3.3.4. Besleyici (Feeder) Hücrelerin Hazırlanması

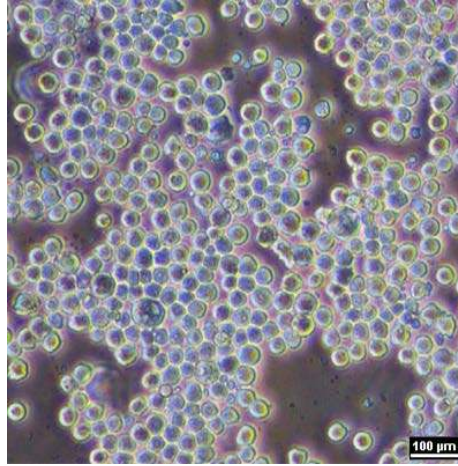
Üretilen hibrit hücrelerinin *in vitro* uyumluluklarının artırılması amacı ile, her bir füzyon işleminden bir gün önce besleyici hücreler hazırlandı. Bu amaçla, sağlıklı bir BALB/c faresi servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldükten sonra %70’lik etanol yardımı ile dezenfekte edilerek steril kabin içerisine alındı. Sırtüstü sabitlenen farenin karın bölgesi derisi steril pens ve makas yardımı ile açıldı. 26 gauge’lik bir enjektör yardımı ile periton içi bölgeye 5ml DMEM enjekte edildi ve tekrar geri çekildi. Alınan sıvıdaki hücre sayısı, hücre sayım lamı kullanılarak sayıldı. Daha sonra, karın içi bölgedeki hücreleri de içeren intraperitoneal sıvı %20 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde, 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına, 100 µl/kuyu ve her bir kuyuda yaklaşık 5000-10000 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Bu hücrelerin hücre kültürü ortamındaki görüntüsü Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Besleyici hücrelerin hücre kültürü ortamındaki görüntüsü. Büyütme çizgisi boyutu = 100 µm'dir.

3.3.5. Füzyon İçin Miyelom Hücrelerinin Hazırlanması

FO miyelom hücreleri füzyon gününden yaklaşık 10 gün önce, 75 cm²'lik hücre kültürü kaplarında çoğaltılmaya başlandı. Füzyon günü, yaklaşık 100-200 x 10⁶ FO miyelom hücresi (6-10 adet 75 cm²'lik hücre kültürü kabı) hazırlandı. Füzyon günü kullanılacak, sağlıklı FO miyelom hücrelerine ait görüntü Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.2. FO miyelom hücrelerinin kültür ortamındaki görüntüsü. Büyütme çizgisi boyutu = 100 µm'dir.

Füzyon gününde bu hücrelerin PBS tamponu içerisinde, hücre sıyrıcı yardımı ile zeminden ayrılımları sağlandı ve elde edilen süspansiyon 3000 rpm'de 10 dakika

santrifüjlendi. Pellet bir kez daha PBS içerisinde süspanse edilerek işlem tekrarlandı ve hücreler besiyeri ve serum artıklarından uzaklaştırıldı. Yıkama işlemini takiben hücreler 20 ml PBS içerisinde süspanse edildi. Hücre sayım lamı aracılığı ile sayılmalarını takiben sonraki aşamalar için hazır bekletildi.

3.3.6. İmmünize Olmuş Farelerin Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi

Farelerin kuyruklarından alınan kanlardan elde edilen plazma örnekleri ile gerçekleştirilen ELISA analizleri sonucunda en yüksek antikor yanıtı tespit edilen fareler füzyon için seçildi. Seçilen fareye, füzyon işleminden 3 gün önce 100 µL PBS içerisinde hazırlanmış olan 20 µg nöraminidaz intraperitonel olarak uygulanarak “hatırlatma immünizasyonu” gerçekleştirildi. Füzyon günü farelere servikal dislokasyon yöntemi uygulandıktan sonra fareler %70’lik etanol ile dezenfekte edildi ve steril kabin içerisine alındı. Sırtüstü sabitlenen farenin karın bölge derisi pens ve makas yardımı ile yanlara doğru açıldı. Sterilize edilmiş yeni makas ve pens yardımı ile fare karın boşluğu açıldı. Dalak, önceden hazırlanmış içerisinde PBS bulunan petri kabına aktarıldı. Dalak dokusu cam bir baget yardımıyla ezilerek dalak hücrelerinin steril süzgeçten geçirilmesi ve PBS’e aktarılması sağlandı. 50 ml’lik steril tüpe aktarılan PBS içerisindeki hücre süspansiyonu 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Pellet bir kez daha PBS içerisinde süspanse edildi. Ezme işlemi sırasında ayrıştırılamamış kaba doku parçaları veya santrifüjleme sırasında yeni oluşmuş iri parçalar pipet yardımı ile süspansiyondan uzaklaştırıldı. Santrifüjleme işlemi tekrar edildi. Yıkama işlemini takiben hücreler 20 ml PBS içerisinde tekrar süspanse edildi. Hücre sayım lamı aracılığı ile sayımlarının gerçekleştirilmesini takiben sonraki aşamalar için hazır hale getirildi.

3.3.7. Hücre Sayımı

Besleyici hücreler ile FO miyelom hücreleri ve immünize edilen farelerden alınmış olan dalak hücreleri istenilen miktarda sıvı içerisinde süspanse edildi. On µl süspansiyon alınarak eşit hacimde (10 µl) tripan mavisi ile karıştırıldı. Karışımdan 10 µl alınarak, lamel ile kapatılmış sayım lamı (Thoma; Marienfeld, C964730) üzerine dikkatlice bırakıldı. Hücreler mikroskop altında incelenerek boyanmayan canlı hücrelerden toplam hücre sayısı aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

$$\text{Toplam Hücre (ml)} = 16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 10^4.$$

3.3.8. Füzyon

Sayımı yapılan ve her biri 20 ml PBS içerisinde bulunan FO miyelom ve dalak hücreleri tek bir 50 ml'lik falkon tüpte bir araya getirildi. Karışım, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellet üzerine, daha önceden hazırlanmış, steril ve 37 °C'de bekletilmekte olan 1 ml PEG çözeltisi, 1 dakikada yavaşça eklendi. Bu işlem sırasında 50 ml'lik falkon tüp, avuç içerisinde döndürülerek hücrelerin sıcak kalması ve PEG çözeltisine eş miktarlarda maruz kalması sağlandı. Takip eden 1 dakika boyunca hücrelerin iki el arasına alınarak karıştırılması ve ısıtılması sağlandı. Sonrasında, avuç içerisinde yerleştirilen tüp düzenli olarak döndürülürken tüp içerisine iki dakikalık sürede 4 ml DMEM, sonraki iki dakikalık sürede 20 ml DMEM ve bunu takip eden 2 dakika içerisinde de %15 FBS içeren DMEM'li besiyeri (sadece FBS ve DMEM'den oluşan) yavaşça eklendi. Bu tüp, 37 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen pellet, %20 FBS içeren, HAT'lı DMEM içerisinde süspanse edilerek, daha önce besleyici hücrelerin ekiminin gerçekleştirildiği hücre kültürü plakalarına 150 µl/kuyu olacak şekilde dağıtıldı.

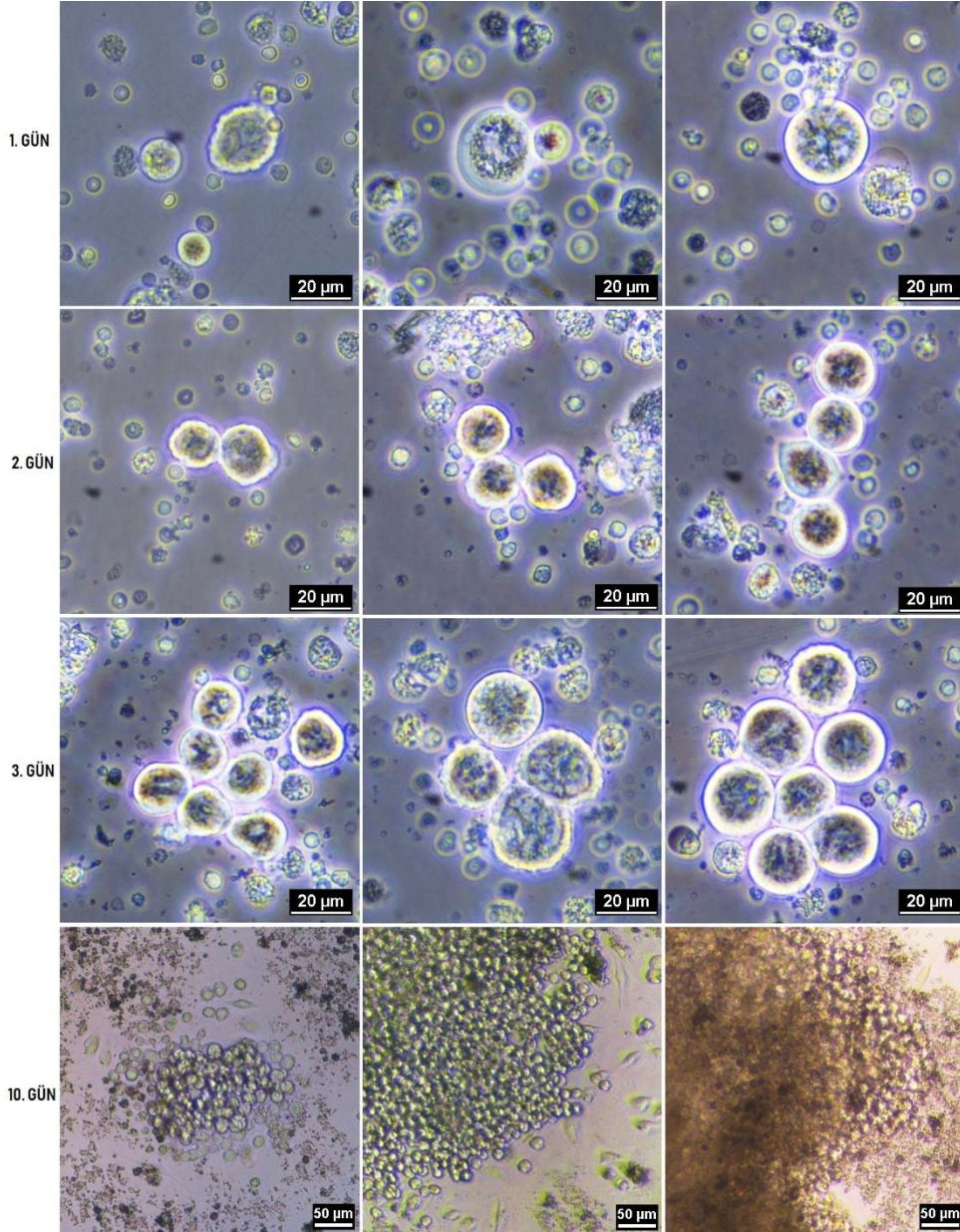
3.3.9. Füzyon Takibi

Füzyondan sonraki 7., 8., 9. günlerde, füzyon plakaları incelenerek hibrit hücre kolonilerinin varlığı ve sayısı mikroskop altında incelendi. Besiyeri sıvısının değişimi için füzyonun 10. gününde yapılan mikroskopik incelemenin ardından (Şekil 3.4) 100 µl, 15. günde ise 150 µl'lik besiyeri uzaklaştırılıp, yerine aynı hacimde, %2 HAT içeren, %20 FBS'li DMEM eklendi. 4-6 besiyeri değişiminin ardından HAT içeren besiyerinden, HT içeren besiyerine, yine 4-6 besiyeri değişiminden sonra ise HT'den normal FBS'li DMEM'e geçiş yapıldı. Çoğalan hibrit hücrelerinin istenilen antikor yanıtına sahip olup olmadığı ELISA tekniğiyle hücre kültürü üst sıvısı kullanılarak test edildi. Her kuyu en az iki kez test edilerek, antikor aktivitesi tespit edilen kuyulardaki hücreler 96 kuyulu hücre kültürü plakalarından 24 kuyulu plakalara aktarıldı.

3.3.10. Çapraz (Kross) Reaksiyon Analizi ve Hibritlerin Geniş Ölçekte Üretimi

Nöraminidaza karşı antikor yanıtı verdiği tespit edilip 24 kuyulu plakalara aktarılan hibrit hücrelerince üretilen antikorun yalnızca "nöraminidaza özgü" olup olmadığının incelenmesi amacı ile çapraz (kross) reaksiyon analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla, ELISA plakaları nöraminidaz harici antijenlerle kaplandı ve antikorun sadece nöraminidaza

bağlanabilirliği ELISA tekniği kullanılarak test edildi. İlk aşamada Bovine Serum Albumin (BSA) ve süt tozu kullanılarak ön analiz niteliğinde gerçekleştirilmiş olan çapraz reaksiyon analizleri, sonraki aşamada Tablo 3.2’de görülen diğer proteinleri de kapsayacak şekilde genişletildi.



Şekil 3.3. Füzyon işlemi sonucunda elde edilen hücrelerin kültür ortamındaki görüntüsü. Büyütme çizgisi boyutu 1., 2. ve 3. günler için 20 µm, 10. gün için 50 µm olarak verilmiştir.

Tablo 3.2. Çapraz reaksiyon analizlerinde kullanılan antijenler.

Çapraz (Kross) Reaksiyon Analizi Antijen Listesi
Süt Tozu (Pınar, 8690565003404)
Bovine serum albümin (BSA; Sigma, A2153)
Apo-Transferrin, Bovine (Sigma, T1428)
γ -Globulin, Bovine (Sigma, SRE0011)
Trombin, bovine (Sigma, T4648)
Fibrinojen, bovine plazmasından (Sigma, F8630)
Plazminojen, bovine plazmasından (Sigma, P9156)

Bu amaçla, daha önce verilen indirekt ELISA tekniğine benzer şekilde, 96 kuyulu ELISA plakaları, içerisinde 100 ng nöraminidaz (Sigma, N3001) veya diğer antijenleri içeren 100 μ L PBS/kuyu ile kaplanarak +4 °C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBST ile 3 kez yıkandı. Bloklama işlemi için kuyulara %0,5 BSA veya %0,5 süt tozu içeren, 200 μ L PBS çözeltisi eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Kuyular PBST ile 3 kez yıkandı. Her bir kuyuya 50 μ L veya 100 μ L hücre kültürü sıvısı örnekleri eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Devam eden aşamalar daha önce belirtilen şekilde uygulandı ve sonuçlar Thermo Multiscan GO cihazında, 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda, 405 nm’de okutuldu. ELISA sonucu değerlendirmelerinde, 90. dakika okumasında nöraminidaza karşı OD₄₀₅ değeri 0,8 ve üzerinde olan, aynı zamanda da diğer antijenlere zayıf bağlanma gösteren hibritler başarılı sayıldı. Çapraz reaksiyon analizinde iki kez olumlu sonuç alınan hibritlerinin 24 kuyulu hücre kültürü plakalarından sırası ile 6 kuyulu plakalara ve 75 cm²’lik hücre kültürü flaskalarına aktarılması, dondurulması ve tek düşürme (limiting dilution) ile klonlanması işlemleri gerçekleştirildi.

3.3.11. Hücrelerin Dondurulması

Dondurulacak hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS tamponu içerisinde, hücre sıyrıcı yardımı ile zeminden ayrılması sağlandı. Elde edilen süspansiyon 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet %80 FBS, %10 DMEM, %10 DMSO içeren hücre dondurma çözeltisi içerisinde tekrar süspanse edildi ve hücre dondurma tüplerine aktarıldı. Hücre dondurma tüpleri -20 °C’de ~1 saat, -80 °C’de ise 1-3 gün bekletilerek kademeli olarak donduruldu. Her bir hibrit hücresi için en az birer tüp -80 °C’de yedek olarak bırakıldı sonra kalan tüpler kalıcı depolama için sıvı azota aktarıldı.

3.3.12. Hücrelerin Tek Düşürme İşlemi ile Klonlanması

Tek düşürme (limiting dilution) işlemi, yüksek genomik kararsızlığa sahip olan hibridoma hücrelerinden sürekli antikör üreten, yüksek kararlılığa sahip saf klonların elde edilmesinde kullanılmaktadır (Fuller vd., 1988; Lee vd., 1991; Yokoyama, 2001; Corrêa vd., 2016). Bu amaçla, sıvı azottan çıkarılan hibridoma hücreleri öncelikle büyük ölçekte çoğaltıldı ve ELISA tekniği ile antikör yanıtı test edildi. Sonrasında, bir miktar hücre, sayım yapılmaksızın alındı ve %20 FBS'li DMEM içeren 96 kuyulu plakaların 1 numaralı kuyu serisine (A1-H1) konuldu. Bu kuyudaki hücreler, 1:3'lük seri dilüsyonlar yardımı ile azalan miktarlarda tüm kuyulara dağıtıldı. Alternatif olarak, bazı hibritler tripan mavisi solüsyonu ve hücre sayım lamı yardımı ile sayıldı ve 0,9 hücre/kuyu olacak şekilde hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Plakalar yaklaşık 10 gün sonra mikroskop altında incelendi ve az sayıda koloni içeren kuyulardaki koloni sayıları belirlendi. Sonrasında, tek koloni içeren kuyulardan başlanmak üzere, gerekli olduğu durumlarda tüm kuyular indirekt ELISA ile test edildi. Düşük koloni sayısına sahip, yüksek ELISA sinyali üreten ve hızlı çoğalma eğilimli hücreler sırası ile önce 24 kuyulu plaka sonra 6 kuyulu plaka ve en son 75 cm²'lik hücre kültürü kaplarına aktarıldı. İndirekt ELISA ile her aşamada bu hücrelerin pozitiflikleri yanıtı test edildi ve dondurularak -86 °C ve sıvı azotta depolandı. Bu süreç, kararlılığın artırılması amacıyla her bir hibrit hücresi için en az iki kez gerçekleştirildi.

3.3.13. Antikör Tiplendirme ve Alt Tiplendirme Çalışmaları

Antikör alt tipinin (izotip) bilinmesi, kullanılacak saflaştırma yönteminin ve ikincil antikör sınıfının belirlenmesinin yanı sıra, tanı sistemlerinde kullanılacak antikörlerin işaretlenmesi süreçleri için de önem taşımaktadır. İzotipin belirlenmesinde, antikör alt tiplendirme strip kiti ve indirekt ELISA kullanımına dayanan iki farklı yaklaşım uygulandı. Kullanılan strip kit, antikör tipi (IgG, IgA, IgM), alt tipi (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) ve hafif zincirini (kappa ve lambda) kısa sürede tanımlayabilmesi açısından avantajlıdır. Ancak, test edilmesi gereken hibrit sayısının fazla olması ve strip kitinin test başına yüksek maliyeti nedeni ile indirekt ELISA'ya bağlı alternatif metodun uygulanmasından da yararlanıldı.

3.3.13.1. Isostrip Kiti Kullanımı ile Antikör Tiplendirme ve Alt Tiplendirme:

Üretici firmanın çalışma protokolüne uygun olarak, çalışılacak örnek %1 BSA içeren PBS yardımı ile 1:100 oranında (0,1 – 1 µg / ml antikör konsantrasyonuna ulaştırılacak şekilde) seyreltilti. 150 µl hacmindeki karışım, kite ait örnek geliştirme tüpüne alındı. Tüp, oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildi ve tüp tabanındaki renkli polimer çözünene kadar

vorteks ile çalkalandı. Tüp içerisine “isotyping kit” stripi bırakılarak 1-10 dakika kadar inkübe edildi. Sonuçlar, kitte belirtilen iş akış şemasına uygun olarak yorumlandı.

3.3.13.2. İndirekt ELISA Yöntemi ile Antikorların Tiplendirilmesi:

Bu yöntemde, nöraminidaza karşı gerçekleştirilen klasik indirekt ELISA genel olarak aynı şekilde gerçekleştirildi. Farklı olarak, üç kopyalı bir şekilde yürütülen çalışmalarda, kuyulara ilgili aşamada 1/1000 oranında sulandırılmış, AP ile konjuge edilmiş Keçi-Anti-Fare polivalen antikorunun yanı sıra 1/1000 oranında sulandırılmış, AP ile konjuge edilmiş Keçi-Anti-Fare IgG antikoru ve 1/30000 oranında sulandırılmış, AP konjuge Keçi-Anti-Fare IgM antikoru içeren 100 µL PBS uygulandı. Sonuçlar, pozitif yanıtın hangi ikincil antikorların kullanımı ile elde edildiğine bakılarak değerlendirildi.

3.3.14. Antikorların saflaştırılması

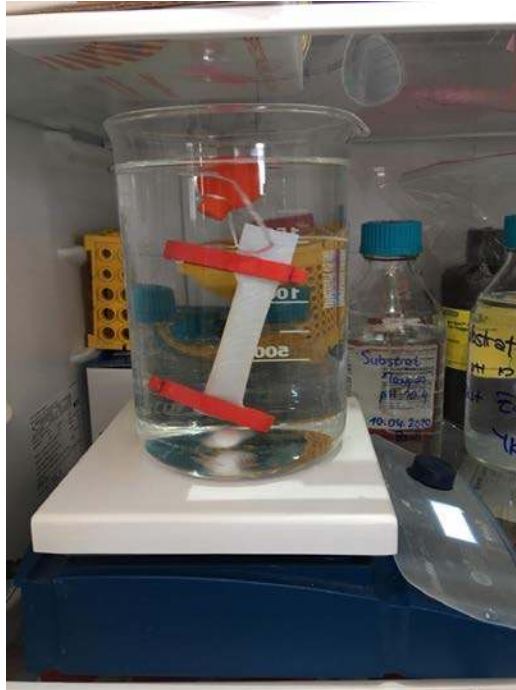
Alt tipi belirlenen antikorların saflaştırılması için, öncelikle hücre kültürü üst sıvısında toplanan monoklonal antikorlar (ve diğer proteinler) kademeli olarak amonyum sülfat ile çöktürüldü. Bu amaçla, hücre kültürü üst sıvısına, son oranı %45 amonyum sülfat olacak şekilde, +4 °C’de, kristal amonyum sülfat yarım saatlik bir zaman diliminde yavaşça eklendi. Karışım, manyetik balık yardımı ile +4 °C’de bir gece karıştırıldı ve ultrasantrifüj yardımı ile 10 000 g’de, + 4 °C’de, 1 saat santrifüj edildi. Bu aşamada kullanılan ultrasantrifüj, Şekil 3.5’te verilmiştir.

Ultrasantrifüj kullanımı sonrasında elde edilen pellet, başlangıç üst sıvı miktarına göre (100–500 ml), olabildiğince yoğun olacak şekilde, 2-5 ml PBS kullanılarak çözündürüldü. Çözülen karışım, +4 °C’de, gece boyunca PBS’e karşı diyaliz edildi (Şekil 3.6). İlaveten, kısmi saflaştırma etkinliğinin artırılabilmesi amacı ile bu diyaliz işlemi dH₂O veya 20 mM Tris kullanılarak da gerçekleştirildi. Diyaliz sırasında 100 kDa MWCO değerine sahip diyaliz membranı kullanıldı ve başlangıç hacminin yaklaşık 100 katı kadar PBS (veya dH₂O / 20 mM Tris)’in 3 kez değişimi gerçekleştirildi. Çalışmanın ilerleyen kısımlarında, yalnızca bu aşamaya kadar gerçekleştirilen saflaştırmalar “kısmi saflaştırma” olarak tanımlandı.

Sonraki aşamada, kısmi saflaştırılmış olan antikorların ileri saflaştırma aşamasında, saflaştırılacak antikoron alt tipine göre; IgG tipi antikorlar için Protein G afinite kolonu, IgM tipi antikorlar içinse IgM spin kolonu kiti ve IgM afinite kolonları üreticinin protokolüne uygun olarak kullanıldı.

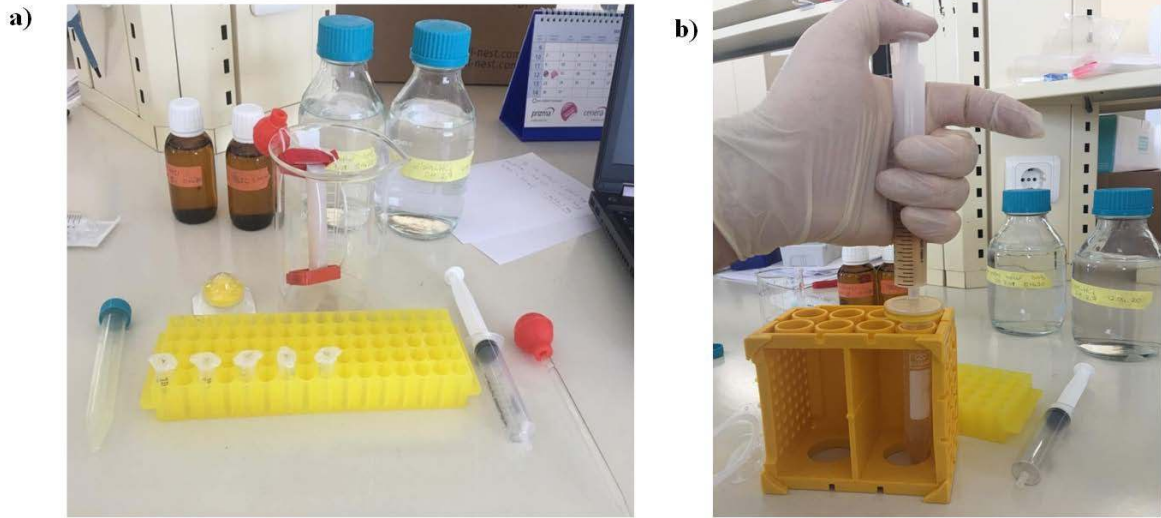


Şekil 3.4. Hitachi CP100NX ultrasantrifüj cihazı (a) ve kontrol menüsü (b).



Şekil 3.5. Manyetik karıştırıcı ve diyaliz düzeneği.

IgG tipi antikorların saflaştırılmasında kolona uygulanacak, diyaliz işlemi tamamlanmış örnekler öncelikle 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, 0,45 µm’lik enjektör ucu filtreden geçirilerek kolona uygulamaya hazır hale getirildi (Şekil 3.7).

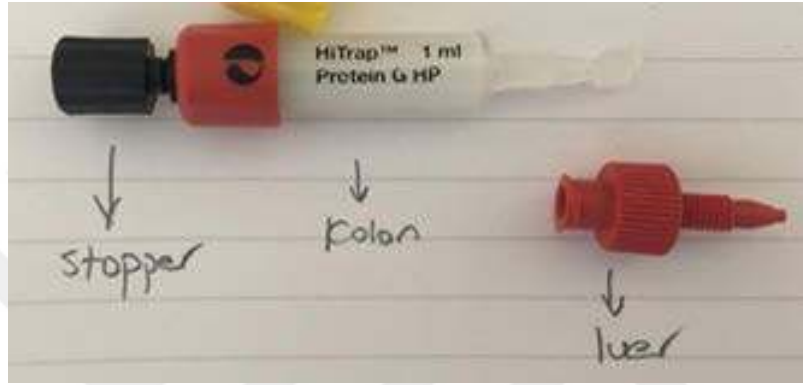


Şekil 3.6. Proten G kromatografisi ve benzeri şekilde gerçekleştirilen IgM afinite kromatografisi öncesi hazırlık işlemleri. Diyaliz işlemi tamamlanan örnek, kolona uygulanmadan önce santrifüj ve filtrasyon için hazırlandı (a). Santrifüjü sonrasında süpernatant, enjektör ucu filtreden geçirildi (b) ve kolon kromatografisine hazırlandı.

Kolon (Şekil 3.8), 5-10 ml bağlama tamponu ile 1ml/dakika hızında yıkandı. Örneği içeren karışımın kolondan 1 ml/dakika hızında olacak şekilde geçişi sağlandı. Kolon, 5-10 ml bağlama tamponu ile 1ml/dakika hızında ikinci kez yıkandı. Ardından 3-5 ml elüsyon tamponu, 1 ml/dakika hızında uygulandı. Kolondan çıkan sıvı her 1 ml’lik sıvı, içerisinde 50-100 µl dengeleme (nötralizasyon) tamponu içeren santrifüj tüplerinde biriktirildi ve 4 °C’de depolandı. Kolon ise 5 ml %20’lik etanol geçişi sağlandıktan sonra ve yine %20’lik etanol içerisinde +4°C’ de muhafaza edildi.

IgM tipi antikorların saflaştırılmasında, büyük hacimli ve maliyetli afinite kolonlarının yanı sıra, düşük maliyetle birden fazla örneğin saflaştırılmasına olanak tanıyan küçük hacimli spin kolonlardan faydalanıldı. Tüm uygulamalar üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Spin kolonlarda, kısaca 400 µL kısmi saflaştırılmış ürün veya hücre kültürü üst sıvısı IgM afinite rezinine sahip spin kolonlara doğrudan uygulandı ve yıkamaları gerçekleştirildi. Kolon antikor bağlama kapasitesinin test edilmesi ve elde edilebilecek ürünün arttırılması amacı ile bu işlem yaklaşık 12 kez tekrarlandı. Sonrasında ürün ~800 µL elüsyon

tamponu ile geri kazanıldı ve üzerine 80 µL nötralizasyon tamponu eklendi. Büyük hacimli afinite kolonlarında ise, 8 ml kısmi saflaştırılmış ürün veya hücre kültürü üst sıvısı, 2 ml örnek sulandırma tamponu ile karıştırıldı, IgM afinite rezinine sahip kolonlara uygulandı ve yıkamaları gerçekleştirildi. Sonrasında ürün ~10 ml elüsyon tamponu ile geri kazanıldı ve üzerine %12 v/v oranında nötralizasyon tamponu eklendi. Antikorlar + 4 °C’de muhafaza edildi ve bir hafta içerisinde test edildi. Kullanılan kolon ise kite ait depolama sıvısında +4 °C’de muhafaza edildi.



Şekil 3.7. Kullanılan protein G kolonu ve kısımları.

3.3.15. Saflaştırılan Antikorların Miktar Tayini

Kromatografi ile saflaştırılan antikorun miktarının tespitinde aromatik aminoasitlerin 280 nm’de ışık absorpsiyonuna dayanan UV yöntemi ve G-250 Coomassie parlak mavisi boyasının proteine bağlanması ile oluşturduğu sinyalin 595 nm’de ölçümüne dayanan Bradford yöntemi kullanıldı.

3.3.15.1. UV Spektrofotometre Yöntemi ile Antikor Miktar Tayini

2-4 µl hacmindeki elüsyon tamponu ve örnek, µDrop plate kullanılarak (Şekil 3.9) Thermo Multiscan GO cihazında, 280 nm’de okutuldu. Elde edilen değer, antikor tipine göre, aşağıda verilen formüllere uygulandı ve antikor miktarı hesaplandı (Andrew ve Titus, 2001).

- A_{280} değeri üzerinden, IgG miktarı belirleme:

$(A_{280} \text{ değeri} \times \text{seyreltme katsayısı}) / 1.43 = \text{mg/ ml düzeyinde gerçek Ab miktarı}$

- A_{280} değeri üzerinden, IgM miktarı belirleme:

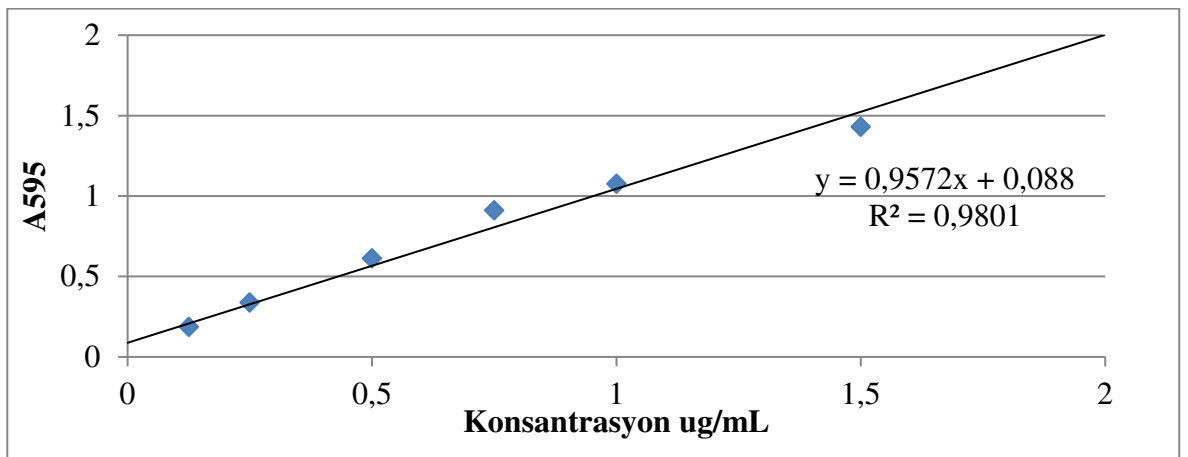
$(A_{280} \text{ değeri} \times \text{seyreltme katsayısı}) / 1.18 = \text{mg/ ml düzeyinde gerçek Ab miktarı}$



Şekil 3.8. Düşük hacimler örneklerin UV dalga boylarında analizini yapabilen Thermo µDrop plate görüntüsü.

3.3.15.2. Bradford Yöntemi ile Antikor Miktar Tayini

Uygulama, kullanılan Bradford solüsyonu üreticisinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kısaca, BSA protein standartları ve örnekler, 1 ml Bradford solüsyonu ile, tek kullanımlık polistiren küvetler içerisinde karıştırıldı. Karışım karanlıkta, oda sıcaklığında 5 – 30 dakika inkübe edildi ve 595 nm’de okumaları gerçekleştirildi. BSA standartları yardımı ile oluşturulan standart eğri grafiği örneklerdeki protein miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Oluşturulan örnek bir Bradford analizi standart eğrisi Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.9. Örnek Bradford analizi standart eğrisi.

3.3.16. Antikorların Biotin ile İşaretlenmesi

Üretilen antikorların tanı kiti prototipinde kullanılabilir hale getirilmesinde işaretleme önemli aşamalardandır. Biotin-avidin sistemi, biyotin molekülünün avidine karşı yüksek bağlanma eğiliminden ($K_d=10^{-15}$) yararlanmaktadır. Bu sistemde, genellikle biyotin molekülü antikora, avidin molekülü ise sinyal üretici enzim veya floresan maddelere bağlanmaktadır. Antikora biyotinin, sonrasında da bu biyotine avidinli yapıların bağlanmasının antikorun yapısı ve etkileşimlerine etkisini en aza indirmek amacı ile uzun kollu biyotin (long-armed biyotin, spacer biotin) olarak adlandırılan modifiye biyotin türevi tercih edildi (Holmes vd., 2001).

Uygulama için aday antikor, 1-2 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. 4°C’de, 500 ml süksinimid ester işaretleme tamponuna karşı, 2 gün süre ile diyaliz edildi. Bu işlem sırasında tampon 2-3 kez yeni tampon ile değiştirildi. Diyaliz sonrası antikor konsantrasyonu, A280 nm’de, UV spektrofotometre yöntemi ile belirlendi. Her 1 miligram antikor için, susuz DMSO içerisinde 10 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış, 10 µl biyotin molekülü eklendi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Elde edilen antikorlar, 4°C’de, 500 ml biyotinleme sonrası diyaliz tamponuna karşı, 2 günlük bir süre ile diyaliz edildi ve bağlanmamış biyotinlerin uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlem sırasında tampon 2-3 kez yeni tampon ile değiştirildi. Diyaliz sonrası antikor konsantrasyonu UV spektrofotometre yöntemi ile yeniden belirlendi.

3.3.17. Çift Antikor Sandviç ELISA Tekniği

ELISA plakaları 100 µl PBS içerisinde 100 – 1000 ng miktarlarında ticari nöraminidaz antikorları ile veya ~100 ng Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Tanı Teknolojileri Laboratuvarı (MAKÜ-TTL)’nda geliştirilmiş ve saflaştırılmış nöraminidaz antikorlar ile veya doğrudan 100 µl’lik nöraminidaza karşı üretilmiş hibridoma üst sıvısı ile 4°C’de, bir gece kaplandı. Ertesi gün PBST ile 3 kez yıkandı. Bloklama işlemi için kuyulara %0,5 – 4 aralığında BSA içeren, 200 µL PBS çözeltisi eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Plakalar PBST ile 3 kez yıkandı. Kuyulara, 0-500 ng arasında nöraminidaz (Sigma, N3001) içeren PBS veya sağlıklı hayvanlardan alınan serum örnekleri eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Ardından PBST ile 3 kez yıkandı. Sonrasında, kuyulara önceki aşama kullanılan antikorlardan ayırt edilebilecek özelliklere sahip nöraminidaz antikorları, 100 µl PBS içerisinde (100 – 1000 ng miktarındaki ticari nöraminidaz antikorları veya 20-100 ng MAKÜ-TTL’de geliştirilmiş ve saflaştırılmış nöraminidaz antikorları veya 10 ng

biyotinlenmiş aday antikor) veya nöraminidaza karşı geliştirilmiş 100 µl'lik hibridoma üst sıvısı halinde eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Plakalar PBST ile 3 kez yıkandı. Bundan sonra, bir önceki aşamada kullanılan antikorun seçici bir şekilde ayırt edilebilmesi için AP ile işaretlenmiş farklı antikorlar veya streptavidin-HRP kullanıldı. Bir önceki aşamada kullanılan antikorun biyotinlenmiş bir antikor olması halinde kuyulara; 1/1000 oranında sulandırılmış, AP konjuge Keçi-Anti-Fare polivalen antikoru veya 1/1000 oranında sulandırılmış, AP konjuge Keçi-Anti-Fare IgG antikoru veya 1/1000 – 1/30000 oran aralığında sulandırılmış, AP konjuge Keçi-Anti-Fare IgM antikoru içeren 100 µL PBS uygulandı. Antikorun biyotinlenmiş bir antikor olması halinde ise 1 µg/ml streptavidin-HRP konsantrasyonunda hazırlanmış 100 µL PBS kuyulara eklendi. Plakalar 37 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra PBST ile 5 kez yıkandı. Sonraki aşamada, bir önceki aşamada kullanılan enzimin AP işaretli olması halinde; kuyulara substrat tamponu ile 1 mg/ml oranında PNPP içerecek şekilde hazırlanmış çözeltiden 100 µL eklendi ve oda sıcaklığında, ışık almayan bir ortamda inkübe edildi. Sonuçlar Thermo Multiscan GO cihazında, 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda, 405 nm'de okutuldu. Streptavidin-HRP kullanılmış olması halinde ise, 100 µL TMB içeren yaban turpu peroksidaz substrat karışımı eklendi ve oda sıcaklığında, ışık almayan bir ortamda inkübe edilirken mavi renk oluşumu sık aralıklarla takip edildi. Göz kararı veya spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda gerçekleştirilen okumalarda A₆₅₀ absorbans değeri 0,5'e ulaşan kuyu olması halinde, yaban turpu peroksidaz stop solüsyonu kullanılarak reaksiyon durduruldu. Oluşan sinyal 450 nm'de okutuldu ve sonuçlar değerlendirildi.

3.3.18. Çift Yakalamalı Antikor Sandviç Yöntemi

Bu yöntemde, klasik çift antikor sandviç ELISA tekniğinden farklı olarak, plakalar öncelikle 1/1000 – 1/10000 oranında sulandırılmış, AP konjuge Keçi-Anti-Fare IgM antikoru bulunduran 100 µL PBS ile, 4°C'de, bir gece kaplandı. Ertesi gün uygulanan yıkama, bloklama ve yıkama sonrası bloklama aşamaları çift antikor sandviç ELISA tekniği ile aynı şekilde uygulandı. Sonrasında, kuyulara IgM alt tipinde antikor bulundurduğu bilinen, nöraminidaza karşı geliştirilmiş, 100 µl hibridoma üst sıvıları eklendi ve 37°C'de, 1 saat inkübe edildi. Plakalar PBST ile 3 kez yıkandı. Kuyulara nöraminidaza karşı geliştirilmiş olan ve IgG tipinde antikor barındıran 100 µl hibridoma üst sıvısı veya 100 µl PBS içerisinde saflaştırılmış 100 ng işaretli IgG antikoru veya biyotinle işaretlenmiş 10 ng IgG antikoru içeren karışım eklendi. Plakalar 37 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra PBST ile 3 kez yıkandı. Bundan sonra, bir önceki aşamada kullanılan IgG antikorunun işaretli

antikor olması halinde 100 µl PBS içerisinde 1/1000 oranında sulandırılmış, AP konjuge Keçi-Anti-Fare IgG antikorunu kullandı. Antikoru biyotinlenmiş bir antikor olması halinde ise 1 µg/ml streptavidin-HRP konsantrasyonunda hazırlanmış 100 µL PBS kuyulara eklendi. Sonraki aşamalar yine, bu aşamada kullanılan antikoru AP veya HRP işaretli olmasına göre, çift antikor sandviç ELISA tekniğine benzer olarak yürütüldü.

3.3.19. Hücrelerden Proteinlerin Saflaştırılması

Uygulama, kullanılan ticari hücre parçalama tamponu üreticisinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Buna göre, hücreler 75 cm²'lik hücre kültürü kaplarında çoğaltıldı. Besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS kullanılarak (4 °C) iki kez yıkandı. Hücrelerin üzerine, içerisine 1X oranına sulandırılmış Halt proteaz inhibitör kokteyli içeren 600 -1000 µL kadar soğuk RIPA tamponu eklendi. Kültür kabı, aralıklarla sıvının tüm hücre yüzeylerini kaplayacağı şekilde hareket ettirilerek 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Hücre sıyrıcısı yardımı ile kültür kabındaki karışım toparlandı ve santrifüj tüpüne aktarıldı. Sonrasında, buz içerisinde bekletilen karışıma %50 güç altında, 5 saniye uygulama- 5 saniye bekletme döngüsü ile toplamda 30 saniye ultrasonikasyon uygulandı. Karışım 14000 g'de, 15 dakika, +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant küçük hacimli tüplere aktarıldı ve -80 °C'de muhafaza edildi.

3.3.20. SDS-Page ile Proteinlerin Ayrıştırılması

Ticari nöraminidaz antijenlerinin içeriğinde bulunan nöraminidaz ve diğer proteinlerin boyutlarına göre ayrıştırılmasında SDS-Page tekniğinden yararlanıldı. İşlem, kullanılacak olan örneklerin ön hazırlığı ve sonrasında örnek içeriğinin boyutlarına (ve yüklerine) göre ayrıştırılmasını (elektroforez) süreçlerini kapsar. Bu süreçlerde kullanılan jel içerikleri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Örneklerin ön hazırlığı aşamasında incelenecek örnek (1-30 µg protein), PBS ve 4X örnek yükleme tamponu, son hacim elektroforezi yapılacak tüm örnekler için aynı olacak şekilde, 1.5 ml'lik tüplerde karıştırıldı. Tüpler 96 °C'lik kuru banyoda 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında buz üzerine alınarak soğuması sağlandı.

SDS-Page analizinde %4'lük yükleme jeli ve %10'luk ayırma jelinden oluşan kesikli jeller kullanıldı. Ayırma jeli karışımı Tablo 3.3'te verilen miktarlara göre hazırlandı ve jel kasetine döküldü. Jelin hava ile temasının kesilmesi amacı ile üst kısmı ince bir su ile doyurulmuş izobütanol tabakası ile kaplandı ve oda sıcaklığında 20 dakika (veya jeller sertleşene kadar) inkübe edildi. Sertleşen jel üzerinden izobütanol tabakası uzaklaştırıldı,

yükleme jeli karışımı eklendi ve tarak yerleştirildi. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Jel kaseti elektroforez tankına yerleştirildi, tanka yürütme tamponu eklendi ve tarak çıkartıldı. Oluşan kuyucuklar yükleme tamponu ile yıkanarak olası SDS parçacıklarının uzaklaştırılması sağlandı. Elektroforeze tabi tutulacak örnekler kısaca santrifüjlendi, birkaç kez köpürmemesine dikkat edilerek pipetlendi ve kuyucuklara yüklendi. Protein markerı eklendi ve elektrotlar sisteme bağlandı. Öncelikle 15 dakika, 75 V sonrasında ise 60 dakika 135 V güç uygulaması yapılarak elektroforetik ayırım gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. SDS-Page için hazırlanan kesikli jel içeriği. Karışım, %10'luk ayırma jeli ve %4'lük yükleme jelinden oluşacak 2 mini jel için yeterlidir.

	%10'luk ayırma jeli	%4'lük yükleme jeli
<i>dH₂O</i>	5,03 ml	3 ml
<i>1.5 M Tris-HCl pH 8.8</i>	3,75 ml	-
<i>0.5 M Tris-HCl pH 6.8</i>	-	1,26 ml
<i>%30 akrilamid (29:1)</i>	6 ml	0,66 ml
<i>%10 (w/v) SDS</i>	150 µl	50 µl
<i>TEMED</i>	7,5 µl	5 µl
<i>%10 (w/v) APS</i>	75 µl	25 µl
<i>Toplam hacim</i>	15,01 ml	5 ml

3.3.21. Membran Transferi

Western blot analizi öncesinde, poliakrilamid jel içerisindeki örneklerin fiziksel ve kimyasal dayanımı yüksek bir membrana, elektroforetik ayırmadaki düzenin korunacağı şekilde aktarılması işlemi membran transferi olarak adlandırılır.

Uygulama için; kullanılacak PVDF membran jel boyutunda kesildi ve metanol içinde kısa süre ıslatılarak aktive edildi. Elektroforezi tamamlanan jel kaseti açıldı, yükleme jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Jel ve membran, transfer tamponu ile ıslatılmış filtre kağıtları arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi ve transfer kaseti oluşturuldu. Kaset, içerisinde 1X transfer tamponu, manyetik balık ve buz paketi bulunan tanka yerleştirildi. Elektrotlar bağlandı ve oda sıcaklığında, 60 dakika, 125 V güç uygulandı.

3.3.22. Western Blot Yöntemi

Ticari nöraminidaz antijenleri ile bu tez çalışması sırasında geliştirilen antikorların ayrıca diğer ticari birincil (primer) ve ikincil (sekonder) antikorların etkileşimlerinin görsel olarak incelenmesinde western blot yönteminden yararlanıldı. Bu aşama, transferi tamamlanarak PVDF membran üzerine sabitlenen örneklerin farklı solüsyonlarla

inkübasyonunu ve görüntülemeyi kapsamaktadır. Uygulamalar sırasında, tüm inkübasyonlar aksi belirtilmediği sürece oda sıcaklığında ve yatay çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Transfer işlemi tamamlanan PVDF membran TBST ile 10 dakika yıkandı ve %5 süt tozu veya %1 BSA içeren TBST ile 1 saat bloklandı. Primer antikor uygulaması saflaştırılmış veya ticari antikorlar için bloklama solüsyonu içerisinde Tablo 3.4'te görülen oranlarda sulandırılarak, hücre kültürü üst sıvıları ise doğrudan membran üzerine eklenerek uygulandı. Membran 1 saat inkübe edildi ve daha sonra 3 kez 10 ml TBST ile, 10 dakika yıkandı. Bloklama solüsyonu içerisinde Tablo 3.4'te görülen oranlarda sulandırılan ikincil antikorlar eklendi ve 1 saat inkübe edildi. Önceki aşamaya benzer şekilde 3 kez TBST yıkaması gerçekleştirildi. Membran, parafilm üzerine alındı ve kullanılan ikincil antikora göre; AP ile işaretli antikor kullanılmış ise BCIP / NBT substrat karışımı ile HRP işaretli antikor kullanılmış ise ECL Select Substrat solüsyonları ile muamele edildi. Oluşan sinyal UVP Biospectrum 515 jel görüntüleme cihazı aracılığı ile dijital ortama aktarıldı.

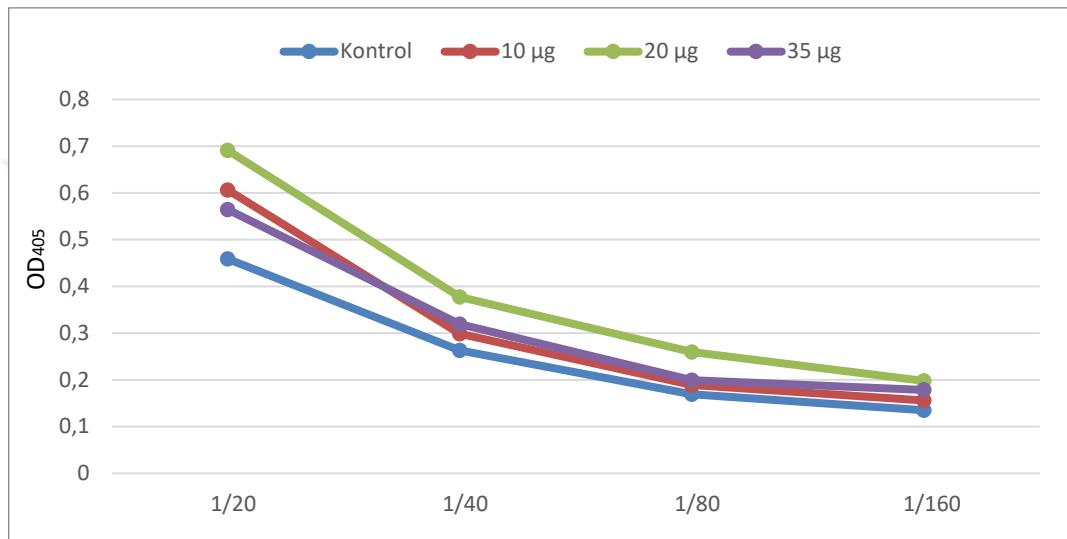
Tablo 3.4. Western blot analizi sırasında kullanılan birincil ve ikincil antikorlar.

Antikor	Sulandırma Oranı
<i>Keçi anti nöraminidaz poliklonal antikor (laboratuvarda geliştirilen)</i>	1:1000
<i>Tavşan anti nöraminidaz poliklonal antikor (Invitrogen, PA1-85712)</i>	1:500
<i>Keçi Anti-Fare Polivalen-AP konjugatlı (Sigma, A0162)</i>	1:1000
<i>Keçi Anti-Fare IgM-AP konjugatlı (Sigma, A9688)</i>	1:5000
<i>Rabbit Anti-Keçi IgG-AP konjugatlı (Abcam, ab6742)</i>	1:4000
<i>Keçi Anti-Rabbit IgG-AP konjugatlı (Abcam, ab6722)</i>	1:4000
<i>Keçi Anti-Rabbit IgG-HRP Konjugatlı (Advansta, R-05072-500)</i>	1:10000

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Farelerde Kuvvetli Yanıt Oluşturan İmmünizasyon Dozunun Belirlenmesi

İkinci (II.) immünizasyon sonrasında fare kuyruk veninden alınan kanlardan 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 sulandırma oranlarında hazırlanan plazma örneklerinin ELISA sonucu Şekil 4.1’de verilmiştir. Buna göre, 20 µg nöraminidazın etkin antikor yanıtını uyaran en düşük doz olduğu görülmüş, takip eden immünizasyonlarda ise sadece bu doz uygulanmıştır.

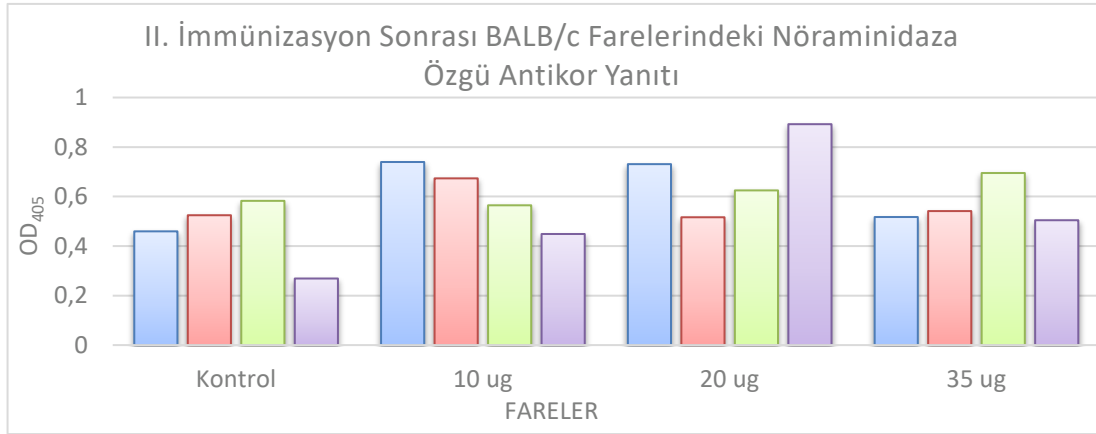


Şekil 4.1. 20 µg nöraminidazın etkin immün yanıt uyarımı için yeterli olduğunu gösteren doz analizi çalışması sonucu.

4.2. Füzyon Çalışmasına Alınacak Farelerin Seçimi

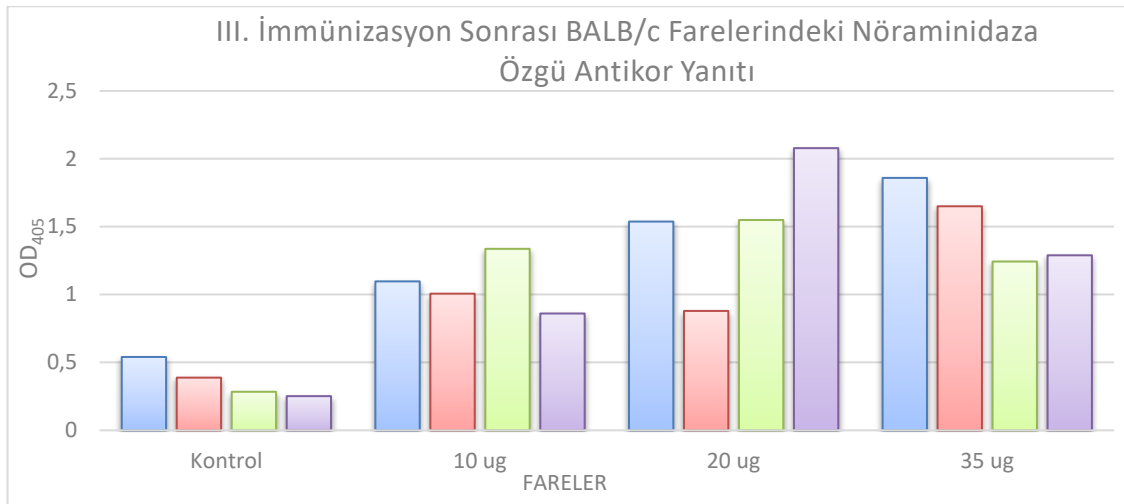
Dozaj analizi çalışmaları sırasında en yüksek antikor yanıtı geliştiren farelerin füzyona alınması hedeflendi. Buna amaçla, farelerde II., III. ve IV. immünizasyonlar sonrası gelişen nöraminidaza özgü antikor yanıtları ayrı ayrı takip edildi (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).

Buna göre, II. immünizasyon sonrasında 20 µg nöraminidaz uygulama grubunda yer alan 4 numaralı farenin (C4) en yüksek antikor titresine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.2). Şekil 4.1 ve Şekil 4.2, 20 µg nöraminidaz uygulamasının yeterli uyarımı sağladığını gösterdiğinden, sonrasında diğer antijen uygulama gruplarında da 20 µg nöraminidaz ile immünizasyonlar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. II. immünizasyon sonrası BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı grafiği.

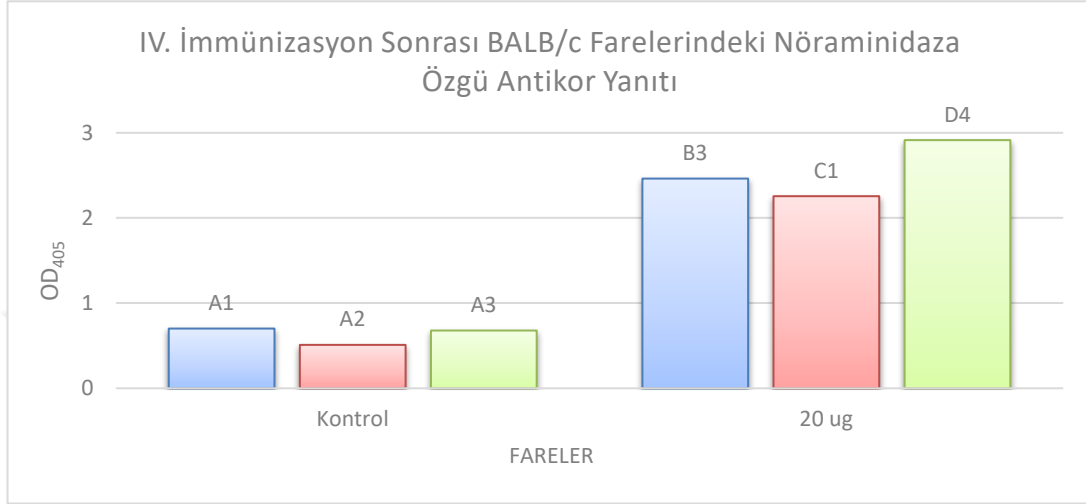
Üçüncü immünizasyon sonrasında 20 µg nöraminidaz grubunda yer alan sırası ile 4, 3 ve 1 numaralı fareler ile (sırası ile C4, C3 ve C1), eski 35 µg grubunda yer alan 1 ve 2 numaralı fareler (D1 ve D2) en yüksek antikor titresine sahiptir. Üçüncü immünizasyon itibari ile fareler C4, D1 ve C3 füzyon çalışmasına aktarılmıştır.



Şekil 4.3. III. immünizasyon sonrası BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı grafiği.

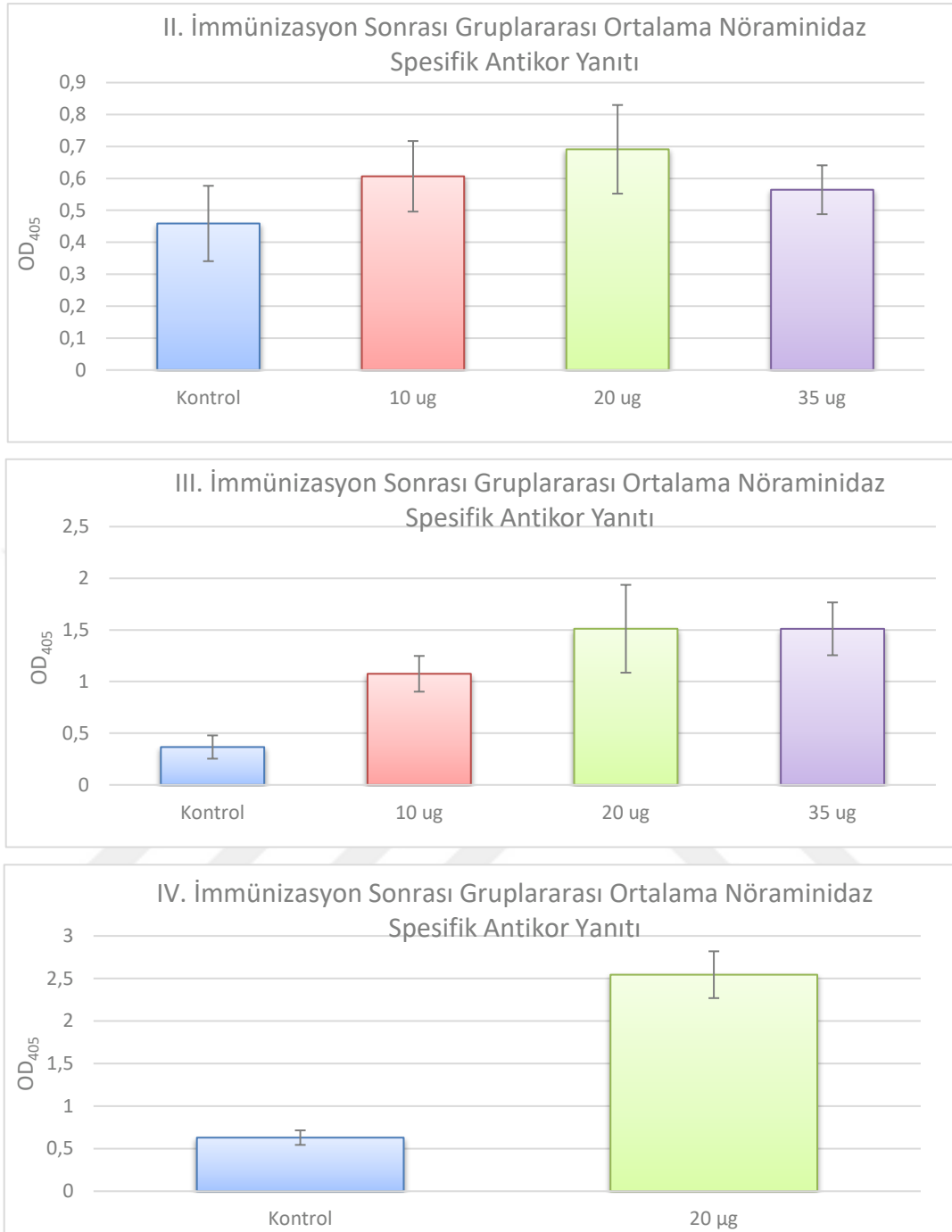
Dördüncü immünizasyon, yalnızca daha önce füzyonda kullanılmamış, yüksek antikor yanıtı veren diğer farelere gerçekleştirilmiştir. Eski 10 µg grubu faresi B3, 20

μg grubu faresi C1 ve eski 35 μg grubu faresi D4'te 20 μg nöraminidaz immünizasyonu sonrası elde edilen yanıt Şekil 4.4'te verilmiştir. Kontrol grubu farelerine ise PBS uygulamasına devam edilmiştir. İlerleyen dönemde fare D4 ve fare B3'ün de füzyonda kullanılması planlanmıştır.



Şekil 4.4. IV. immünizasyon sonrası BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı grafiği.

Son olarak, Şekil 4.5 tekrarlı immünizasyonların farelerce geliştirilen immün yanıtı kuvvetlendirdiğini ortaya koymaktadır.

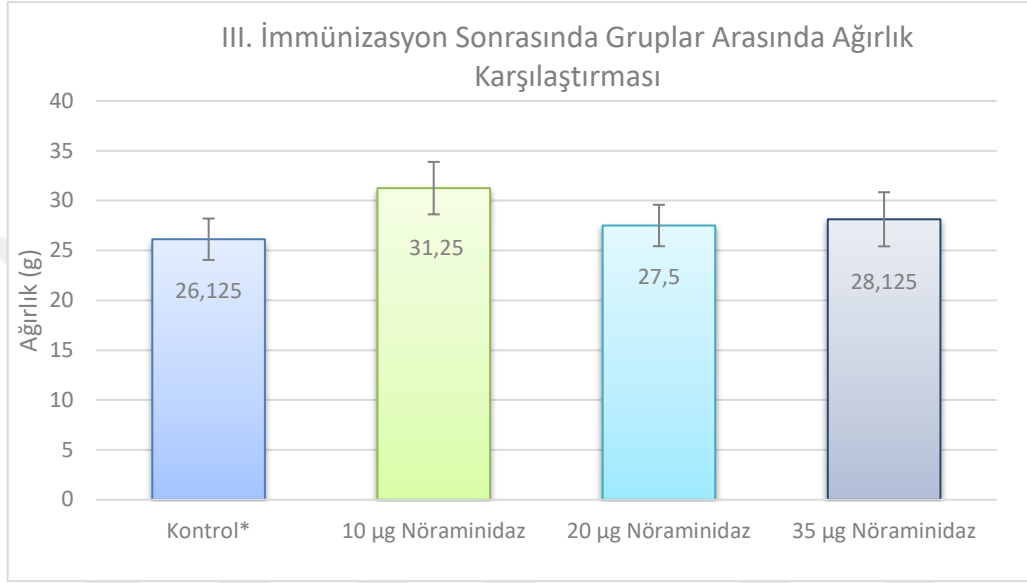


Şekil 4.5. Tekrar eden immünizasyonların BALB/c farelerindeki nöraminidaza özgü antikor yanıtı kuvveti üzerine etkisi (Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir).

4.3. İmmünizasyonların Fare Vücut Ağırlığı Üzerine Etkisi

Farklı miktarlarda antijen kullanılarak gerçekleştirilen immünizasyonların farelerce ne kadar iyi tolere edilebildiğinin anlaşılmasına yardımcı olması amacı ile III.

immünizasyon sonrasında her bir gruptaki fareler tartılarak uygulanan nöraminidaz miktarı – fare vücut ağırlığı ilişkisi sorgulandı. Sonuçlar ANOVA (tek yönlü) ile, Microsoft Excel 2016 kullanılarak karşılaştırıldı. ANOVA analizi sonucunda gruplar arası ağırlık farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve nöraminidazın farelerce, vücut ağırlığı üzerine olan etkisi yönünden iyi tolere edilebildiği görülmüştür (Şekil 4.6; p değeri: 0,162).



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan nöraminidazın BALB/c farelerinin vücut ağırlığı üzerindeki etkisi (Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir).

4.4. Füzyon ve Hibridoma Hücrelerinin Eldesi

Doz analizi çalışmaları sırasında immünizasyonları gerçekleştirilen 3 fareyi içeren füzyon çalışmaları, Tablo 4.1’de Füzyon I, Füzyon II ve Füzyon III sütunlarında özetlenmiştir. Bu füzyonların değerlendirilmesi sonucu iki ek füzyon çalışması daha yürütülmüştür (Füzyon IV ve Füzyon V sütunları). Bu değerlendirmeler sonucunda:

- Elde edilen hibrit hücre sayısı ve verimi yönünden devam eden füzyonlarda başarı artmış, ancak nöraminidaza özgü antikor üreten hibritler yönünden tek olumlu sonuç II. füzyondan alınmıştır.
- Birinci (I.) füzyonda, nöraminidaza karşı antikor aktivitesi gösteren hibrit elde edilememesinin sebebi, bu füzyonun 3 immünizasyon sonrasında gerçekleştirilmiş olması ve nispeten erken bir dönemde kalınmış olması olabilir.

- III. füzyona ait toplam hibrit hücre sayısı ve füzyon verimi birinci ve ikinci füzyonlara nazaran yüksek olmasına rağmen, tespit edilemeyen bir sebep ile tüm antikor yanıtları farklı zamanlarda kaybedilmiş ve çalışma sonlandırılmıştır. Çalışma sırasında, 112 hibritten en az bir kez pozitif yanıt alınmışken, bu yanıtlar ikinci teyitte 20'ye gerilemiş, sonrasında ise tamamen kaybedilmiştir.

- Füzyon II sonucunda elde edilen hibritlerin IgM tipindeki antikorlar ürettiği görülmüştür. Uygulanan immünizasyon takvimi ile yüksek sayıda hibrit eldesine rağmen nöraminidaz için uygulanan immünizasyon protokolünün, geliştirilen antikor yanıtının IgG sınıfına dönüşümü tetiklemede yetersiz kaldığı değerlendirilmiştir.

Saflaştırma ve prototip geliştirme çalışmalarında daha kolay kullanılabileceği öngörülen IgG tipindeki antikorların elde edilebilmesi için yeni fare immünizasyonları gerçekleştirilmiştir. Uygulanan antijen ve adjuvant tipi, uygulama yolu, uygulama sıklığı, antijen miktarı gibi parametrelerin tetiklenen immün yanıt profilini etkilediği bilinmektedir (Krishnan vd., 2000; Lee vd., 2017). IgG tipindeki anti-nöraminidaz antikorlarının elde edilmesi amacı ile 20 µg nöraminidaz kullanılarak yeni immünizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Füzyon çalışması ise, geçmişten farklı olarak 3-4 ve 5. immünizasyonlar yerine, 7. ve 8. immünizasyonlar sonrasında gerçekleştirilmiş ve daha uzun süren bir immünizasyon takvimi uygulanmıştır.

Tablo 4.1. Füzyon koşulları ve sonuçları.

	I. Füzyon	II. Füzyon	III. Füzyon	IV. Füzyon	V. Füzyon
Füzyonda kullanılan miyelom hücresi sayısı	70 x 10 ⁶	150 x 10 ⁶	120 x 10 ⁶	185 x 10 ⁶	32 x 10 ⁶
Füzyonda kullanılan dalak hücresi sayısı	90 x 10 ⁶	252 x 10 ⁶	278,4 x 10 ⁶	90 x 10 ⁶	30,4 x 10 ⁶
Kuyu başına besleyici hücre sayısı	7000	12000	5000	47700	10600
Füzyon hücreleri aktarılan kuyu sayısı	576	736	960	1024	1152
Füzyon sonucu toplam hibrit hücresi sayısı	290	677	954	56	209
Füzyon verimi	%50,34	%91,98	%99,37	%5,47	%18,14
Antikor aktivitesi tespit edilen hibrit sayısı	-	55	20	-	11
Çapraz reaksiyon ön analizlerinde başarı gösteren hibrit sayısı		32	-		2
Nöraminidaz spesifik antikor üreten hibrit sayısı	-	26	-	-	-

- Son iki füzyonda (IV. ve V. füzyonlar) füzyon veriminin düşük kaldığı görülmüştür. Ancak, hibrit hücrelerin varlığına rağmen, ilerleyen dönemlerde hücre kültüründe başlayan *Pastorella sp.* kökenli kontaminasyon nedeni ile hücreler kaybedilmiştir. Bu süreçte çapraz reaksiyon vermeyen 2 yeni hibrit hücresi tespit edilmiştir. Ancak alt tiplendirme çalışmaları sırasında IgM tipi antikor ürettiği görülen hibritler kontaminasyon sebebi ile çoğaltılamamış ve füzyon çalışmaları sonlandırılmıştır.

4.5. Çapraz (Kross) Reaksiyon Analizi

Çapraz reaksiyon analizleri, aynı anda çok sayıda hibrit adayı varlığından dolayı ön analiz ve detaylı analizler olarak gruplar halinde gerçekleştirilmiştir. Tüm detaylı analizler, hibrit hücre üst sıvılarının aynı hazır olmayışı, üst sıvıların uzun süreli depolanması ve/veya dondurup çözülmesininse antikor etkinliği üzerine olumsuz etki yapması nedeni ile tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. BSA'nın bloklayıcı ajan olarak kullanıldığı analizlerin temsili sonuçları Tablo 4.2'de, tekrarlı analizlerin sonuçlarının toplu değerlendirmeleri ise Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Yalnızca BSA ve süt tozunu içeren çapraz reaksiyon ön analizlerinde öne çıkan 32 hibrit adayından en iyi adayların belirlenebilmesi amacı ile farklı tarihlerde gerçekleştirilen detaylı çapraz reaksiyon analizleri birleştirilmiş ve Tablo 4.3 olarak sunulmuştur. Buna göre 22 hibrit adayı BSA bloklamasında diğer antijenlere karşı düşük sinyal üretirken, nöraminidaza karşı yüksek sinyal üretmiş ve başarılı kabul edilmiştir. Adayların ürettiği nöraminidaz sinyali kuvveti bir, iki ve üç yıldız (*) ile simgelenmiştir. Hibrit adaylarından 9'u, nöraminidaz haricinde en az bir antijene daha kuvvetli sinyal üretmesi sebebi ile başarısız kabul edilmiştir. Son olarak, 1 hibrit adayı hakkında ise, gerçekleştirilen testlerde hazır olmamaları nedeni ile kullanılamamaları (veri yok yazılı hücreler), kullanıldıkları durumlarda ise zayıf veya çelişen sonuçlar üretmeleri nedeni ile genel kaniya varılamamıştır. Bu hibrit hücreler, çalışmanın ilerleyen kısımlarında ek çapraz reaksiyon analizleri ve değerlendirmeleri ile sandviç ELISA performanslarına göre yeniden değerlendirilmiş ve gerçekleştirilen uygulamaya göre kullanılabilirliklerine karar verilmiştir.

Tablo 4.2. Örneklere ait, %0,5 BSA bloklaması ve yeni hazırlanmış antijenler kullanılarak gerçekleştirilen, 3. detaylı çapraz reaksiyon analizi sonuçları ((Pozitif kontroller: Sino mAb – Sino monoklonal antikoru (Sino 11680-MM04) 1:100 ve 1:1000 sulandırılmaları). Antijenler: NA – Nöraminidaz. Süt – Süt Tozu. AT – Apotransferrin. γ G – Gama globülin. Tr – Trombin. Fb – Fibrinojen. Pl – Plazminojen.).

Örneklere Ait Çapraz Reaksiyon Analizi Sonuçları (OD ₄₀₅)								
Örnek	NA	BSA	Süt	AT	γ G	Tr	Fb	Pl
<i>Sino mAb 1:100</i>	0,1181	0,123	0,1184	0,1371	0,1618	0,1539	0,1496	0,1565
<i>Sino mAb 1:1000</i>	0,111	0,1004	0,1162	0,1243	0,1294	0,1207	0,111	0,1152
<i>1D10 HT</i>	1,7385	0,0966	0,1001	0,1028	0,1149	0,1571	0,1113	0,1114
<i>2H8 HT</i>	1,6514	0,403	0,4207	0,4664	0,449	0,4603	0,4721	0,4203
<i>5A9 BMB</i>	1,6458	0,2815	0,3163	0,3394	0,3344	0,3225	0,3239	0,2587
<i>4A12 HT</i>	1,4308	0,3146	0,3575	0,395	0,3687	0,3726	0,3841	0,339
<i>4D7 BMB</i>	0,5379	0,1136	0,1149	0,1537	0,1462	0,1433	0,1231	0,131
<i>1C7</i>	2,394	0,2156	0,2901	0,2922	0,3576	0,2142	0,2283	0,2154
<i>5A9</i>	2,2874	0,5458	0,5196	0,6628	0,4702	0,7335	0,6052	0,5322
<i>1C6</i>	2,2243	0,2368	0,2658	0,3236	0,3041	0,3009	0,3126	0,4322
<i>5E12</i>	2,124	0,4654	0,4032	0,4637	0,4938	0,4553	0,4521	0,3732
<i>3C5</i>	2,0841	0,4848	0,4142	0,4366	0,3441	0,3733	0,3724	0,3249
<i>3H10</i>	2,0764	0,3945	0,5153	0,5011	0,4795	0,4379	0,4297	0,3889
<i>1A5</i>	2,0721	0,2542	0,2487	0,2808	0,213	0,2613	0,2441	0,2257
<i>1C3</i>	2,0668	0,2737	0,2321	0,3008	0,2764	0,283	0,2768	0,2097
<i>1C8</i>	2,0544	0,1906	0,168	0,3751	0,2176	0,2499	0,3355	0,176
<i>1B1</i>	2,0525	0,7029	0,5252	0,2724	0,2164	0,2187	0,4122	0,3757
<i>1B4</i>	1,9882	0,2166	0,223	0,2587	0,2206	0,2339	0,2599	0,2369
<i>1G5</i>	1,8988	0,1707	1,0578	0,5603	0,637	0,8202	0,678	0,6869
<i>1A4</i>	1,8919	0,209	0,2046	0,2334	0,186	0,2341	0,1966	0,2206
<i>6D1</i>	1,6842	0,2326	0,2464	0,3151	0,2581	0,2456	0,2349	0,2463
<i>1C9</i>	1,675	0,1948	0,1345	0,1523	0,1852	0,3378	0,1611	0,2259
<i>2B12</i>	1,6446	0,6264	0,7665	0,3077	0,5304	0,56	0,8419	0,6841
<i>2C8</i>	1,6391	0,6897	0,7167	0,9294	0,806	0,5314	0,7444	0,6934
<i>3C2</i>	1,6126	0,2416	0,2482	0,3233	0,2625	0,2775	0,272	0,4065
<i>1D2</i>	1,4784	0,213	0,2268	0,2756	0,2709	0,2807	0,2731	0,2695
<i>1G4</i>	1,4332	0,1913	0,1872	0,2176	0,4597	0,536	0,9568	0,284
<i>1B9</i>	1,3691	0,2441	0,2375	0,2484	0,2566	0,2557	0,361	0,2429
<i>1F7</i>	1,2282	0,1964	0,2165	0,2414	0,2363	0,262	0,2932	0,3652
<i>3B12</i>	1,2029	0,1753	0,7657	0,2385	0,4394	0,3046	0,42	0,244
<i>1B6</i>	1,1312	0,1804	0,1846	0,4199	0,1764	0,2142	0,1943	0,1943
<i>1C10</i>	1,0231	0,1606	0,3348	0,1872	0,1916	0,189	0,2226	0,232
<i>1D11</i>	0,9212	0,1535	0,1572	0,2059	0,1736	0,1722	0,1922	0,3221
<i>1D12</i>	0,8756	0,1276	0,137	0,1724	0,1584	0,1687	0,1799	0,2431
<i>2E5</i>	0,8593	0,3345	0,8392	0,1694	0,9382	0,6589	0,1868	0,2666
<i>1F9</i>	0,7654	0,1621	0,149	0,1891	0,2139	0,23	0,2552	0,516
<i>1D1</i>	0,6999	0,1425	0,4374	0,1787	0,5358	0,1706	0,1793	0,191
<i>PBS</i>	0,1922	0,1353	0,1127	0,1218	0,1276	0,1291	0,1443	0,2379

Tablo 4.3. Tüm dönemlerde, %0,5 BSA bloklaması kullanarak gerçekleştirilen, çapraz reaksiyon analizlerinin toplu değerlendirilmesi. Hücrelerde çapraz reaksiyonu belirtilen antijenler; SütT – Süt Tozu. AT – Apotransferrin. γ G – Gama globülin. Tr – Trombin. Fb – Fibrinojen. Pl – Plazminojen.).

<i>Çapraz Reaksiyon Analizi - BSA Bloklaması ile</i>					
<i>Hibrit</i>	NA-BSA-SütT Ön Denemeleri	1. Çapraz Reaksiyon	2. Çapraz Reaksiyon	3. Çapraz Reaksiyon	BSA Genel Değerlendirme
1A4	***	***	***	***	Başarılı
1A5	***	***, γ G, Tr, Fb	***	***	Başarılı
1B1	***	***, SütT, Tr, Fb, Pl	***	**, BSA, SütT	X
1B4	***	**, BSA, SütT	***	***	Başarılı
1B6	***	*, BSA	**, BSA	**, AT	Başarılı
1B9	***	***, SütT, AT	o	***	Başarılı
1C3	***	***	***	***	Başarılı
1C6	***	***	***	***	Başarılı
1C7	***	***	***	***	Başarılı
1C8	***	***	***	***	Başarılı
1C9	***	*	***	***	Başarılı
1C10	***	*	***	***	Başarılı
1D1	***	***	o	***, γ G	Başarısız
1D2	***	***	***	***	Başarılı
1D11	***	**, Pl	o	***	Başarılı
1D12	***	**, AT	o	***	Başarılı
1E4	***	*	o	o	X
1F7	***	**, γ G	o	***	Başarılı
1F9	***	*	o	***, Pl	Başarılı
1G4	***, BSA, SütT	*, BSA, SütT, AT, Tr, Fb, Pl	***	**, Fb, γ G, Tr	X
1G5	***	***, Pl, BSA, Tr, Fb	***	***, AT, γ G, Tr, Fb, Pl	X
2B12	***	**	***	***, BSA, SütT, γ G, Tr, Fb, Pl	X
2C8	***	*	***	***, BSA, SütT, AT, γ G, Tr, Fb, Pl	X
2E5	***	***, SütT, γ G, Tr	o	**, SütT, γ G, Tr	X
3B12	***	*, γ G, Fb	o	***, SütT, γ G, Tr	X
3B6	***	*	o	o	Şüpheli
3C2	***	***	***	***	Başarılı
3C5	***	***	o	***	Başarılı
5A9	***	***	***	***	Başarılı
5E12	***	*	***	***	Başarılı
6D1	***	**	***	***	Başarılı
8F8	***	*	***	o	Başarılı
BSA'da Başarılı Hibrit Sayısı					22
BSA'da Başarısız Hibrit Sayısı					9
BSA'da Şüpheli Hibrit Sayısı					1
<i>Nöraminidaz Sinyali Seviyesi</i>			Zayıf (*)	İyi (**)	Güçlü (***)
<i>Veri yok</i>					o
<i>Başarısız</i>					X

Tanı kiti prototiplerinin geliştirilmesi sürecinde, BSA'nın yanı sıra, süt tozu bloklaması ile de çalışabilecek antikorların belirlenmesi prototip maliyetinin düşürülmesinde avantaj sağlamaktadır. Bu sebeple, süt tozunun bloklayıcı ajan olarak kullanımına olanak verecek antikorların bulunması da hedeflenmiş ve BSA bloklamasında gerçekleştirilen yürütülen çapraz reaksiyon analizi ve değerlendirmeleri adımları süt tozu bloklaması için de gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere ait temsili sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiş, tekrarlı analizlerin sonuçlarının toplu değerlendirmeleri ise Tablo 4.5'te aktarılmıştır.

Tablo 4.4'te sunulan, %0,5 süt tozu bloklaması ile elde edilmiş çapraz reaksiyon verilerinin yanı sıra, %1 süt tozu bloklaması ile gerçekleştirilmiş çapraz reaksiyon analizlerinin sonuçları, süt tozu bloklaması kullanımına uyumlu adayların da belirlenebilmesi amacı ile derlenmiş ve Tablo 4.5 olarak sunulmuştur. Buna göre 22 hibrit adayı süt tozu bloklamasında diğer antijenlere karşı düşük sinyal üretirken, nöraminidaza karşı yüksek sinyal üretmiş ve başarılı kabul edilmiştir. Adayların ürettiği nöraminidaz sinyali kuvveti bir, iki ve üç yıldız (*) ile simgelenmiştir. Hibrit adaylarından 8'i, nöraminidaz haricinde en az bir antijene daha kuvvetli sinyal üretmesi sebebi ile başarısız kabul edilmiştir. Son olarak, 2 hibrit adayı hakkında, gerçekleştirilen testlerde hazır olmamaları nedeni ile kullanılamamaları (veri yok yazılı hücreler), kullanıldıkları durumlarda ise zayıf veya çelişen sonuçlar üretmeleri nedeni ile genel kaniye varılamamıştır. Bu hibrit hücreler de, çalışmanın ilerleyen kısımlarında ek çapraz reaksiyon analizleri ve değerlendirmeleri ile sandviç ELISA performanslarına göre yeniden değerlendirilmiş ve gerçekleştirilen uygulamaya göre kullanılabilirliklerine karar verilmiştir.

Tablo 4.4. Örneklere ait, %0,5 süt tozu bloklaması ve yeni hazırlanmış antijenler kullanılarak gerçekleştirilen, 3. detaylı çapraz reaksiyon testi sonuçları ((Pozitif kontroller: Sino mAb 1:100 ve 1:1000 sulandırılmaları). Antijenler: NA – Nöraminidaz. Süt – Süt Tozu. AT – Apotransferrin. γ G – Gama globülin. Tr – Trombin. Fb – Fibrinojen. Pl – Plazminojen.).

Örneklere Ait Kross Analizi Sonuçları (OD ₄₀₅)								
Örnek	NA	BSA	Süt	AT	γ G	Tr	Fb	Pl
<i>Sino mAb 1:100</i>	0,4431	0,2683	0,2401	0,2645	0,2614	0,3153	0,3161	0,4787
<i>Sino mAb 1:1000</i>	0,369	0,1266	0,1306	0,2006	0,1286	0,1399	0,1516	0,2022
<i>1D10 HT</i>	2,3925	0,4799	0,1203	0,1792	0,1357	0,1548	0,1484	0,1423
<i>5A9 BMB</i>	0,9925	0,1992	0,2005	0,2288	0,2144	0,2161	0,2423	0,2286
<i>2H8 HT</i>	0,9502	0,2244	0,2795	0,2803	0,2644	0,2424	0,2734	0,2539
<i>4A12 HT</i>	0,7963	0,2063	0,2691	0,2657	0,2718	0,2525	0,2742	0,4181
<i>4D7 BMB</i>	0,4498	0,1797	0,3271	0,1444	0,1398	0,1417	0,1436	0,1488
<i>2B12</i>	1,4657	0,2342	0,3009	0,4614	0,2551	0,2761	0,2982	0,2629
<i>2C8</i>	1,3862	0,2718	0,257	0,2574	0,2162	0,2478	0,2948	0,2714
<i>1G5</i>	1,2969	0,2105	0,2353	0,2518	0,2135	0,2383	0,2617	0,2271
<i>1C6</i>	1,2868	0,261	0,3006	0,3151	0,2816	0,3034	0,3199	0,4374
<i>1F7</i>	1,2173	0,2585	0,3073	0,2992	0,2704	0,2786	0,3073	0,3522
<i>5E12</i>	1,1173	0,1852	0,1957	0,2389	0,1847	0,2043	0,2146	0,2042
<i>1C8</i>	1,1053	0,2077	0,2173	0,2214	0,2131	0,2293	0,2667	0,2784
<i>1C3</i>	1,0776	0,2159	0,2365	0,2557	0,2358	0,2596	0,2559	0,2559
<i>5A9</i>	1,0041	0,1799	0,1723	0,2018	0,166	0,1749	0,1869	0,1757
<i>1B1</i>	0,958	0,19	0,2035	0,2225	0,1868	0,1757	0,1824	0,1831
<i>3C5</i>	0,9214	0,212	0,2218	0,2436	0,232	0,2459	0,2709	0,2572
<i>1G4</i>	0,9112	0,2134	0,2015	0,2257	0,1902	0,2046	0,2042	0,2154
<i>1D2</i>	0,9031	0,1568	0,1753	0,1814	0,1753	0,1862	0,1983	0,2288
<i>1B4</i>	0,8773	0,1494	0,1563	0,1757	0,1526	0,1617	0,1736	0,1701
<i>1B9</i>	0,71	0,2227	0,2335	0,2107	0,2111	0,2221	0,2424	0,3006
<i>1C7</i>	0,6973	0,148	0,1611	0,1704	0,1577	0,1821	0,1873	0,2355
<i>1A5</i>	0,6912	0,1372	0,1396	0,1612	0,1513	0,1564	0,1493	0,1563
<i>1A4</i>	0,675	0,1897	0,1642	0,1581	0,1433	0,167	0,1676	0,1669
<i>1D12</i>	0,6539	0,1346	0,1663	0,1528	0,1421	0,1422	0,1502	0,184
<i>3B12</i>	0,6146	0,2584	0,6617	0,1866	0,2108	0,2437	0,2034	0,217
<i>1D11</i>	0,6023	0,1206	0,1287	0,1319	0,1323	0,1395	0,146	0,1706
<i>6D1</i>	0,556	0,1406	0,1213	0,1408	0,1236	0,1291	0,1312	0,1629
<i>1F9</i>	0,5465	0,1352	0,1527	0,1699	0,151	0,1539	0,1604	0,1807
<i>3C2</i>	0,5063	0,1769	0,1455	0,1697	0,2235	0,1687	0,1904	0,1701
<i>1D1</i>	0,4021	0,1731	0,1959	0,1723	0,177	0,1878	0,2156	0,1879
<i>2E5</i>	0,3569	0,199	0,2324	0,316	0,4133	0,3057	0,2175	0,2529
<i>1C10</i>	0,3459	0,1519	0,1636	0,1486	0,1496	0,1949	0,1729	0,1914
<i>1B6</i>	0,3087	0,1292	0,1365	0,1335	0,1355	0,1376	0,1412	0,152
<i>1C9</i>	0,2558	0,1241	0,1392	0,1414	0,1326	0,1447	0,1741	0,1637
<i>PBS</i>	0,1051	0,5698	0,1033	0,1016	0,1095	0,1549	0,2347	0,1177

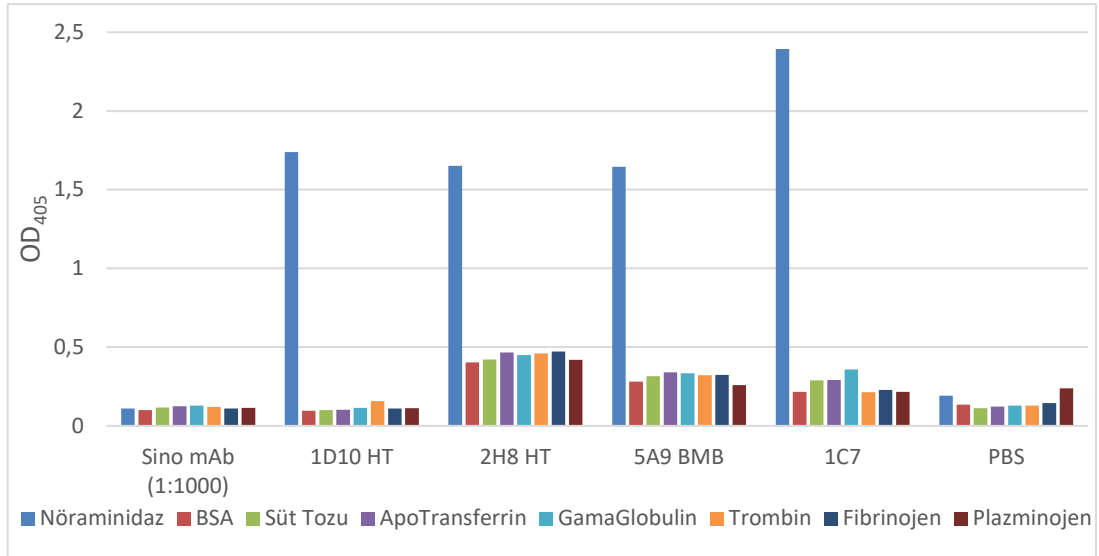
Tablo 4.5. Tüm dönemlerde, %0,5 süt tozu bloklaması kullanarak gerçekleştirilen, çapraz reaksiyon analizlerinin toplu değerlendirilmesi. Hücrelerde çapraz reaksiyonu belirtilen antijenler; SütT – Süt Tozu. AT – Apotransferrin. γ G – Gama globülin. Tr – Trombin. Fb – Fibrinojen. Pl – Plazminojen.).

<i>Çapraz Reaksiyon Analizi – Süt Tozu Bloklaması ile</i>				
<i>Hibrit</i>	1. Çapraz Reaksiyon Deneyi	2. Çapraz Reaksiyon Deneyi	3. Çapraz Reaksiyon Deneyi	Süt Tozu Genel Değerlendirme
<i>1A4</i>	X	**, Pl	**	X
<i>1A5</i>	X	**	**	Başarılı
<i>1B1</i>	*	**	***	Başarılı
<i>1B4</i>	*	***	***	Başarılı
<i>1B6</i>	X	**	*	X
<i>1B9</i>	*	***		Başarılı
<i>1C10</i>	*	***	*	Başarılı
<i>1C3</i>	X	***	***	Başarılı
<i>1C6</i>	X	***	***	Başarılı
<i>1C7</i>	*	***	**	Başarılı
<i>1C8</i>	X	**	***	Başarılı
<i>1C9</i>	X	*	*	X
<i>1D1</i>	*	*	*	X
<i>1D11</i>	X	***	**	Başarılı
<i>1D12</i>	*	*	**	Başarılı
<i>1D2</i>	*	***	***	Başarılı
<i>1E4</i>	X	o	o	X
<i>1F7</i>	*	o	***	Başarılı
<i>1F9</i>	X	o	**	Başarılı
<i>1G4</i>	X	***	***	Başarılı
<i>1G5</i>	*	***	***	Başarılı
<i>2B12</i>	*	***, Pl	***	X
<i>2C8</i>	X	*	***	Başarılı
<i>2E5</i>	*, γ G	o	*, BSA, SütT, AT, Tr, Fb, Pl	X
<i>3B12</i>	X	o	*, SütT	X
<i>3B6</i>	X	*	o	Şüpheli
<i>3C2</i>	X	***	*	Başarılı
<i>3C5</i>	X	o	***	Başarılı
<i>5A9</i>	***	***	***	Başarılı
<i>5E12</i>	X	**	***	Başarılı
<i>6D1</i>	*	**	**	Başarılı
<i>8F8</i>	X	*	o	Şüpheli
<i>Süt Tozunda Başarılı Hibrit Sayısı</i>				22
<i>Süt Tozunda Başarısız Hibrit Sayısı</i>				8
<i>Süt Tozunda Şüpheli Hibrit Sayısı</i>				2
<i>Nöraminidaz Sinyali Seviyesi</i>		Zayıf (*)	İyi (**)	Güçlü (***)
<i>Veri yok</i>				o
<i>Başarısız</i>				X

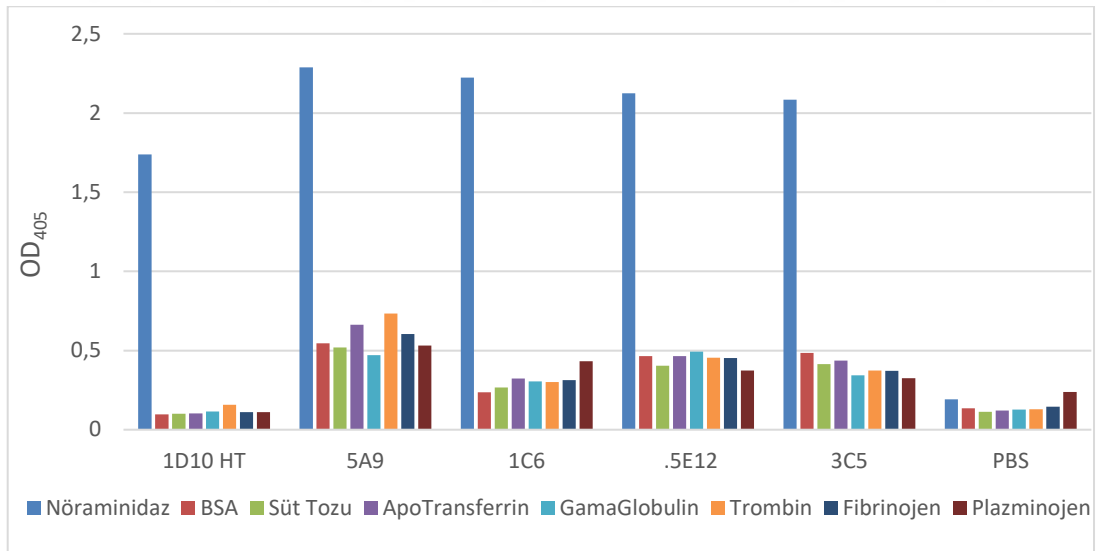
Oluşturulacak prototipte hem BSA'nın hem de süt tozunun bloklayıcı ajan olarak kullanılabileceği antikorların belirlenmesi amacı ile Tablo 4.3 ve Tablo 4.5 birlikte değerlendirilerek Tablo 4.6 oluşturulmuş ve her iki koşulda da çalışmaya uygun olan veya olmayan antikorlar tablonun “Toplu Değerlendirme” sütununda belirtilmiştir. Sonuç olarak, 19 adet hibrit hücresi hem BSA hem de süt tozu bloklamasında kabul edilebilir ölçüde çalışan antikor üretmektedir (Şekil 4.7 – Şekil 4.16). Ek olarak, 3 adet hibrit hücre yalnızca BSA bloklamasında çalışabilen antikorlar üretirken (Şekil 4.17), 4 adet hibrit hücresi ise yalnızca süt tozu bloklamasında iyi performans gösteren antikorlar üretebilmiştir (Şekil 4.18). Diğer 6 hibrit hücresi ise iki bloklamayı kullanan prototiplerde de kullanıma uygun değildir. Çok sayıdaki hibrit hücre varlığından dolayı antikor tiplendirme/alt tiplendirme çalışmalarında Isostrip kiti kullanımına dayanan yöntem yerine, ekonomik olan indirekt ELISA yöntemi ile antikorların tiplendirilmesi gerçekleştirilmiş ve tüm hücrelerin IgM tipi antikor ürettiği görülmüştür. Sonrasında, antikorların saflaştırılması ve diğer analizlerde kullanımları amacı ile tüm hücrelerden 50-500 ml kadar hücre kültürü üst sıvısı alınmış ve +4 °C’de depolanmıştır. Hücreler, tek düşürme işlemine tabi tutularak veya doğrudan çoğaltılarak dondurulmuştur. Tablo 4.6’da ek olarak bu hücrelere ait hücre kalitesi / depo bilgisi sunulmuştur. Yapılan çalışmalar sırasında, hücrelerin farklı çoğalma ve dayanım profili gösterdikleri gözlemlenmiştir. Dondurma/çözme işlemlerine dayanıklılık, çoğalma hızı, antikor üretimi kararlılığı gibi konularda olumsuz performans sergileyen hibritler “sorunlu” olarak nitelendirilmiştir. Prototip adayı olarak bu hücrelerin seçilmesi halinde, ileri aşamalara geçilmeden önce iyileştirici çalışmalar yapılması gerekeceği öngörülmüştür. Belirtilen 19 hibrit hücresine ek olarak, tez çalışmaları paralelinde, çalışma grubunca geliştirilmiş diğer nöraminidaz üreten hibritler olan 1D10 HT - 2H8 HT - 5A9 BMB’ye ait sonuçlar da verilmiştir.

Tablo 4.6. Hibrit hücrelerince üretilen antikorların BSA ve süt tozu bloklamaları ile gerçekleştirilen çapraz reaksiyon analizi çalışmalarının toplu değerlendirilmesi, alt tipi ve dondurulmuş hücrelerin kalite durumu bilgisi.

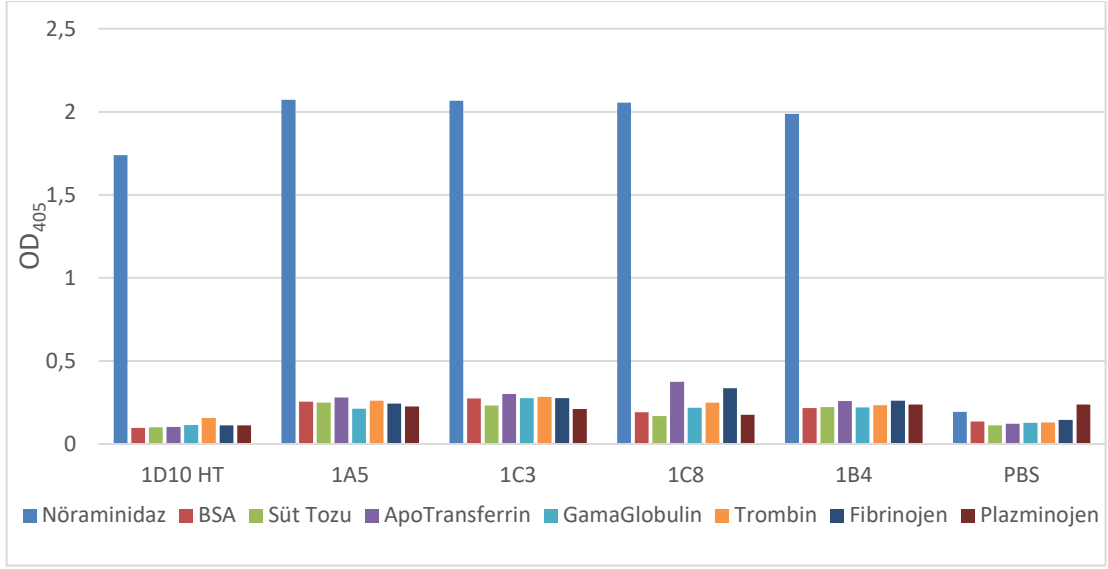
Çapraz Reaksiyonlar - Toplu Değerlendirme				Durumu	
Hibrit	BSA Genel Değerlendirme	Süt Tozu Genel Değerlendirme	Toplu Değerlendirme	Antikor Tipi	Kaliteli/Tek Düşürülmüş Hücre
1A4	✓	X	Başarısız	IgM	Var-TD
1A5	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1B1	X	✓	Başarısız	IgM	Var
1B4	✓	✓	Başarılı	IgM	Var
1B6	✓	X	Başarısız	IgM	Sorunlu
1B9	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1C10	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1C3	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1C6	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1C7	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1C8	✓	✓	Başarılı	IgM	Sorunlu
1C9	✓	X	Başarısız	IgM	Var-TD
1D1	X	X	Başarısız	IgM	Sorunlu
1D11	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1D12	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1D2	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1E4	X	X	Başarısız	IgM	Var-TD
1F7	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
1F9	✓	✓	Başarılı	IgM	Var
1G4	X	✓	Başarısız	IgM	Var-TD
1G5	X	✓	Başarısız	IgM	Var-TD
2B12	X	X	Başarısız	IgM	Var
2C8	X	✓	Başarısız	IgM	Sorunlu
2E5	X	X	Başarısız	IgM	Sorunlu
3B12	X	X	Başarısız	IgM	Var-TD
3B6	Şüpheli	Şüpheli	Başarısız	IgM	Sorunlu
3C2	✓	✓	Başarılı	IgM	Sorunlu
3C5	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
5A9	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
5E12	✓	✓	Başarılı	IgM	Var-TD
6D1	✓	✓	Başarılı	IgM	Sorunlu
8F8	✓	Şüpheli	Başarılı	IgM	Sorunlu
Toplu Değerlendirme Başarılı (✓) Örnek Sayısı				19	
Toplu Değerlendirme Başarısız (X) Örnek Sayısı				13	



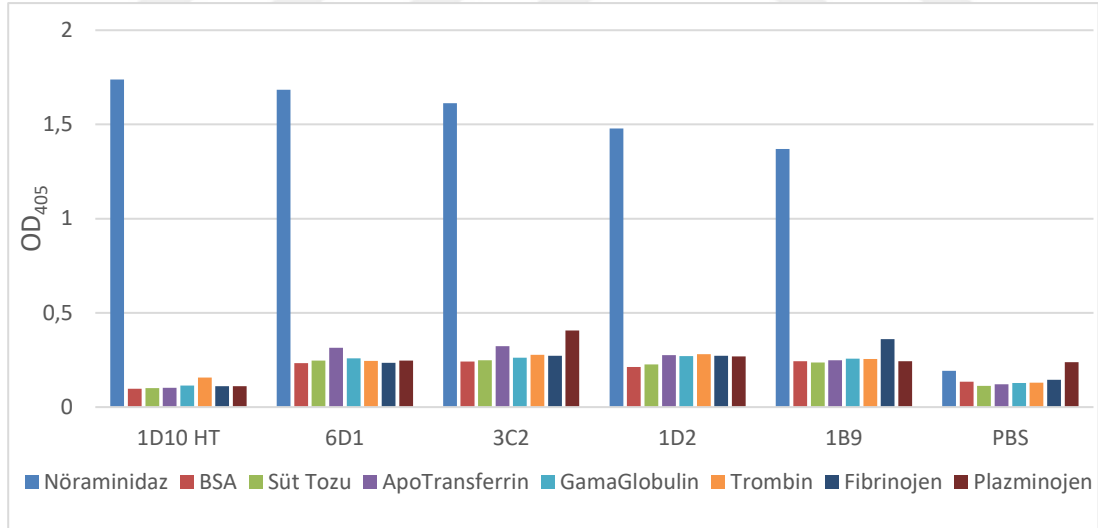
Şekil 4.7. Prototip adayı 1C7 ve bazı diğer örnekler için BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süz tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayı monoklonal antikordan 1C7 ve kontrol antikordlarına ait (Sino mAb, 1D10 HT, 2H8 HT, 5A9 BMB) %0,5 BSA bloklaması uygulanan 3. ELISA çapraz reaksiyon analiz sonucudur (Pozitif kontrol, Sino mAb. Negatif kontrol, PBS. Prototip aday örnek, 1C7. MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer aday antikordlar; 1D10 HT, 2H8 HT ve 5A9 BMB).



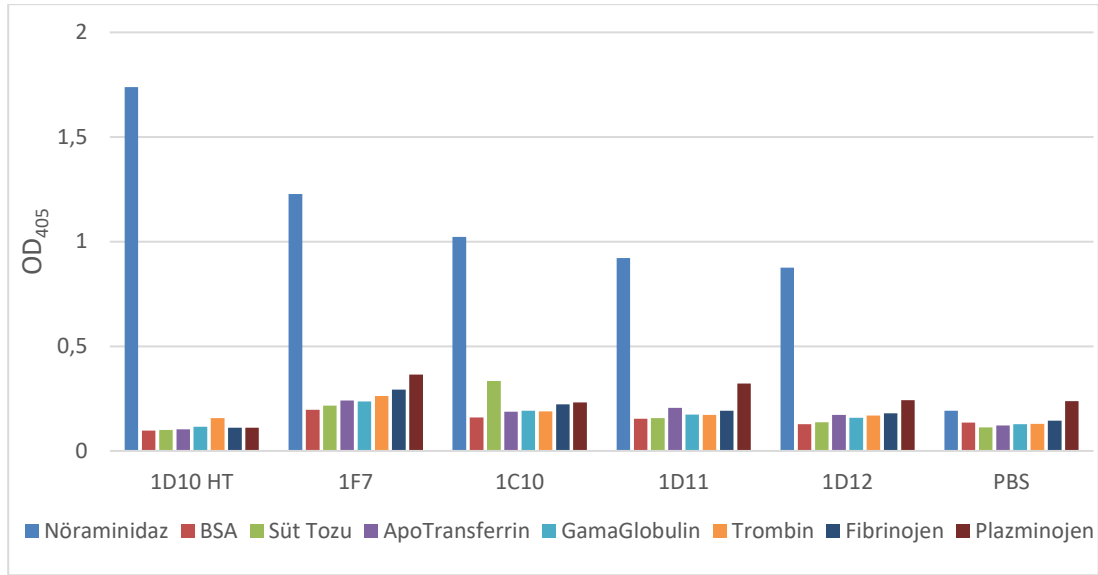
Şekil 4.8. Prototip adayları 5A9, 1C6, 5E12 ve 3C5'e ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süz tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayı monoklonal antikordan 5A9, 1C6, 5E12 ve 3C5 ile 1D10 HT'ye ait %0,5 BSA bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analiz sonucudur (PBS negatif kontrol, 1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).



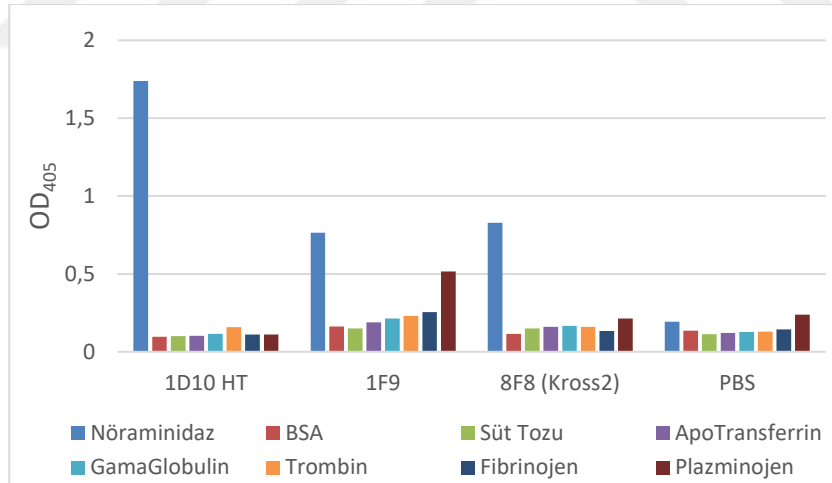
Şekil 4.9. Prototip adayları 1A5, 1C3, 1C8 ve 1B4'e ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süt tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayları monoklonal antikordan 1A5, 1C3, 1C8 ve 1B4 ile 1D10 HT'ye ait %0,5 BSA bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizinin sonucudur (PBS negatif kontrol, 1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).



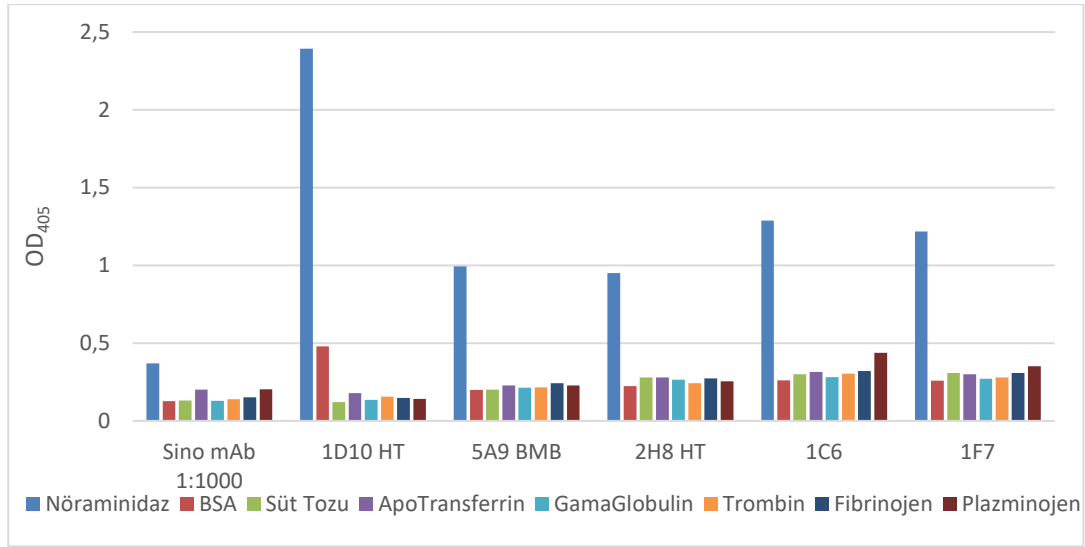
Şekil 4.10. Prototip adayları 6D1, 3C2, 1D2 ve 1B9'a ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süt tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayları monoklonal antikordan 6D1, 3C2, 1D2 ve 1B9 ile 1D10 HT'ye ait %0,5 BSA bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizinin sonucudur (PBS negatif kontrol, 1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).



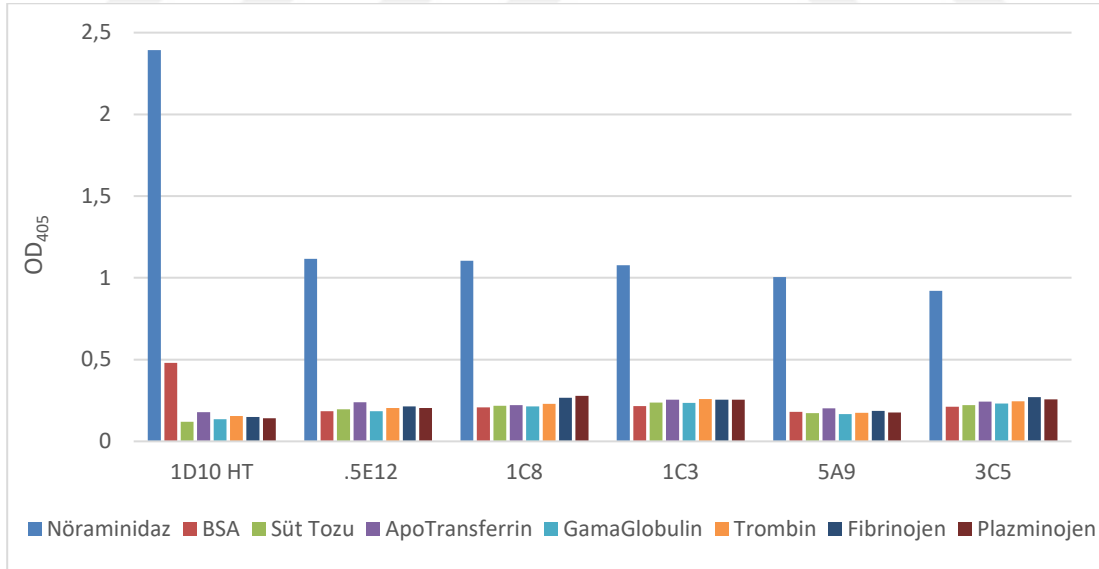
Şekil 4.11. Prototip aday 1F7, 1C10, 1D11 ve 1D12'ye ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süt tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip aday 1F7, 1C10, 1D11 ve 1D12 ile 1D10 HT'ye ait %0,5 BSA bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizinin sonucudur (PBS negatif kontrol, 1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).



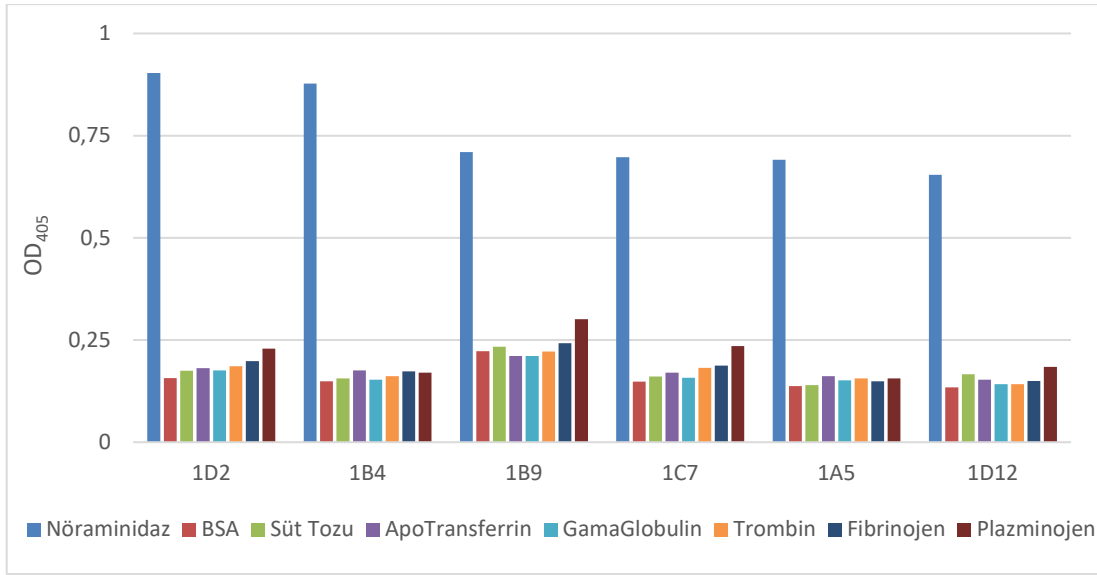
Şekil 4.12. Prototip aday 1F9 ve 8F8'e ait BSA bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süt tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip aday 1F9'a ait %0,5 BSA bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizi sonucu verilmiştir. 8F8 için ise, 3. çapraz reaksiyonda yer almadığı için 2. çapraz reaksiyon (kross 2) sonucu verilmiştir (PBS negatif kontrol, 1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).



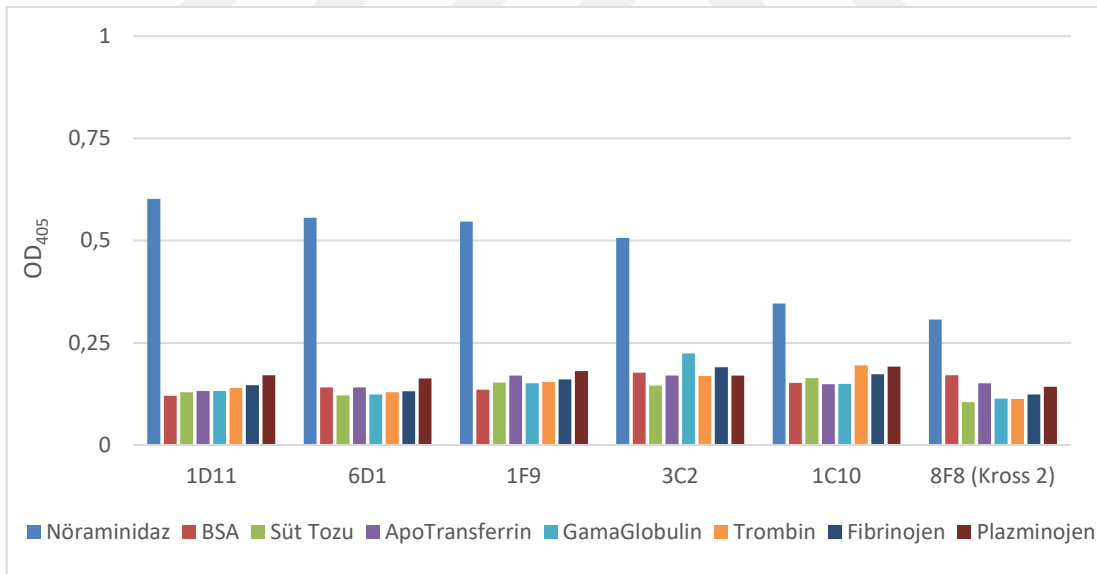
Şekil 4.13. Prototip adayı 1C6, 1C7 ve bazı diğer örneklere ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süz tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayı monoklonal antikordan 1C6, 1C7 ve kontrol antikollarına ait (Sino mAb, 1D10 HT, 5A9 BMB, 2H8 HT) %0,5 süt tozu bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizi sonucudur (Pozitif kontrol, Sino mAb. Prototip adayı örnek, 1C6 ve 1C7. MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer aday antikollar; 1D10 HT, 5A9 BMB ve 2H8 HT).



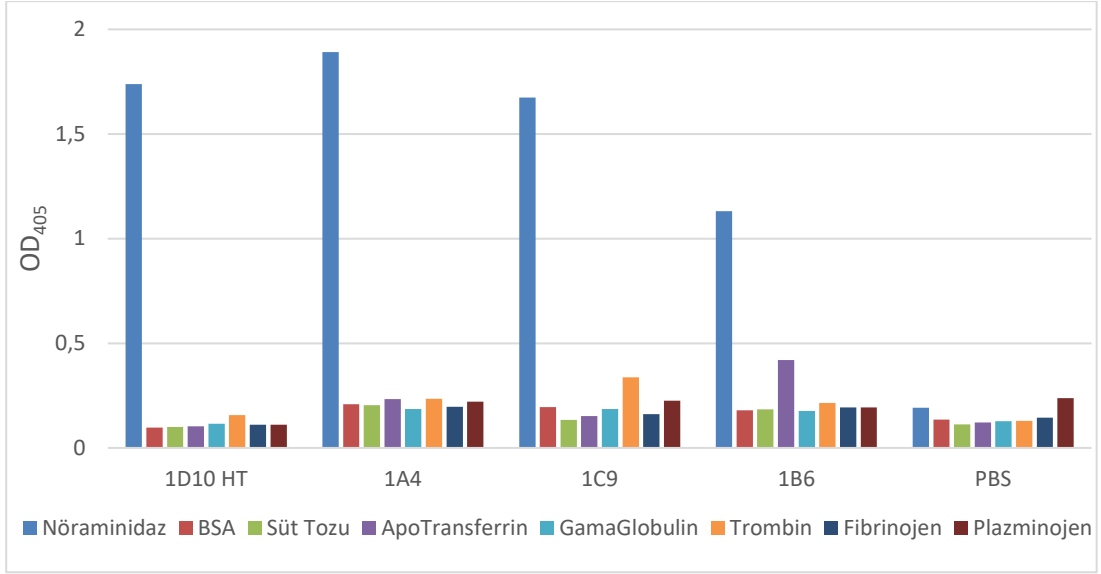
Şekil 4.14. Prototip adayı 5E12, 1C8, 1C3, 5A9 ve 3C5'e ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süz tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayı monoklonal antikordan 5E12, 1C8, 1C3, 5A9 ve 3C5'e ait %0,5 süt tozu bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizinin sonucudur (1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).



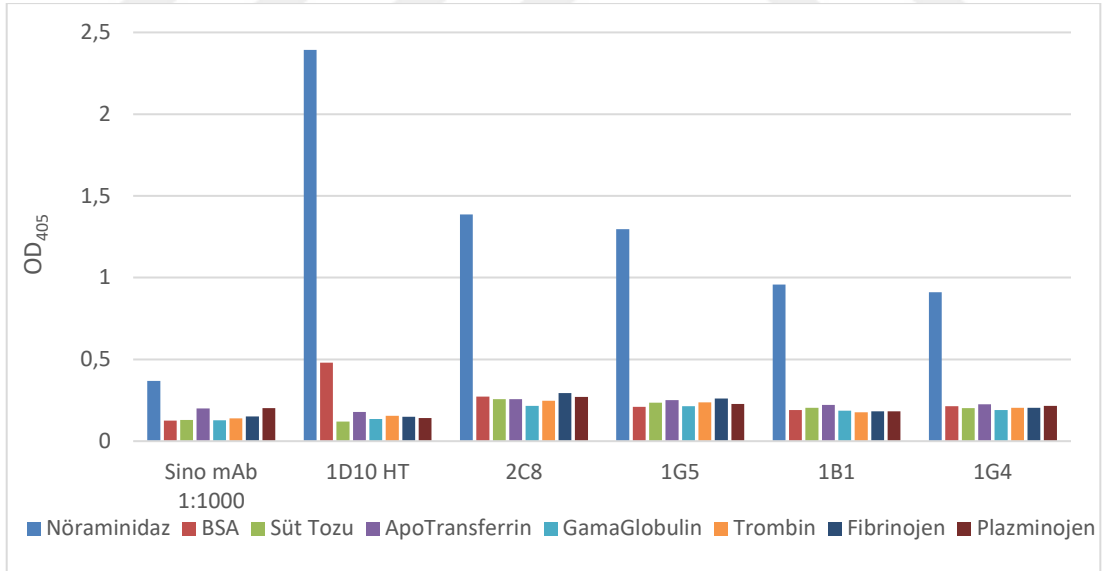
Şekil 4.15. Prototip adayı 1D2, 1B4, 1B9, 1C7, 1A5 ve 1D12'ye ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süt tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayı monoklonal antikordan 1D2, 1B4, 1B9, 1C7, 1A5 ve 1D12'ye ait %0,5 süt tozu bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizinin sonucudur.



Şekil 4.16. Prototip adayı 1D11, 6D1, 1F9, 3C2, 1C10 ve 8F8'e ait süt tozu bloklaması ile uygulanan çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süt tozu bloklaması ile çalışan 19 prototip adayı monoklonal antikordan 1D11, 6D1, 1F9, 3C2, 1C10'a %0,5 süt tozu bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizi sonucu verilmiştir. 8F8 için ise, 3. çapraz reaksiyonda yer almadığı için 2. çapraz reaksiyon (kross 2) sonucu verilmiştir.



Şekil 4.17. Yalnızca BSA bloklaması ile çalışan 1A4, 1C9 ve 1B6'ya ait çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süz tozu bloklamasından yalnızca BSA ile çalışabilen monoklonal antikorlar olan 1A4, 1C9 ve 1B6'ya ait %0,5 BSA bloklamasıyla gerçekleştirilen 3. ELISA çapraz reaksiyon analizinin sonucudur (PBS negatif kontrol, 1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).



Şekil 4.18. Yalnızca süt tozu bloklaması ile çalışan 2C8, 1G5, 1B1 ve 1G4'e ait çapraz reaksiyon sonucu. BSA ve süz tozu bloklamasından yalnızca süt tozu ile çalışabildiği gösterilen 2C8, 1G5, 1B1 ve 1G4 monoklonal antikorlarına ait %0,5 süt tozu bloklaması uygulanan 3. ELISA çapraz reaksiyon analizinin sonucudur (Sino mAb pozitif kontrol 1D10 HT ise MAKÜ-TTL tarafından üretilmiş diğer bir aday antikordur).

Bu sonuçlara göre:

- Sino Biological (China) firmasından temin edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan fare monoklonal antikoru, piyasada var olduğu bilinen tek *C. perfringens* monoklonal antikordur. 1:100 ve 1:1000 sulandırma oranlarında kullanılan bu antikor BSA bloklamasında çalışmamış, süt tozu bloklamasında ise zayıf sinyal üretmiştir. Sulandırma oranı 1:1000'den 1:100'e çıkarıldığında nöraminidaza karşı gelişen sinyal kayda değer değişim göstermemiş, ancak çapraz reaksiyon vermeye başlamıştır. Bu nedenle sonuç karşılaştırmaları sırasında yalnızca 1:1000 oranlı kullanımlar gösterilmiştir.

- Detaylı çapraz reaksiyonlarda hem BSA hem de süt tozu bloklaması uygulanarak test edilen 32 adaydan 26'sı nöraminidaza karşı yüksek, diğer antijenlere karşı ise düşük absorbans göstermiştir. Bunlardan 19'u her iki blokama çözeltisi ile de iyi performans gösterirken (Şekil 4.7-Şekil 4.16) 3'ü yalnızca BSA bloklaması ile çalışmış (Şekil 4.17), 4'ü ise yalnızca süt tozu bloklamasında çalışmıştır (Şekil 4.18).

- Çalışmalar sırasında geliştirilmiş birçok örnek, piyasadaki bu ticari nöraminidaz monoklonal antikorundan iyi performans göstermiştir.

- Hem BSA hem de mevcut süt tozu bloklamasında en yüksek absorbans değeri gösteren, düşük/kabul edilebilir çapraz reaksiyon değerlerine sahip 1C7, 5A9, 1C6, 5E12, 3C5, 1F7, 1C3, 1C8, 1B4, 1D2 hibrit hücreleri ve antikorumları sonraki çalışmalara aktarımda için ön adaylardır.

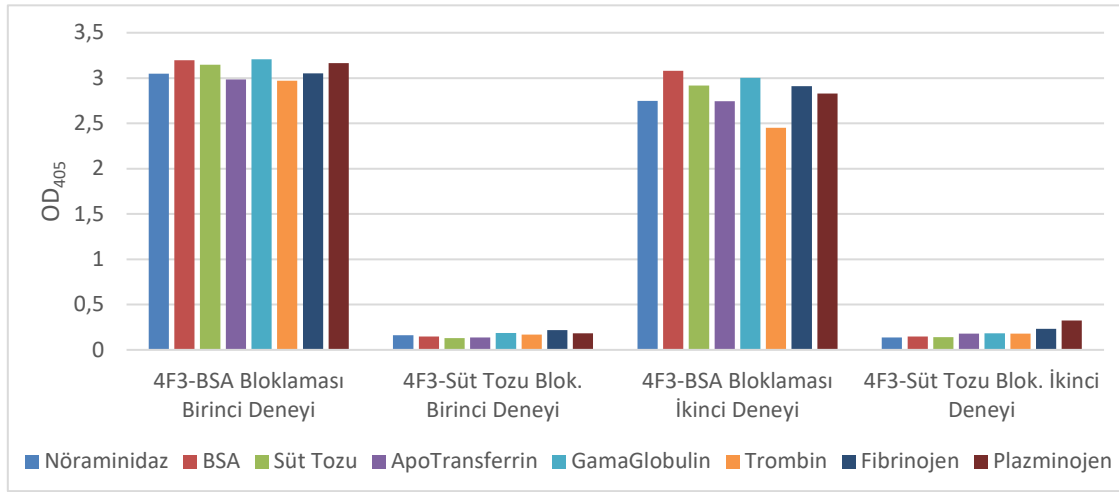
- 1C7, 5A9, 1C6, 5E12, 3C5, 1F7, 1C3, 1C8, 1B4, 1D2 hücrelerine ait Kross 3, Kross 1 ve geçmişte yapılan ön tarama analizlerinden elde edilen nöraminidaza özgü yanıtlar karşılaştırılmıştır. Buna göre, sırası ile, 5A9, 1C7, 1D2, 1F7, 1C3 ve 1C6'nın uzun süreli depolama ve dondurma çözme işlemi kaynaklı yanıt kayıpları daha düşüktür. Bunun aksine, 5E12 ise en fazla yanıt kaybeden hücre olmuştur. 1C8 ve 3C5 nispeten orta seviyede yanıt kaybına uğramış, 1B4'in ise depolama sonucu çapraz reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir.

- Buna göre 5A9, 1C7, 1D2, 1F7, 1C3 ve 1C6 uzun süreli depolamaya daha elverişli olan adaylar olarak seçilmiştir.

- 8F8 BSA bloklamasında kabul edilebilir sonuçlar vermiş, süt tozu uygulamasında ise istikrarsız/zayıf sonuçlar üretmiştir. Bu hibritten elde edilecek antikorumların süt tozu uygulaması için daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılması gerekeceği ön görülmektedir.

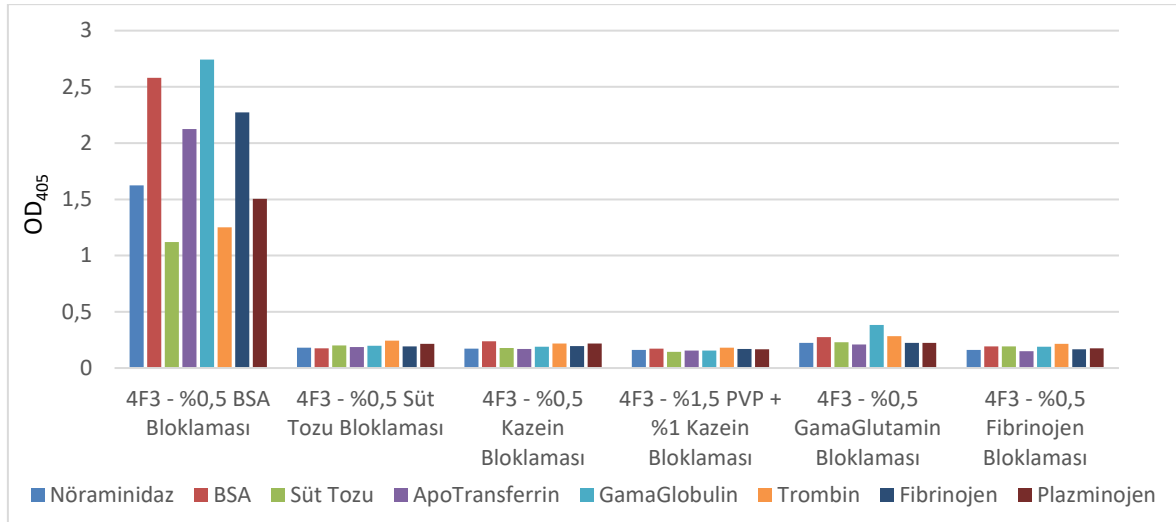
Ek olarak, nöraminidaza spesifik antikor üreten hibrit hücrelerinin yanı sıra çalışmalar sırasında bir adet, BSA'ya özgü antikor ürettiği öngörülen, 4F3 hibrit hücresi elde keşfedilmiştir. BSA, tanı kiti prototipi geliştirme çalışmalarında kullanılabilecek yüksek

saflıktaki, ucuz antijenlerdendir. Bu hücreye ait üst sıvılarla gerçekleştirilen iki ayrı çapraz reaksiyon deneyine ait sonuçlar Şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.19. 4F3 hibrit hücrelerine ait, BSA ve süt tozu bloklamaları ile gerçekleştirilmiş çapraz reaksiyon analizi sonuçları.

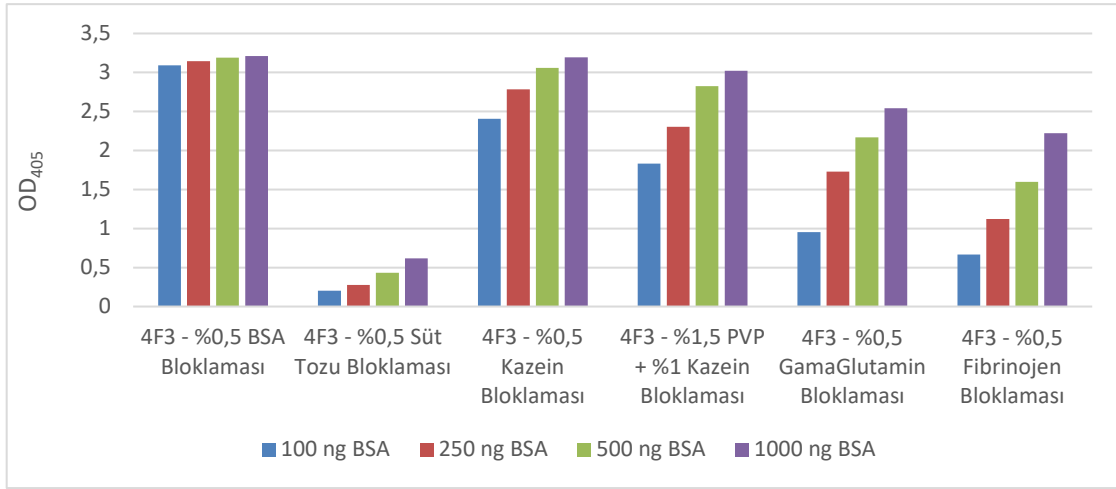
Sonuçlar, 4F3 hibrit hücrelerine ait üst sıvının yalnızca BSA bloklaması uygulanması halinde kuvvetli yanıt ürettiğini göstermektedir. Süt tozu kullanımında elde edilen sinyal, deneylerde negatif kontrol olarak kullanılan PBS sinyaline eşittir. Bu durum, 4F3 hibrit hücrelerince üretilen antikorun BSA’yı tanıdığını doğrular niteliktedir. Ancak, süt tozu uygulamalarında, BSA kaplanmış kuyulardan da sinyal alınamıyor oluşu 4F3-BSA etkileşiminin doza bağlılığını (200 µl, %0,5’lik BSA karışımı 1 µg BSA içerir) ve/veya 4F3’ün süt tozu bloklaması ile uyumsuz bir antikor olabileceğini düşündürmüştür. Bu belirsizliklerin ortadan kaldırılabilmesi için süt tozu bloklaması uygulanan kuyulara yüksek miktarda BSA kaplaması ve farklı bloklama çözeltileri kullanılarak BSA ile etkileşimin daha net ortaya konulabilmesi çalışmaları yürütülmüştür. 6 farklı bloklama çözeltisi ile gerçekleştirilen 4F3 çapraz reaksiyon analizine ait sonuçlar Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20. 4F3 hibrit hücrelerine ait, 6 farklı bloklama yöntemi kullanılarak elde edilmiş çapraz reaksiyon analizi sonuçları.

Buna göre, 4F3 üst sıvısının aslen bloklama çözeltisi olarak kullanılan BSA'ya yanıt verdiği görülmektedir. Ek olarak, kuyularda çapraz reaksiyon antijeni olarak BSA kullanıldığı durumlarda ise BSA'ya özgü yeterli yanıt alınmadığı, antikorun diğer antijenlere karşı da düşük çapraz reaksiyon gösterdiği görülmektedir.

BSA'nın bloklama çözeltisi olarak kullanıldığında görülen 4F3 yanıtının daha net ortaya konulabilmesi amacı ile kuyular artan miktarda BSA ile kaplanmış ve farklı bloklama çözeltileri uygulanarak test edilmiştir (Şekil 4.21). Bu sonuçlar, 4F3'ün BSA'ya karşı yanıt verdiğini doğrulamakta, verilen yanıt kuvvetinin ise kaplanan antijen miktarına bağlı olduğunu göstermektedir. Ek olarak, süt tozu uygulamasında en düşük antikor yanıtı alınmış olması, öngörüldüğü üzere süt tozunun antikorun afinitesi üzerindeki olumsuz etkisini de göstermektedir. İlginç bir şekilde, en ideal 4F3 yanıtı ise saflaştırılmış bir süt proteini olan kazeinin, %0,5'lik bloklama uygulamasında elde edilmiştir.



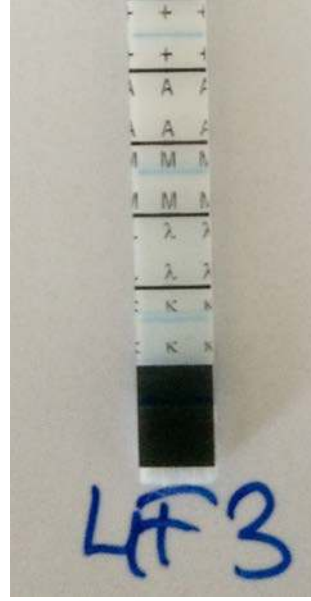
Şekil 4.21. 4F3 hibrit hücresinin, 6 farklı bloklama yöntemi kullanılarak elde edilmiş, artan miktardaki BSA'ya özgü yanıtını gösterir ELISA analizi sonuçları.

Sonuçlar, 4F3 ün bir BSA antikor olarak üretilebileceğini ve kullanılabileceğini göstermektedir. BSA'nın tanı kiti prototipi geliştirme çalışmalarında kullanılabilecek yüksek saflıktaki ürünlerine erişimi kolay, ucuz bir antijen olması da 4F3'ü kıymetli kılmaktadır. Roche IsoStrip kiti ile yapılan antikor alt tiplendirme çalışması, 4F3 antikorunun IgM alt tipine ait, kappa (κ) hafif zinciri taşıyan bir antikor olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.22).

4.6. Antikor Saflaştırma Çalışmaları

Çalışmalar sırasında kullanımına öncelik verilmesi planlanan antikorlar için saflaştırma çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen hibrit sayısının yüksek olması, IgM ve IgG afinite kolonlarının ise sınırlı sayıda olması nedenleri ile örneklerin öncelikle kısmi saflaştırmaları gerçekleştirilmiş ve elde ürünler deneylerde kullanılmıştır. Gerekli görülen adayların ise afinite kromatografisine dayalı saflaştırmaları gerçekleştirilmiştir. Birden fazla yapılan bu saflaştırma çalışmalarına ait temsili sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir.

Antikorların saflaştırılması amacıyla, 5A9 ve 1C6 hibritlerine ait üst sıvılarda kısmi saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, MAKÜ-TTL proje grubunca elde edilen, 1D10 HT kodu ile tanımlı hibrit hücrelerine ait IgG tipindeki antikorun, protein G afinite kromatografisine bağlı 3 ayrı saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.22. Roche IsoStrip kiti kullanılarak 4F3 hibrit hücrelerinin ürettiği antikor alt tipinin belirlenmesi. IgM ve κ bölgelerinde oluşmuş olan bantlar antikorum IgM alt sınıfından olduğunu ve hafif zincirinin κ gen bölgesi tarafından kodlandığını göstermektedir.

Tablo 4.7. Bradford yöntemi ile elde edilen, kısmi saflaştırma ve protein G kromatografisi işlemlerine ait sonuçlar.

Protein Miktarı (mg/ml)				
İnvitrogen pAb (5 mg/ml beklenen)		Kısmi saflaştırılmış 1C6 (250 ml'den)		Kısmi saflaştırılmış 5A9 (250 ml'den)
1,22		15,93		2,95
1. 1D10 HT (500 ml'den) Saflaştırması - Elüsyon Sonrası				
1. Tüp	<u>2. Tüp</u>	3. Tüp	4. Tüp	5. Tüp
0,12	<u>1,68</u>	0,39	0,10	0,01
2. 1D10 HT (500 ml'den) Saflaştırması - Elüsyon Sonrası				
1. Tüp	<u>2. Tüp</u>	3. Tüp	4. Tüp	5. Tüp
0,13	<u>1,62</u>	0,21	0,05	-0,03
3. 1D10 HT (500 ml'den) Saflaştırması - Elüsyon Sonrası				
1. Tüp	<u>2. Tüp</u>	3. Tüp	4. Tüp	5. Tüp
-0,05	<u>1,46</u>	-0,06	-0,01	-0,07

Buna göre,

- Tüm örnekler UV spektrofotometresi ile de analiz edilmiştir. Ancak, hassasiyet düşüklüğünün yanı sıra, elde edilen sonuçların hem pozitif kontroller hem de örnekler için,

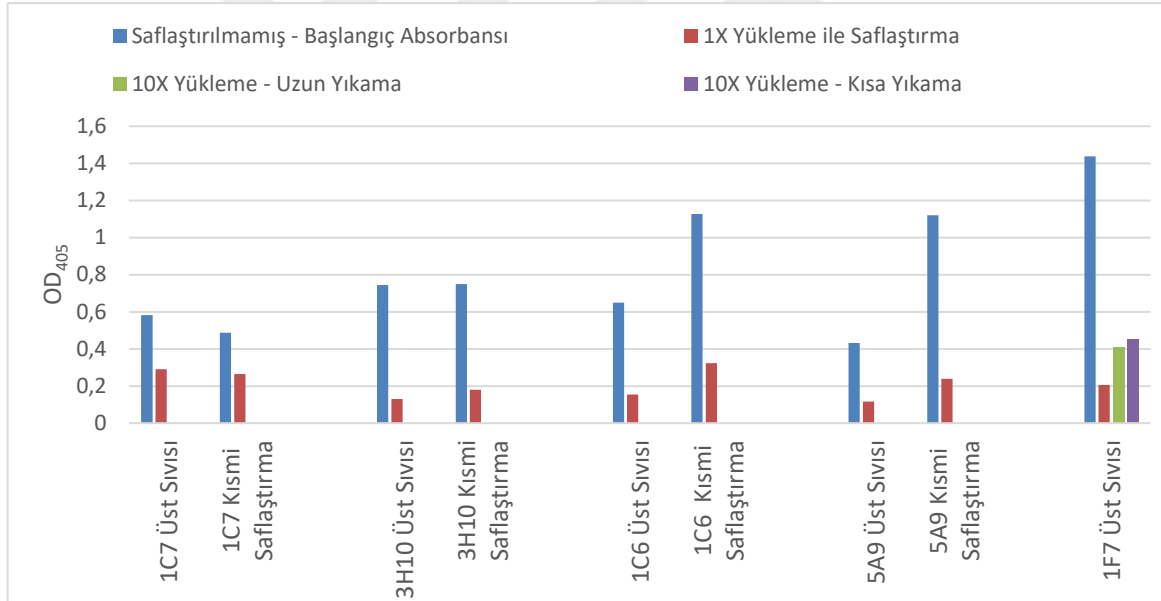
Bradford yöntemine nazaran yaklaşık %50-70 oranında daha düşük görüldüğü tespit edilmiştir. Bu sebeple, ilerleyen dönemlerde UV spektrofotometresi, yalnızca antikor içeren saflaştırma fraksiyonlarının hızlı tespitinde kullanılmıştır.

- Ticari olarak İnvitrogen firmasından temin edilen poliklonal tavşan IgG antikorunda tespit edilen protein miktarı, ürün etiketinde belirtilen 5 mg/ml'den çok daha düşüktür.
- Yapılan indirekt ELISA çalışmalarında ~250 ml başlangıç hacmi ile gerçekleştirilen üst sıvı kısmi saflaştırma işlemi ürünlerinin başlangıç üst sıvı hacmi veya daha yüksek seviyelere sulandırılabilirdiği ve sinyal kaybı olmaksızın kullanılabildiği görülmüştür.
- Bazı örneklerde, saflaştırmaların kısmi olması ve muhtemelen tüm besiyeri protein içeriğinin de yoğunlaştırılmış olması nedeni ile, beklenmedik çapraz reaksiyonlar gözlemlenmiştir. Bu sebeple, elde edilen kısmi saflaştırma ürünleri, enzim veya biyotin ile işaretleme çalışmalarında kullanılmamıştır. Bu örneklerle gerçekleştirilen sandviç ELISA denemelerinde ise zaman zaman yanlış pozitif sonuçlar görülmüştür.
- Saflaştırma sonrası, her 500 ml 1D10 HT üst sıvısından yaklaşık ~1,7 mg antikor edilmiştir. Antikorca en yoğun tüpün, 2 numaralı tüp olduğu ve yaklaşık 1,6 mg/ml konsantrasyonunda antikor bulundurduğu görülmüştür.
- Yapılan indirekt ELISA'larda, saflaştırılmamış üst sıvı ile karşılaştırıldığında, 2 numaralı tüplere denk gelen 1,6 mg/ml'lik 1D10 HT örnekleri, sinyal kaybı olmaksızın 1:10000'e kadar sulandırılabilmiştir. Kısmi saflaştırılan örneklerde görülen çapraz reaksiyon artışı bu örnekte ise görülmemiştir.
- Saflaştırılan 1D10 HT ürünleri, biyotinle işaretlenmiş ve sandviç ELISA çalışmalarında başarı ile kullanılmıştır.

IgM tipindeki antikorların saflaştırılması için IgM afinite kromatografisinden yararlanılan küçük hacimli spin kolonlar ve büyük hacimli afinite kolonları üreticinin protokolüne uygun şekilde kullanılmıştır. Saflaştırma etkinliğinin karşılaştırılması amacı ile yapılmış olan indirekt ELISA analizlerinin sonucu Tablo 4.8 ve Şekil 4.23'te verilmiştir.

Tablo 4.8. Saflaştırılan IgM örneklerinin, saflaştırma öncesi üst sıvıları ve sonrasındaki ürünlerinin indirekt ELISA ile analizi sonuçları.

Örnek	Saflaştırma Öncesi Başlangıç OD ₄₀₅ Değeri	Saflaştırılmış Ürün OD ₄₀₅ Değeri
1C7	0,58215	0,2902
1C7 Kısmi Saflaştırılmış	0,4865	0,26535
3H10	0,7441	0,12965
3H10 Kısmi Saflaştırılmış	0,75015	0,18025
1C6	0,64885	0,1551
1C6 Kısmi Saflaştırılmış	1,1271	0,32405
5A9	0,4319	0,1166
5A9 Kısmi Saflaştırılmış	1,11975	0,23945
1F7 - Klasik 1 Geçiş	1,4377	0,20585
1F7 - 10 Geçiş (10 tam deney/yıkama döngüsü sonucu elüsyon)	1,4377	0,4106
1F7 - 10 Geçiş (10 örnek yükleme tek deney/yıkama döngüsü sonucu elüsyon)	1,4377	0,4494



Şekil 4.23. Saflaştırılan IgM örneklerinin, saflaştırma öncesi üst sıvıları ve sonrasındaki ürünlerinin indirekt ELISA ile analizi sonuçlarının grafik görünümü.

- Buna göre, saflaştırma ürünlerine ait ELISA sinyali, genel olarak saflaştırılmamış örneklerin çok gerisinde kalmıştır. Kısmi saflaştırma örneklerinin kullanımı veya spin kolona, aynı örneğe ait üst sıvı yükleme ve yıkama işlemi birden fazla kez yapılması kısmi iyileşme sağlamasına rağmen elde edilen iyileşme yetersizdir. Ek olarak, UV spektrofotometre yöntemi ile saflaştırılan ürün miktarı hesaplanmaya çalışılmış, ancak sinyal zayıflığı nedeni

ile başarısız olunmuştur. Bu sebeple örneklere ait Bradford analizi de gerçekleştirilmemiştir. Bu sebeplerle, spin kolon kullanımına dayanan saflaştırma kiti genel olarak başarısız kabul edilmiştir.

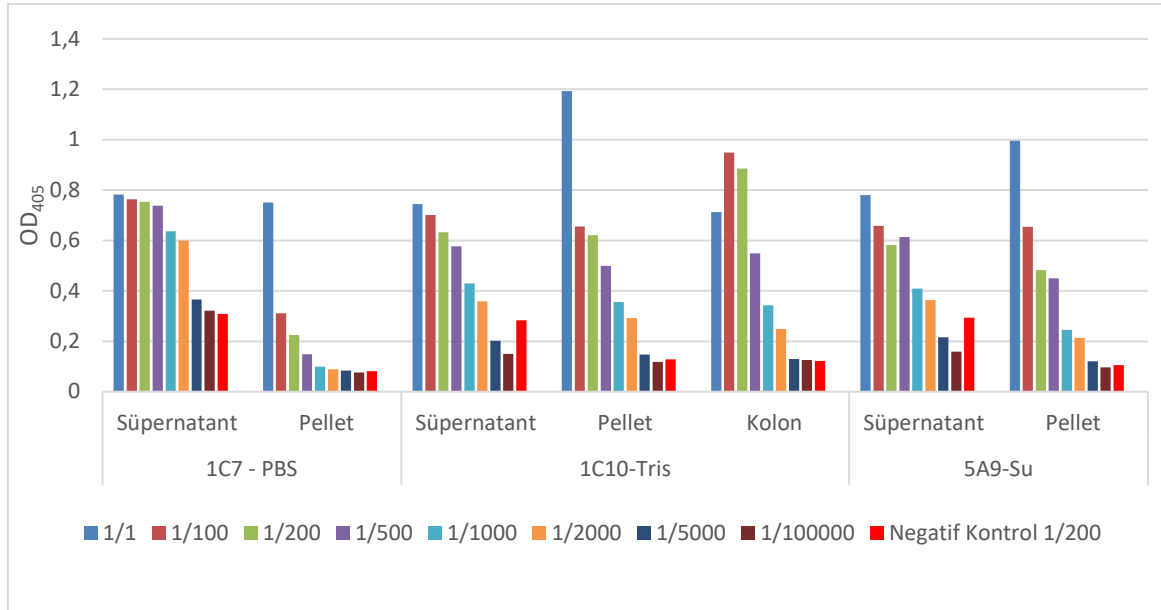
Sonraki denemelerde kısmi saflaştırma uygulamalarında elde edilen ürünün saflığının artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, kısmi saflaştırma sırasında uygulanan PBS'e karşı diyaliz işleminin yanı sıra, daha yüksek saflıkta ürün elde edilebileceği öngörülen Tris tamponuna karşı diyaliz ve dH₂O'ya karşı diyaliz işlemleri uygulanmıştır (Josic ve Lim, 2001; Berth ve Delanghe, 2004). Öglobin çöktürmesi olarak da adlandırılan, PBS ile yapılan saflaştırmanın alternatifi olan bu iki yaklaşım, yüksek boyutlu bir molekül olan IgM'nin (~900 kDa) PBS'e nazaran daha düşük tuz konsantrasyonundaki 20 mM Tris ve dH₂O ile daha iyi çöktürülebileceğini hedeflemektedir. Tris uygulamasının ise, IgM'nin dH₂O ile diyalizine nazaran çözünürlüğü daha yüksek ancak saflığı daha düşük ürün verebileceği öngörülmüştür.

İlgili saflaştırma denemelerinde, sandviç ELISA'larda umut vadeden ve saflaştırmanın ilgili sandviç ELISA sinyallerini kuvvetlendireceği düşünülen 1C7, 1C10 ve 5A9 hibritleri kullanıldı. Diyaliz sonrası gerçekleştirilen çöktürmedeki hem pellet hem de süpernatant ürünleri ayrı ayrı değerlendirildi. Ek olarak, 1C10 üst sıvısı ile gerçekleştirilen Tris saflaştırmasına ait pellet ürünü, ticari IgM afinite kolonuna (LigaTrap LT-145) uygulanarak elde edilen ürünün ileri saflaştırılabilirliği denendi. Tüm saflaştırma ürünlerinin sulandırılmaları gerçekleştirilerek, elde edilen ürünler indirekt ELISA ile test edildi (Şekil 4.24).

Buna göre, her bir antikora ait süpernatant ve pellet sonuçları karşılaştırıldığında:

- Her üç uygulamada da hem süpernatantta hem de pellette antikor yanıtının var olduğu görülmüştür. Pellete etkin bir antikor çöktürmesi sağlanamamıştır.
- 1C7'nin süpernatant ve pelleti karşılaştırıldığında, pellete geçen antikor miktarının düşük olduğu ve sulandırmalarda hızlı yanıt kaybının bu sebeple gerçekleştiği düşünülmüştür.
- 1C10'un süpernatant ve pelleti karşılaştırıldığında, pellette daha yüksek antikor yanıtı elde edildiği görülmektedir. Sulandırmalarda ise yanıt en azından süpernatanta benzeyen bir düşüş göstermiştir.
- 5A9'un süpernatant ve pelleti karşılaştırıldığında, yine pellette süpernatanta nazaran daha yüksek antikor yanıtı elde edildiği görülmektedir. Sulandırmalarda ise yanıt en azından süpernatanta benzeyen bir düşüş göstermiştir. Bu sonuçlara göre, Tris ve dH₂O'ya karşı

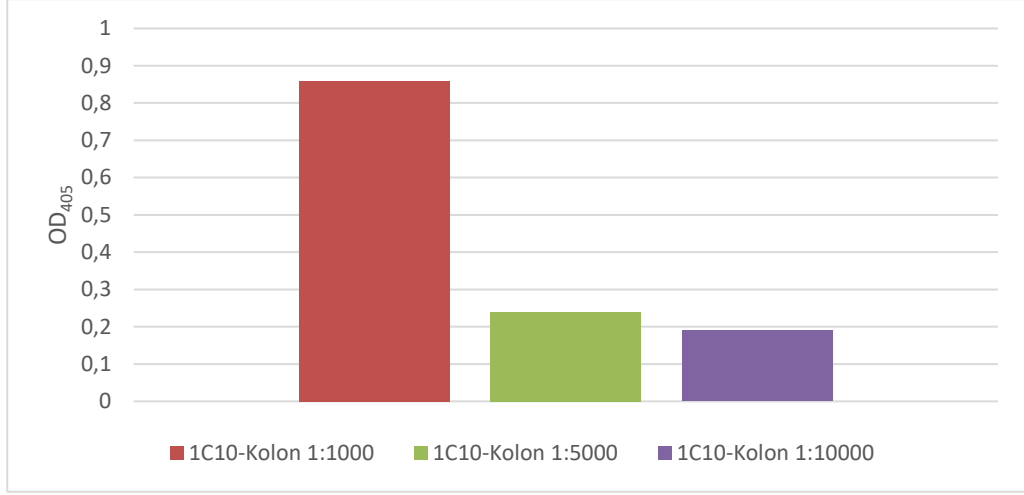
gerçekleştirilen diyaliz işlemini PBS'e nazaran daha üstün antikor yanıtı ürünler sağlayabilir.



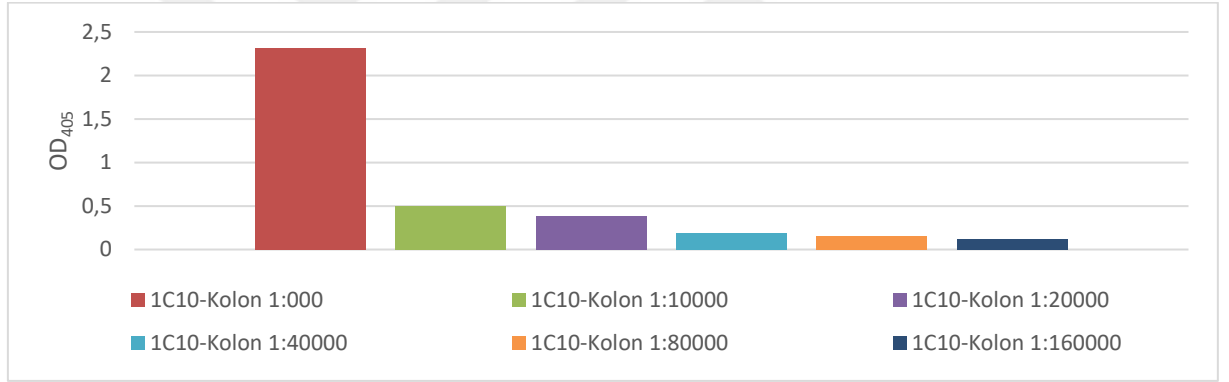
Şekil 4.24. Farklı saflaştırma uygulamaları ve ürünlerin dilüsyonuna dair indirekt ELISA sonuçları. Anti IgM sekonder antikor 1:10000 oranında kullanılmıştır.

- 1C10 kısmi saflaştırmasından elde edilen pelletle gerçekleştirilen kolon saflaştırması başarılı olmuştur. Buna göre kabul edilebilir seviyede elde edilen yanıt, 1:200 sulandırmada da korunmuştur.

Sonrasında, 1C10-Tris kısmi saflaştırmasından elde edilen pelletten, IgM afinite kolonu ile ileri saflaştırması sonucu elde edilen son ürüne ait sinyalin optimize edilebilirliği incelendi. Bundan sonra 1C10-Kolon olarak adlandırılan bu ürünün antikor sulandırmaları ve sekonder antikorlar konsantrasyonlarının denendiği indirekt ELISA analizlerinin sonuçları Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.25. 1C10-Kolon ürününün farklı sulandırmalarının 1:5000 oranında Anti IgM sekonder antikoru kullanılarak gerçekleştirilen indirekt ELISA analizi sonuçları.



Şekil 4.26. 1C10-Kolon ürününün farklı sulandırmalarının 1:1000 oranında Anti IgM sekonder antikoru kullanılarak gerçekleştirilen indirekt ELISA analizi sonuçları.

Buna göre, elde edilen 1C10-ürünü 1:1000 sulandırma oranında ve 1:1000 anti IgM sekonder antikoru kullanımında başarılı bir antikor olduğu saptanmıştır. Diğer IgM saflaştırmalarında da 1C10-Kolon ürününde uygulanan protokol kullanılmıştır.

4.7. Saflaştırılan Antikorların Biyotin ile İşaretlenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan IgM antikorları, bu saflaştırma işlemi birçok besiyeri proteinlerinin de çökmesine yol açtığı ve safsızlıklar içerdiği için biyotinlemede

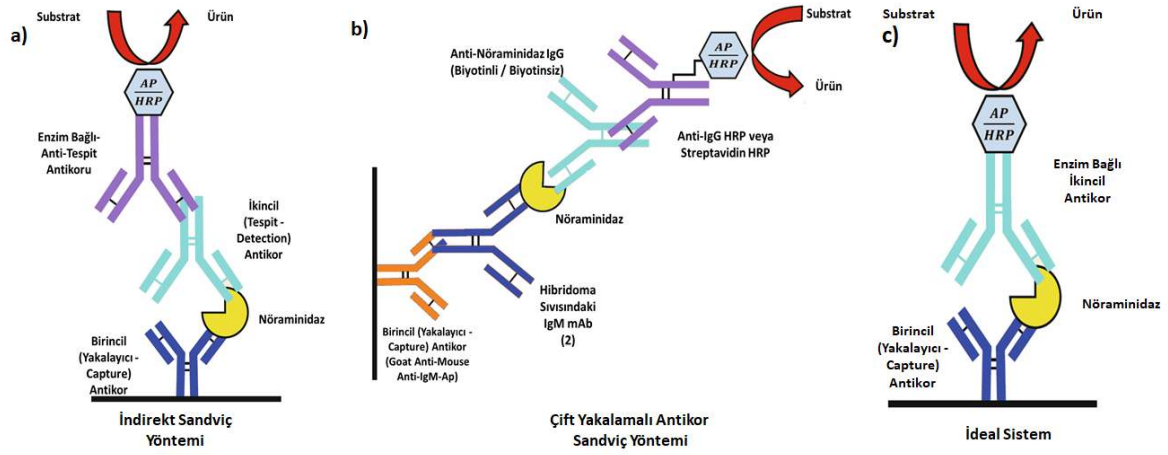
kullanılmamıştır. 1C10-Kolon ürünü olan IgM antikoru ise sonraki yapılan çalışmalarda sandviç ELISA ve western blotlarda negatif sonuç verdiği için biyotinlenmemiştir.

İşlemin uygulandığı tek örnek, protein G kromatografisi ile saflaştırılmış olan, IgG tipindeki 1D10 HT antikorudur. Buna göre, 1,6 mg/ml konsantrasyonunda, 1,6 ml'lik 1D10 HT örneği ile başlanan işlemde, 2 gün süren 2 diyaliz sonucunda örnek hacminin 0,85 ml'ye düştüğü görülmüştür. Bu çalışmadan sonra, **biyotinli-1D10 HT** / Streptavidin-HRP kullanımına dayanan yeni sandviç ELISA sistemi oluşturulmuştur. Üretilen yeni, modifiye antikor **1:200000** sulandırmada başarı ile kullanılmıştır. IgM afinite kolonları ile çöktürülen antikorlar ise, sandviç ELISA çalışmalarında umulan performansı göstermediği için biyotinlenmemiştir.

4.8. Sandviç ELISA Optimizasyonu Çalışmaları

Genel olarak, birden fazla antikor tanıma bölgesine sahip olabilecek büyük antijenlerin tespitinde sandviç ELISA sistemleri, tek antikor tanıma bölgesine sahip olabilecek küçük antijenlerin tespitinde ise yarışmalı (kompetitif) ELISA sistemleri uygulanmaktadır. Bu bölümde, prototipte kullanılacağı öngörülen indirekt sandviç (indirect antibody-sandwich) ve çift yakalamalı antikor sandviç (double-capture antibody sandwich) ELISA yöntemlerine dair optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Denemesi gerçekleştirilen deneysel modellerin şematik gösterimleri Şekil 4.27'de verilmiştir. İndirekt sandviç ELISA tekniğinde (Şekil 4.27a) IgM tipi antikorlar yakalayıcı veya tespit edici antikorlar olarak kullanılmış, karşısında ise tamamı IgG tipinde olan ticari tavşan poliklonal antikoru ile veya MAKÜ-TTL tarafından nöraminidaz antijeni kullanılarak geliştirilen 1D10 HT monoklonal antikoru ve keçi poliklonal antikorları ile birlikte kullanımları denenmiştir. IgM tipi antikorların yakalayıcı antikor olarak kullanıldığı durumlarda sinyal veriminin artırılması amacı ile çift yakalamalı antikor sandviç ELISA yöntemi (Şekil 4.27b) uygulanmış ve yüzey öncelikle IgM yakalayıcı antikorlar ile muamele edilmiştir. Başarılı antikor kombinasyonu kullanılarak oluşturulmak istenen ideal prototip sistemi ise Şekil 4.27c'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Optimizasyonu denenen indirek sandviç (a), çift yakalamalı antikor sandviç (b) yöntemlerine ve ideal prototipe (c) ait basitleştirilmiş şematik gösterim (Stanker vd., 2015'den düzenlenmiştir).

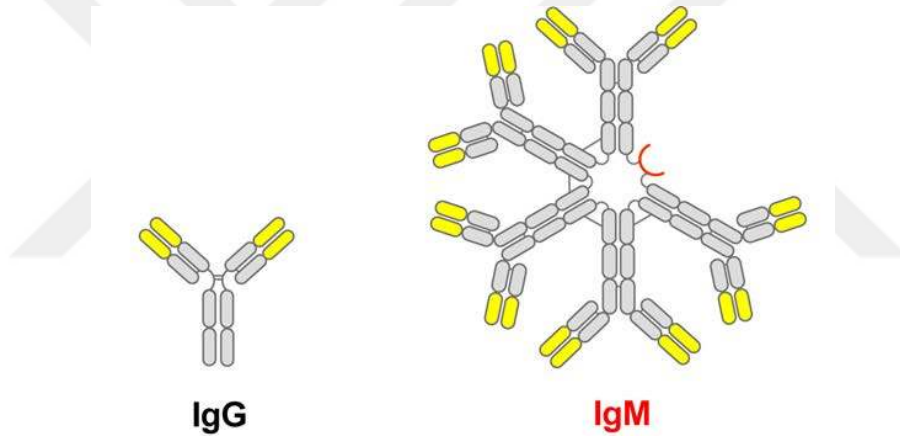
- Yapılan çalışmalarda farklı antijen miktarları ve antikor kombinasyonları denenmiş, umut vadettiği düşünülen kombinasyonlar ise ek antikor saflaştırmaları ve saha örnekleri ile tekrar edilmiştir. Gerçekleştirilmiş 18 farklı sandviç ELISA denemesine ait toplu değerlendirme Tablo 4.9'da verilmiştir. Nöraminidaza karşı geliştirilmiş tavşan ve keçi poliklonal antikorları ile gerçekleştirilen sandviç ELISA çalışmalarında kuvvetli yanıt elde edilmiştir. Ancak monoklonal IgM antikorlarının kullanıldığı çalışmalarda, denenен birçok kombinasyona rağmen tekrarlanabilir sonuçlar üreten, yüksek sinyal/gürültü oranına sahip herhangi bir sandviç ELISA kombinasyonu elde edilememiştir.

Tablo 4.9. Farklı örnek – koşul ve tarihlerde gerçekleştirilmiş olan 18 farklı sandviç ELISA optimizasyon deneyine ait toplu değerlendirmeler.

<i>Hibrit</i>	Kross Değerlendirmesi	Sandviç ELISA Genel Değerlendirmesi
<i>1A4</i>	BSA’da başarılı	1D10 HT üzerinde çalışan, tabanda çalışmayan antikor (mAb). Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1A5</i>	Genel başarılı	Yalnızca 1A5-1D10 HT kombinasyonunda çalışabilmiş mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1B1</i>	Süt tozunda başarılı	Çalışmayan mAb.
<i>1B4</i>	Genel başarılı	Çalışmayan mAb.
<i>1B6</i>	BSA’da başarılı	Çalışmayan mAb.
<i>1B9</i>	Genel başarılı	Tabanda çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1C3</i>	Genel başarılı	Çalışmayan mAb.
<i>1C6</i>	Genel başarılı	Anti-IgM üzerinde tabanda iken çalışmış. Tavşan poliklonali üzerinde üstte iken çalışmış. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1C7</i>	Genel başarılı	Tabanda çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1C8</i>	Genel başarılı	Tabanda çalışan mAb. Tavşan poliklonali ve 1D10 HT üzerinde çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1C9</i>	BSA’da başarılı	Tabanda kullanıldığında altta veya tavşan poliklonali ve 1D10 HT üzerinde üstte çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1C10</i>	Genel başarılı	1D10 HT üzerinde ve tabanda çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1D2</i>	Genel başarılı	Tabanda çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1D11</i>	Genel başarılı	Tabanda çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1D12</i>	Genel başarılı	Tabanda çalışan mAb. 1D10 HT üzerinde çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1F7</i>	Genel başarılı	Tabanda iken çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>1F9</i>	Genel başarılı	Çalışmayan mAb.
<i>1G4</i>	Süt tozunda başarılı	Tabanda iken çalışan mAb.
<i>1G5</i>	Süt tozunda başarılı	Çalışmayan mAb.
<i>2C8</i>	Süt tozunda başarılı	Yetersiz veri. Hibrit stabilitesi sorunlu. Yeterli antikor elde edilememiştir.
<i>3C2</i>	Genel başarılı	Poliklonal, 1D10 HT ve anti IgM-AP üzerinde çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>3C5</i>	Genel başarılı	Poliklonal ve 1D10 üzerinde çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>5A9</i>	Genel başarılı	Altta veya üstte çalışabilen mAb. Çalıştığı koşullarda kuvvetli sinyal varlığı. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>5E12</i>	Genel başarılı	Tabanda ve 1D10 üzerinde iken bazen çalışan mAb. Tekrarlanabilirlik ve sinyal/gürültü oranı sorunu.
<i>6D1</i>	Genel başarılı	Çalışmayan mAb.
<i>8F8</i>	Genel başarılı	Yetersiz veri. Hibrit stabilitesi sorunlu. Yeterli antikor elde edilememiştir.

Herhangi iki antikorun sandviç ELISA’da kullanılabilmesi, bu antikorların aynı antijeni iki farklı noktadan tanımasını, antijene aynı anda bağlanabilmesini ve yüksek afinite gösterebilmesini gerektirmektedir. Epitop olarak da adlandırılan bu antijen tanıma bölgelerine birinci antikorun bağlanmasının, ikinci antikorun epitopuna erişimini engellememesi, sterik engel oluşturmaması gerekir. Ayrıca, her iki antikor da epitopu ile kuvvetli bağlanma sağlayabilmelidir (Weller, 2016).

IgM tipindeki antikorların saflaştırılmasında karşılaşılan sorunların yanı sıra, yapısal karmaşıklıkları da (Şekil 4.28) çalışılması öngörülen prototip dizaynında güçlükler yol açmaktadır. İndirekt ELISA ile incelendiğinde ticari ve eldeki diğer IgG tipindeki model antikora karşı üstün özellikler gösteren birden fazla IgM tipinde antikor olmasına karşın, IgM’li prototip sisteminin, saflaştırmada yaşanan güçlüklerden de dolayı istenilen ideal sisteme dönüştürülmesinde sorun yaşanmaktadır (Şekil 4.27c.).



Şekil 4.28. IgG ve IgM tipindeki antikorların yapısı (IGM Biosciences, 2020).

Klasik bir IgG molekülü yaklaşık 150 kDa boyutunda iken, IgM molekülü ~900 kDa boyutunda ve pentamerik yapıdadır.

Yürütülen sandviç ELISA çalışmaları değerlendirildiğinde:

- Çalışmalarda kullanılan ticari *C. perfringens* nöraminidazları, *C. perfringens*’ten izole edilmiştir. *C. perfringens* ise 43 kDa, 77 kDa ve 129 kDa boyutlarında 3 farklı nöraminidaz enzimi taşır (Wang, 2020). Dolayısı ile, monoklonal antikorlar farklı nöraminidaz proteinlerine karşı gelişmiş olabilir. Oluşturulacak deney kombinasyonları yönünden monoklonal ve poliklonal antikorların hangi nöraminidazları tanıyabildiklerinin bilinmesi önem taşımaktadır.

- Gerçekleştirilen sandviç ELISA denemeleri sırasında, laboratuvarımızda bulunan ikincil antikorlar da göz önünde bulundurulmuş ve IgM tipi fare antikorları yakalayıcı veya tespit antikoru olarak kullanılırken, IgG tipi fare antikoru (1D10 HT), tavşan poliklonal antikoru ve keçi poliklonal antikorlarının tespit veya yakalayıcı antikorlar olarak kullanıldığı denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denenen IgM/IgG kombinasyonların tümünün de başarısız olması farklı izoformları tanımanın yanı sıra, IgM'in büyük boyutu kaynaklı sterik engel oluşması veya avidite yüksekliği ile kuvvetli sinyal üretebilen IgM tipi antikorlarda, alt birimlerin zayıf afinite göstermesi olabilir (Stanker ve Hnasko, 2015; Keyt vd., 2020).

- Nöraminidaza karşı geliştirilmiş tavşan ve keçi poliklonal antikorları ile yürütülen IgG/IgG tipi sandviç ELISA çalışmaları olumlu sonuç vermiştir. Poliklonal antikorların kullanıldığı sandviç ELISA'lar, bu antikorların yüksek afinitesi ve aslen farklı epitoplara tanıyan birden fazla antikor karışımından oluşmaları nedeni ile çalıştırılması en kolay deneysel sistemlerdir. Ancak bu sonuç, uygun monoklonal antikorların kullanımı ile de başarı sağlanabileceğini göstermesi nedeni ile de özellikle önem taşımaktadır.

- Literatürde, antikor araştırmalarında saflaştırma kolaylığı ve yüksek afiniteleri yönünden monoklonal ve poliklonal IgG tipi antikorların tercih edildiği görülmektedir (Gagnon vd., 2008; Keyt vd., 2020). Buna rağmen, geliştirilen antikorların kalitesine göre IgM tipi antikorların kullanımının tercih edildiği bir çok IgM/IgG ve IgM/IgM tipi sandviç ELISA'ları da mevcuttur (Paweska vd., 2005; Stanker ve Hnasko, 2015).

Sonraki dönemlerde, gerçekleştirilen IgM/IgG sandviç kombinasyonlarına ek olarak, aynı tip nöraminidaz proteinini tanıyan IgM'ler saflaştırılarak enzimlerle işaretlenebilir ve yeni IgM-IgM kombinasyonları denenebilecektir. Ek olarak, IgM'lerin hafif zincir tiplendirmesi de yapılarak, farklı tipte hafif zincir taşıyan antikorlar belirlenebilir. Farklı hafif zincirler taşıyan antikorların bulunması halinde saflaştırma yapılmaksızın bunlara özgü ikincil antikorların kullanılacağı yeni IgM-IgM kombinasyonları gerçekleştirilebilecektir. IgM/IgM sandviç ELISA formatı, monoklonal antikorların yalnızca bir epitopa özgü olması, IgM'lerin ise pentamerik yapısından dolayı yüksek sterik engel riski ile taşıyacak olmasına rağmen literatürde bu formatın kullanımı da mevcuttur (Wandstt vd., 1981).

Genel olarak, gerçekleştirilen sandviç ELISA deneyleri antikorların farklı nöraminidaz tiplerini tanıyabileceklerini ve/veya aynı nöraminidaz tipini tanımlarına rağmen tanıma epitoplarının sterik olarak birden fazla antikoru bağlanmasına olanak

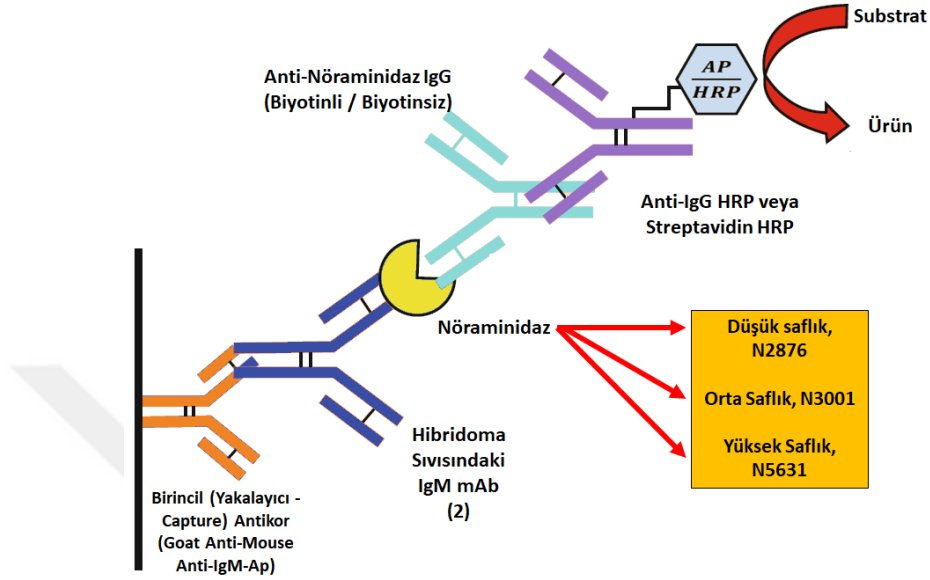
vermiyor olabileceğini düşündürmüştür. Ancak denenen tüm antikor-antijen kombinasyon ve optimizasyonlarına rağmen iyileşme sağlanamamıştır. Bu sebeple, nöraminidaza karşı IgG tipi yeni monoklonal antikorlar geliştirilmek istenmiş, düşük miktarda antijen ile çok tekrarlı immünizasyonlar yapılarak IgG oluşumu teşvik edilmeye çalışılmıştır (Krishnan vd., 2000; Lee vd., 2017). Bu süreç sonunda ise füzyon IV ve füzyon V gerçekleştirilmiş (Tablo 4.1) ancak yaşanan kontaminasyon nedeni ile hücreler kaybedilmiştir. Sandviç ELISA kombinasyon denemeleri sırasında gelişen yanıtın kullanılan ticari *C. perfringens* nöraminidaz formuna göre ciddi değişkenlik gösterdiğinin fark edilmesi ile nedeni ile, sonraki çalışmalar kullanılan ticari antijene üzerine yoğunlaştırılmıştır.

4.9. Ticari *C. Perfringens* Nöraminidazlarının İndirekt ELISA İle Karakterizasyonu

MAKÜ-TTL grubumuzca Sigma, N5631 katalog kodlu yüksek saflıktaki ticari nöraminidaz ürünü ile gerçekleştirilen keçi immünizasyonları ile geliştirilmiş bir keçi nöraminidaz poliklonal antikoru da önceki bölümde belirtilen sandviç ELISA çalışmalarına dahil edilmiştir. Ancak gerçekleştirilen tüm sandviç ELISA kombinasyonu denemelerine rağmen (Şekil 4.29), sonuçlarda iyileşme sağlanamamıştır. Ek olarak, bu sandviç ELISA kombinasyonları denemeleri sırasında, daha önce çalışan bazı antikor kombinasyonlarının kullanılan nöraminidaz antijen tipinin değiştirilmesi ile çalışmaz hale geldiği görülmüştür. Bu durum, daha önce sadece düşük – orta ve yüksek saflık değerlerinde olduğu düşünülen, ticari olarak Sigma firmasından temin edilen nöraminidaz antijeninin sorgulanmasına neden olmuştur (Tablo 4.10).

C. perfringens 43 kDa boyutunda, sitoplazmik ve 77 kDa ve 129 kDa boyutlarında hücre dışına salgılanan 3 farklı nöraminidaz enzimi taşır (Wang, 2020). Çalışmamızın başlangıcında edinilen ticari nöraminidazların farklı safsızlıkların yanı sıra, her defasında bu üç nöraminidazı da içereceği düşünülmüştür. Yüksek saflıktaki nöraminidazlarda ise safsızlıkların azalacağı, bu üç nöraminidazın ise bulunmaya devam edeceği öngörülmüştür (Tablo 4.10). Çalışmalar sırasında ise özellikle kritik kabul edilen ilk immünizasyonlarda en yüksek saflıktaki nöraminidaz, devam eden immünizasyonlarda ve hibrit üst sıvıları ile gerçekleştirilen deneylerde ise orta saflıktaki nöraminidaz kullanılmıştır. Düşük saflıktaki nöraminidaz ise satın alınmış, ancak immünizasyonlar ve hibrit taramaları sırasında kullanılmamıştır. Denenen sandviç ELISA deneyi kombinasyonları sırasında bazı antikorların bazı saflıktaki antijenlerle hiç çalışmadığının görülmesi antijenler arasında safsızlıklar haricinde, nöraminidaz içerikleri yönünden de farklılıklar olabileceğini

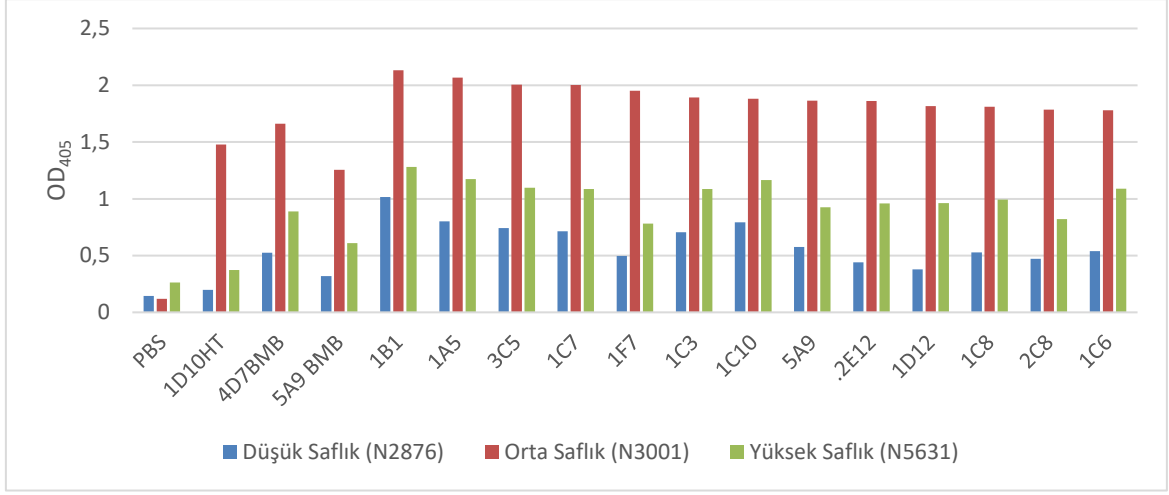
düşündürmüştür. Bunun ortaya konulabilmesi amacı ile de indirekt ELISA testi gerçekleştirilmiş ve antikorların farklı antijenlere farklı afinite gösterip göstermediği incelenmiştir (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31).



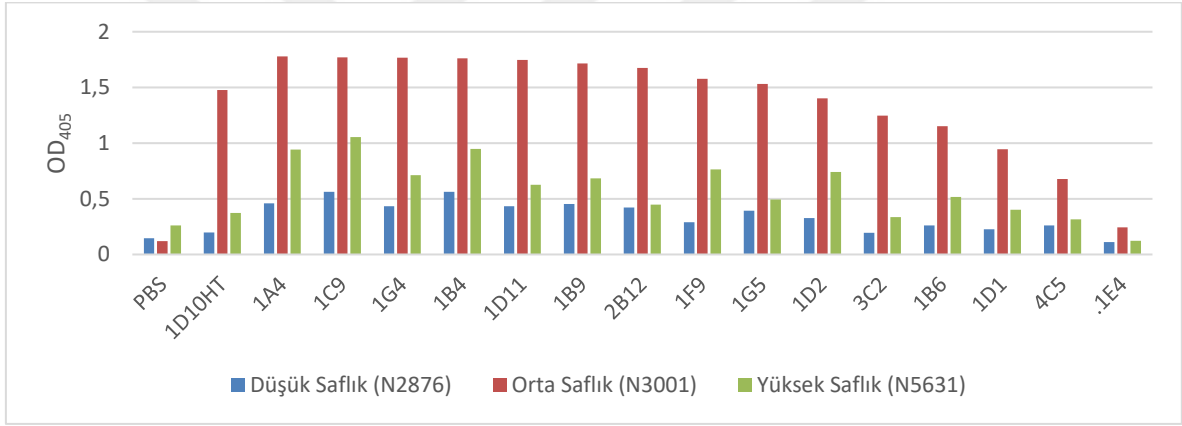
Şekil 4.29. Sandviç ELISA’larda kullanılan antijen tipi deney sonucunu etkilemektedir. Sandviç ELISA çalışmaları sırasında farklı antikor kombinasyonları ve antikor saflığının yanı sıra, kullanılan antijeninler de deneme kombinasyonlarına eklenmiştir.

Tablo 4.10. Çalışmalar sırasında kullanılan farklı ticari nöraminidaz antijenleri.

Nöraminidaz	Ürün kaynağı	Saflaştırma Yöntemi	Protein İçeriği	Enzim Aktivitesi (4MU-NANA Substrat)	Yaklaşık Maliyet (10 Ünite)
Tip V Düşük saf(lık) (Sigma N2876)	<i>C. perfringens</i> bakterisi	Tuz fraksiyonlaması	Taahhüt yok	≥ 1.3 ünite/mg katı	~€112.10
Tip VI Orta saf(lık) (Sigma N3001)	N2876	Kromatografik saflaştırma	Protein, $\geq 50\%$ biuret	6-10 ünite/mg protein	€483.00
Tip VIII Yüksek saf(lık) (Sigma N5631)	N2876	Kromatografik saflaştırma	Protein, $\geq 85\%$ biuret	10-20 ünite/mg protein	€933.00



Şekil 4.30. Antijenler arasında farklılık olup olmadığının anlaşılması amacı ile gerçekleştirilen indirekt ELISA testi birinci grafiği.



Şekil 4.31. Antijenler arasında farklılık olup olmadığının anlaşılması amacı ile gerçekleştirilen indirekt ELISA testi ikinci grafiği.

Bu sonuçlara göre:

- Antikorların orta saflıktaki antijene yüksek afinite gösterdiği görülmektedir. Yüksek saflıktaki antijene ikinci en yüksek afinite gösterdiği fark edilirken, bütün bu ürünlerin köken aldığı düşük saflıktaki antijene ise en düşük afinite gösterdiği gözlemlenmiştir.
- Çalışmaların başında indirekt ELISA'da, 405 nm'de, 0,8 ve üzeri absorbands gösteren hibritler başarılı kabul edilmişti. Ancak, antikorların birçoğunun bu kriteri düşük ve yüksek saflıktaki antijenlerin kullanılması halinde sağlamayacağı görülmektedir.

- Çalışmalar sırasında sıkça kullanılmış olan, MAKÜ-TTL çalışma grubu tarafından geliştirilmiş, IgG tipindeki 1D10 HT antikoru yalnızca bir antijen tipini başarılı bir şekilde tanıyabilmektedir.

- Orta saflıktaki antijene karşı gösterilen yüksek afinitenin sebebi ilk immünizasyonlar sonrasında yapılan immünizasyonlar ve gerçekleştirilen ELISA taramaları sırasında orta saflıktaki antijenin kullanılması olabilir. Bu, hem füzyon öncesinde orta saflıktaki antijeni tanıyan antikor yanıtının güçlendirilmesine yol açmış hem de deneyler sırasında buna özgü yanıtı veren hibrit hücrelerinin seçilmesine neden olmuş olabilir.

- Bu sonuçlar, safsızlıkların ötesinde, antijenlerin nöraminidaz içerikleri / miktarları yönünden de ciddi farklılıklar taşıyabileceğini ortaya koymaktadır.

4.10. Ticari *C. Perfringens* Nöraminidazları ve Antikorların Western Blot ile Karakterizasyonu

Western blot, antikorların ve diğer proteinlerin karakteristiklerinin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir doğrulama tekniğidir (Gilda vd., 2015; Simpson ve Browning, 2017; Uhlen, 2017). Antijenler arasında nöraminidaz içeriği yönünden farklılık olup olmadığının, antikorların ise nöraminidaza olan bağlanmalarının ortaya konması amacı ile Western blot çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmadaki Western blot membran görüntülerinin değerlendirilmesinde ise Feng ve diğerleri tarafından 2017 yılında yayınlanmış çalışmadan yararlanılmıştır (Feng vd., 2017). Bu çalışmada, araştırmacılar *C. perfringens* yabanıl tipi (wild type), NanH tekli mutantı, NanI tekli mutantı, NanJ tekli mutantı, NanI ve NanJ ikili mutantı ve nöraminidaz üçlü mutantına ait izolatların yanı sıra, bu çalışmada da kullanılan düşük saflıktaki ticari nöraminidaz ürününün Western blot analizini gerçekleştirmiştir. Kullanılan nöraminidaz antikoru ise, araştırmacıların ürettiği, üretiminde düşük saflıktaki ticari nöraminidazın immünojen olarak kullanıldığı, tavşan poliklonal antikorudur. Bu çalışmamızda, ortaya çıkan nöraminidaz bantlarının incelenmesinde, bu araştırmacıların ilgili yayınında yer alan “Şekil 2b” Western blot paneli kılavuz olarak kullanılmıştır. Buna göre:

- Düşük saflıktaki nöraminidazın kullanımı ile geliştirilen tavşan poliklonal antikoru, bu antijende birçok bant bölgesini tanıyabilmektedir. İmmünojen içeriği karmaşıktır ve çok sayıda protein içermektedir.

- Antikor, NanH'ye özgü bant geliştirememiştir. Bu, antijen içerisinde az miktarda NanH bulunmasından, NanH'nin immün yanıt uyarma kapasitesi düşük olmasından veya tamamen tesadüfen olabilir.

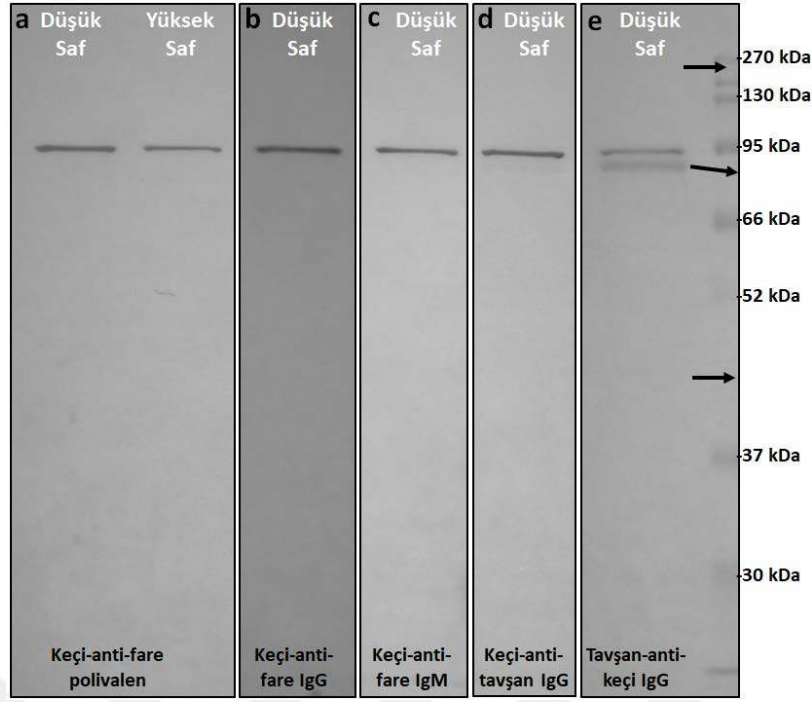
- Araştırmacılar tarafından üretilen antikor NanH'yi tanımamasına karşın, NanH'nin knock out edilmesinin etkisi sunulan Western blot çalışmasında belirgindir. NanH'nin knockout edildiği durumda NanI miktarında artış görülmüştür. Bu, araştırmacılar tarafından mutantların üretildiği ve karakterize edildiği önceki çalışmalarında da gösterilmiştir (Li vd., 2011).

- NanI, 75 kDa marker çizgisinin hemen üzerindedir. Bunun haricinde, 77 kDa'ya denk gelen NanI bandı ile 50 kDa marker seviyesi arasında 2 farklı bant oluşumu daha gözlemlenmektedir. Üst bölgesinde ise, düşük saflıktaki antijen şeridinde 77-100 kDa arasında 1 adet belirgin bant, 100 – 129 kDa arasında ise 3 adet belirgin bant görülmektedir.

- Araştırmacıların, kullanılan bu mutantların karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri yayını ile birlikte değerlendirildiğinde, NanI'nın 50-100 kDa bölgesindeki en belirgin ikinci banta karşılık geldiği görülmektedir (Li vd., 2011)

- Düşük saflıktaki antijende, NanJ'nin yakın bölgesinde birden fazla bant bulunmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda, 130 kDa marker seviyesinin hemen altında yer alan tek bant olarak görülmesi sebebi ile tespiti kolay yapılabilmektedir.

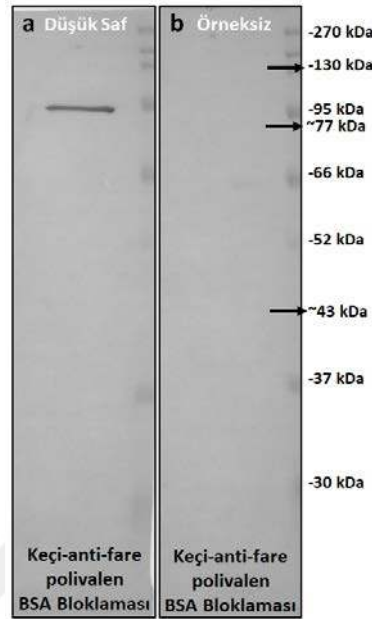
Çalışmamızdaki antikor etkileşimleri ve kullanılan antijenlerin içeriklerinin ortaya konması amacı ile ilk adım olarak spesifik olmayan bağlanmalar ortaya konmak istenmiş ve membranlar primer antikor uygulaması yapılmaksızın sekonder antikorlar ile işaretlenmiştir (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33).



Şekil 4.32. Deneyler sırasında yaygın olarak kullanılan AP ile konjuge edilmiş sekonder antikorlara ait Western blot analizleri. Örnekler %10'luk SDS-Page jelinde ayrıştırıldıktan sonra PVDF membrana transfer edilmiş ve membran süt tozu ile bloklanmıştır. Sonrasında membranlar, primer antikor uygulaması gerçekleştirilmeksizin sekonder antikorlarla işaretlenmiş ve spesifik olmayan bağlanmalar ortaya konmuştur.

Bu sonuçlara göre, çalışmalar sırasında kullanılan tüm sekonder antikorlar, nöraminidaz örneği içerisinde bulunan ~95 kDa'lık bir bölgeye bağlanmakta ve çalışma dizaynı yönünden spesifik olmayan bant oluşumuna yol açmaktadır (Şekil 4.32). Ek olarak, keçi anti fare polivalen antikoruna ile yapılan kontrol bu antikorun yüksek saflıktaki antijen ile de aynı spesifik olmayan bandı ürettiğini göstermiştir (Şekil 4.32a). Tavşan anti keçi IgG antikoruna ise, diğer örneklerde de görülen 95 kDa'lık bandın yanı sıra, 90 kDa marker bandının yakın alt bölgesinde kalan ikinci bir banda sahiptir. Bu çalışmada sunulan diğer membran görüntüleri ve Feng ve diğerlerinde yer alan sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde, ilgili bandın 77 kDa bölgesine ve NanI nöraminidazına denk geldiği öngörülmektedir. Bundan sonra, bloklama çözeltisinin bant oluşumuna etkisi incelenmek istenmiş ve Şekil 4.32a'da gerçekleştirilen uygulama BSA bloklamasında, düşük saflıktaki ticari nöraminidazın varlığında ve yokluğunda test edilmiştir (Şekil 4.33). Birlikte incelendiğinde, sekonder antikor kullanımı ile meydana gelen bant oluşumunun süt tozu

ve BSA bloklamasına bağılı olmayıp (Şekil 4.32a ve Şekil 4.33a), ticari nöraminidaz kullanımına bağılı olduğı görölmektedir (Şekil 4.33b).



Şekil 4.33. Sekonder antikor tarafından oluşturulan spesifik olmayan bant (a) süt tozu bloklamasına bağılı olmayıp, nöraminidaza bağılıdır (b). Antijen bulunduran (a) ve bulundurmeyen (sadece örnek yükleme tamponu yüklenmiş) membranlar (b) BSA ile bloklanmış, sonrasında da alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş keçi-anti-fare polivalen antikorlu ile muamele edilmiştir.

Kullanılan ticari nöraminidazlara özgü, ancak çalışma dizaynı yönünden spesifik olmayan bu bantlar sandviç ELISA sırasında bazı örneklerde karşılaşılan yüksek arka plan gürültüsünün ve yeterli iyileşme sağlanamayan düşük sinyal/gürültü oranlarının da muhtemel sebebidir. Yapılan tüm ELISA analizlerinde bu ikincil antikorlar da kullanılmış olmasına karşın, indirekt ELISA’larda yalnızca 100 ng/kuyu nöraminidaz kullanılmış olması, düşük/kabul edilebilir gürültü (0,2 OD₄₀₅, 90. dakika inkübasyonu) ile sonuçlanmıştır. Ancak sandviç ELISA’larda sinyal kuvvetinin artırılması amacı ile 100-1000 ng nöraminidaz kullanılmış, bu ise 60. dakika okumalarında ~0,7’ye ulaşan OD₄₀₅ arka plan gürültüsü oluşumuna yol açmıştır. İki farklı firma tarafından üretilen poliklonal yapıdaki bu antikorlarda görülen, 95 kDa’lık bant ve olası NanI reaktivitelerinin gerçek hedefleri ise bilinmemektedir. Bu çalışmada sunulan diğer membran görüntüleri ve Feng ve arkadaşlarının çalışmasında yer alan ilgili *C. perfringens* nöraminidaz bant profili, 95

kDa'lık sinyalin herhangi bir nöraminidaz ile ilişkili olmayacağını göstermektedir. Poliklonal antikor üreticisi hayvanların *C. perfringens*'e karşı aşılansmış olma ihtimali bulunmakla birlikte, yaygın *C. perfringens* aşılar major toksinler kullanılarak üretilen toksoid aşılardır (Uzal vd., 2010; Richeson vd., 2019; Zaragoza vd., 2019). Ek olarak, bilinen, ilgili boyuta sahip *C. perfringens* toksini de bulunmamaktadır (Tablo 2.1). Bu sebepler ile ilgili bandın, diğer canlılarla da paylaşılan, *C. perfringens*'e özgü olmayan herhangi bir bakteriyel proteine karşılık geldiği öngörülmektedir. Tavşan anti keçi IgG antikoru kullanımı ile ortaya çıkan 77 kDa'lık olası NanI bandının ise, tavşanlarda hücre dışına salgılanan NanI'ya karşı gelişmiş olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, oluşan bandın sekonder antikorların ticari nöraminidazlara bağlanması ile oluştuğu ve süt tozu veya BSA bloklamasından etkilenmediği ortaya konulmuştur. Sonraki dönemlerde ise nöraminidaza afinite göstermeyen ikincil antikorların temini veya nöraminidaza karşı afinite kromatografisi gerçekleştirilerek mevcut ticari ikincil antikorlardan bu istenmeyen antikorların uzaklaştırılması veya anti nöraminidaz antikorlarının enzimlerle işaretlenerek doğrudan kullanımının önemli olacağı düşünülmektedir.

Sonraki aşamada düşük, orta ve yüksek saflıktaki ticari nöraminidaz antijenlerinin içeriklerinin ortaya konması amaçlanmış ve tavşan anti nöraminidaz poliklonal antikor kullanılmış ve Western blot analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.34). Ek olarak, bu antikorun insan nöraminidazlarını tanıyabilirliği de test edilmek istenmiş ve SKOV3 insan hücre hattından izole edilmiş protein örneği de kullanılmıştır. Buna göre:

- Antikor, SKOV3 hücre hattına zayıf bağlanmaktadır. Gelişen bantlardan 95 kDa seviyesindeki bant, kullanılan keçi anti tavşan ikincil antikor kaynaklıdır (Şekil 4.32d). 77 kDa'lık *C. perfringens* NanI bölgesine denk gelen ikincil bandın ise olası hedefi bilinmemektedir. *C. perfringens* NanI proteinin insanda yer karşılığının Neu3 olduğu, Neu3 proteinin ise ~56 kDa boyutuna sahip olduğu bildirilmiştir (Feng vd., 2017; Rodriguez-Walker ve Daniotti, 2017).

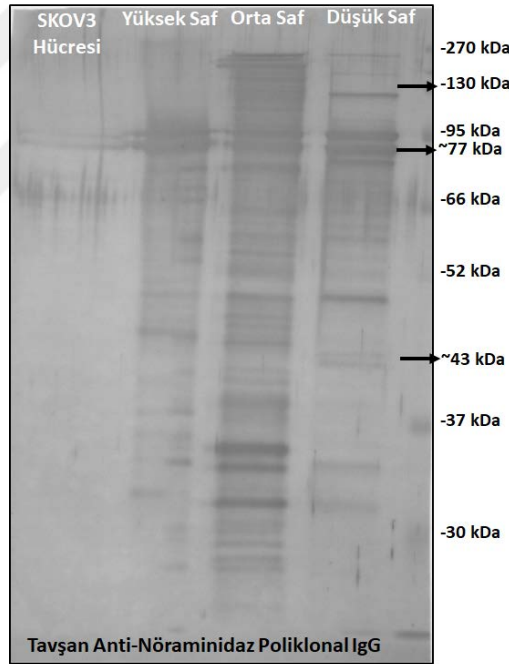
- Hem düşük, hem orta, hem de yüksek saflıktaki nöraminidaz antijenleri safsızlıklar içermektedir. Her üç antijen de içeriklerinde, beklenen 129 kDa, 77 kDa ve 43 kDa bölgeleri haricinde birçok farklı bandın oluşumuna yol açan safsızlıklar taşımaktadır.

- Antijenlerden düşük saflıkta olan versiyonu 129 kDa (NanJ), 77 kDa (NanI) ve 43 kDa'a (NanH) karşılık gelen bant bölgelerini içermektedir. Yüksek saflıktaki üründe 129 kDa (NanJ) bölgesi bulunmamaktadır. Ek olarak, düşük saflıktaki üründe yer alan 43 kDa bandı (NanH) bölgesinin eşdeğeri orta ve yüksek saflıkta bulunmamaktadır. Buna karşın, bu

ürünlerde, belirtilen 43 kDa bölgesinin yakın bölgesinde, genel bant profili ile uyum gösterdiğinden NanH olabileceği öngörülen diğer bir bant vardır. Dolayısı ile, orta ve yüksek saflıktaki antijenlerin her üç nöraminidazı da içerdiği, yüksek saflıktaki antijenin ise yalnızca NanI ve NanJ’yi içerdiği kabul edilmiştir.

- Düşük saflıktaki üründen kromatografi yolu ile saflaştırılarak elde edilmesi beklenen “orta saflıktaki” ticari nöraminidaz antijeni, düşük saflıktaki antijende de yer almayan birçok bölge taşımaktadır.

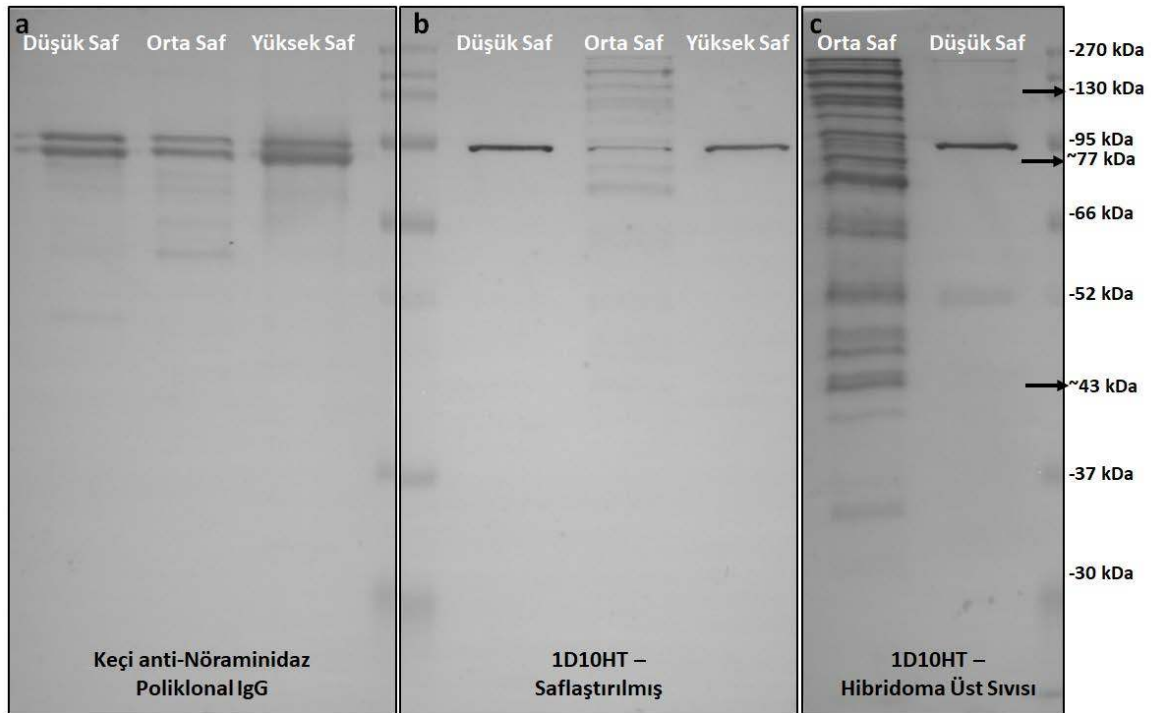
- Saf bir enzim olarak nöraminidaz antijeninin, immün yanıt uyandırabilme kapasitesi, yani immünojenitesi bilinmemektedir. Her üç antijende de yer alan safsızlıklar, immünizasyonlardan nöraminidaz spesifik yanıt alım etkinliğini olumsuz etkileyebilir. Orta saflıktaki ürünün çalışmalar sırasında kullanımı yüksek safsızlıkları nedeni risk taşımaktadır. Yüksek saflıktaki ürün ise NanJ’yi taşımadığı için immünizasyon sırasında kullanımı tercih edilmeyebilir.



Şekil 4.34. Ticari tavşan anti-nöraminidaz poliklonal antikoru ile gerçekleştirilen Western blot analizi sonucu. Düşük orta ve yüksek saflıktaki nöraminidaz antijenlerinin yanı sıra, SKOV3 hücre hattı ekstraktı %10'luk SDS-Page jelinde ayrıştırıldıktan sonra PVDF membrana transfer edilmiş ve membran süt tozu ile bloklanmıştır. Beklenen nöraminidaz bant boyutları 129 kDa, 77 kDa ve 43 kDa bölgelerindedir.

- İlerleyen süreçlerde, hibrit hücrelerinin taranması sırasında antijenlere kuvvetli ELISA yanıtı veren ve çapraz reaksiyon vermeyen hibrit hücre üst sıvılarının Western blot analizi de yapılarak doğru bant bölgesine yanıt verip vermediğinin incelenmesi önem taşımaktadır.

Şekil 4.34 özelinde yapılan değerlendirmeler, keçi poliklonali, 1D10 HT, 5A9 ve 1C10 hibrit hücre antikorlarına da uygulanmış, antikorların bağlanmalarının yanı sıra, saflaştırmanın sonuçlara olası etkisi de incelenmiştir (Şekil 4.35 ve Şekil 4.36). Buna göre:



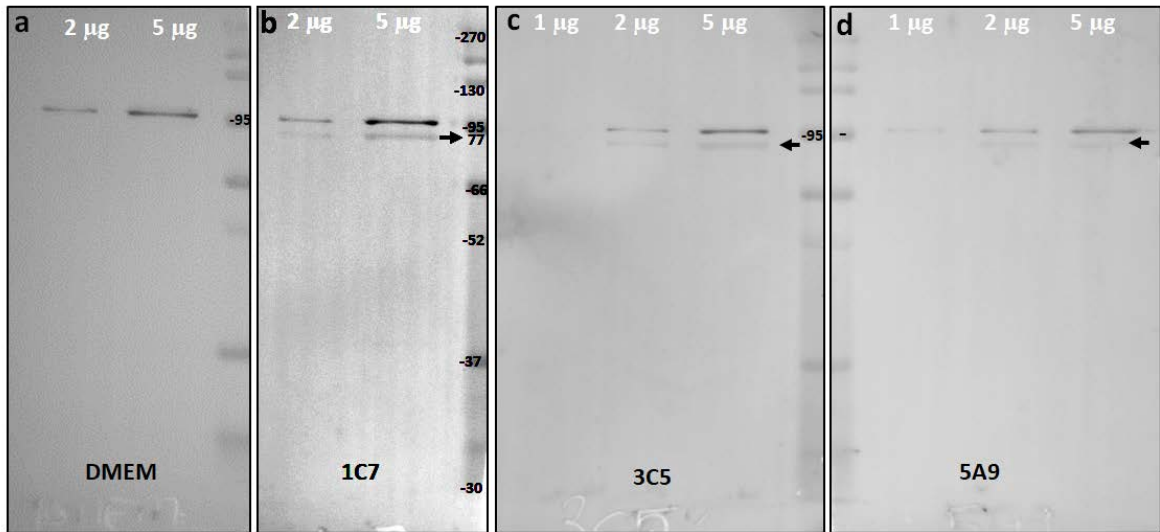
Şekil 4.35. Yüksek saflıktaki nöraminidaz antijeni immünizasyonu ile geliştirilen keçi poliklonal antikor (a) ile, orta saflıktaki nöraminidaz antijenik immünizasyonu ile geliştirilen 1D10 HT antikorlarına ait Western blot analizi sonucu. Düşük orta ve yüksek saflıktaki nöraminidaz antijenleri %10'luk SDS-Page jelinde ayrıştırıldıktan sonra PVDF membrana transfer edilmiş ve membran süt tozu ile bloklanmıştır. Beklenen nöraminidaz bant boyutları 129 kDa, 77 kDa ve 43 kDa bölgelerindedir.

- Şekil 4.35a'da görülen, nöraminidaza karşı geliştirilmiş keçi poliklonal antikoruna ait western blot yanıtı NanI'ya özgüdür. Kullanılan tavşan anti keçi IgG ikincil antikorunun da 95 kDa ve 77 kDa bölgelerine spesifik olmayan bağlanma yapabildiği gösterilmiş

olmasına karşın (Şekil 4.32e), 4.35a’da elde edilen yanıt çok daha kuvvetlidir. Ek olarak, 77 kDa bölgesinin altında da bant oluşumu görülse de bu bantlar zayıftır. Bu anti nöraminidaz keçi antikoru NanI’nın hedefleneceği sandviç ELISA ve diğer çalışmalarda kullanılabileceği değerlendirilmektedir.

- 1D10 HT monoklonal antikoruna tarafından oluşturulan yanıt (Şekil 4.35b ve Şekil 4.35c), orta saflıktaki nöraminidazda yer alan safsızlıklara karşı gelişmiştir. Bu sonuç Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de verilen ELISA sonuçları ve Şekil 4.34’te verilen Western blot sonuçları ile de aynı doğrultudadır.

- Şekil 4.35c’de, düşük saflıktaki antijen şeridinde görülen zayıf bant profili, aynı safsızlıkların, daha düşük miktarda, bu antijen içinde de bulunduğunu göstermektedir. Ancak, üretici firma tarafından düşük saflıktaki antijen ürününden, orta saflıktaki ürünün kromatografik saflaştırma işlemi ile hazırlanması sürecinin, halihazırda mevcut olan safsızlıkların da yoğunlaştırılmasına veya yenilerinin eklenmesine neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.36. 1C7, 3C5 ve 5A9 NanI’ya özgü monoklonal antikorlardır. 1 µg, 2 µg ve 5 µg düşük saflıktaki nöraminidaz antijeni %10’luk SDS-Page jelinde ayrıştırıldıktan sonra PVDF membrana transfer edilmiş ve membran süt tozu ile bloklanmıştır. Küçük striplere kesilen membran sonrasında %10 FBS içeren DMEM besiyeri (a; negatif kontrol) ile veya 1C7 (b), 3C5 (c), 5A9 (d) hibritlerinin üst sıvıları ile muamele edilmiştir. Küçük ok ile işaret edilen bant 77 kDa boyutundaki NanI’ya karşılık gelmektedir.

- Üretici firma ile iletişime geçilerek, ticari antijen saflaştırma süreçleri hakkında bilgi edinilmesi ve 1D10 HT monoklonal antikorunun olası hedeflerinin bulunarak harici bir monoklonal antikor olarak geliştirilmesi planlanabilir.

- Sandviç ELISA'lar sırasında 1D10 HT kullanılmamalıdır. 1D10 HT ile kombinasyonlarında zayıf yanıt üreten diğer monoklonal antikorların da (Tablo 4.9) safsızlıklara karşı gelişmiş olması muhtemeldir.

- Saflaştırılmış antikorlar ile daha kuvvetli yanıt elde edileceği düşünülmesine karşın, Şekil 4.35b ve Şekil 4.35c ile Şekil 4.36d ve 4.37a panelleri karşılaştırıldığında, saflaştırılmış ürünler ile alınan yanıtların daha zayıf kaldığı görülmektedir. Saflaştırılmış ürünlerin uygulanacağı konsantrasyonların belirlenmesinde ise indirekt ELISA'dan yararlanılmış, bu ürünlerin hibrit üst sıvılarına benzer sinyal üretebildiği PBS içerisindeki sulandırma konsantrasyonları kullanılmıştır. Western blot sırasında ise, hibrit üst sıvıları doğrudan uygulanmış, saflaştırılmış antikorlar ise TBST içerisinde %5 süt tozu içeren bloklama solüsyonu içerisinde sulandırılmıştır. Hibrit üst sıvıları ile, saflaştırılmış ürünler arasında görülen sinyal kuvveti farklılığı, antikor afinitesinin korunması yönünden hücre kültürü üst sıvılarının daha etkili olduğunu göstermektedir. Sonraki çalışmalarda, farklı sulandırma çözümleri değerlendirilmeli ve/veya daha yüksek konsantrasyonlarda antikor uygulanmalıdır.

Şekil 4.36'da görülen Western blot çalışmasında, kuyulara 1 µg, 2 µg ve 5 µg miktarlarda düşük saflıkta ticari nöraminidazlar yüklenmiş, membranlar ise %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile veya 1C7, 3C5 ve 5A9 hücrelerinin içinde çoğaltıldığı hibrit hücresi üst sıvıları ile muamele edilmiştir. Sırası ile 1C7, 3C5 ve 5A9'un yer aldığı Şekil 4.36a, Şekil 4.36b ve Şekil 4.36c panellerinde, NanI bölgesine denk gelen, 77 kDa'lık bölgeye afinite gösterdiğini ve NanI'ya özgü monoklonal antikor olabileceğini göstermektedir. Buna göre:

- 1C7, 3C5 ve 5A9 antikorları, hem ELISA ile hem de Western blot ile çalışan monoklonal antikorlardır.

- NanI özgünlüğünün doğrulanması, kullanılan ticari antijen içeriklerinin kirliliğinden dolayı önem taşımaktadır. Buna göre, monoklonal antikorların saf olduğu bilinen NanI proteini ve/veya NanI mutantları ile teyit edilmesinde fayda vardır.

- Destekleyici bir alternatif teyit metodu ise afinite kromatografisi ile ilgili banda karşılık gelen proteinin saflaştırılması, enzim aktivite deneyleri yürütülmesi ve sonuçların literatüre uygunluğunun incelenmesi olabilir.

- Bu monoklonal antikorlar sandviç ELISA prototiplerinin oluşturulması için öncü adaylar olacaktır. Alınan Western blot sonucu, Tablo 4.9’da verilmiş olan, bu antikorların belirli koşullar altında çalışabileceğini de doğrulamaktadır.

- Bu antikorlar ile, birbirleri arasında IgM/IgM, veya poliklonal antikorlar ile IgM/IgG sandviç ELISA’ları oluşturulmalıdır. Ayrıca kullanılacak ikincil antikorların da gözden geçirilerek sinyal / gürültü oranlarda iyileştirme sağlanmalıdır.

- Tablo 4.9’da belirtilen, poliklonal antikorlar ile çalışan ancak 1D10 HT ile çalışmayan antikorlar, sandviç ELISA kombinasyonlarının denenmesinde ön kriter olarak kullanılabilir.

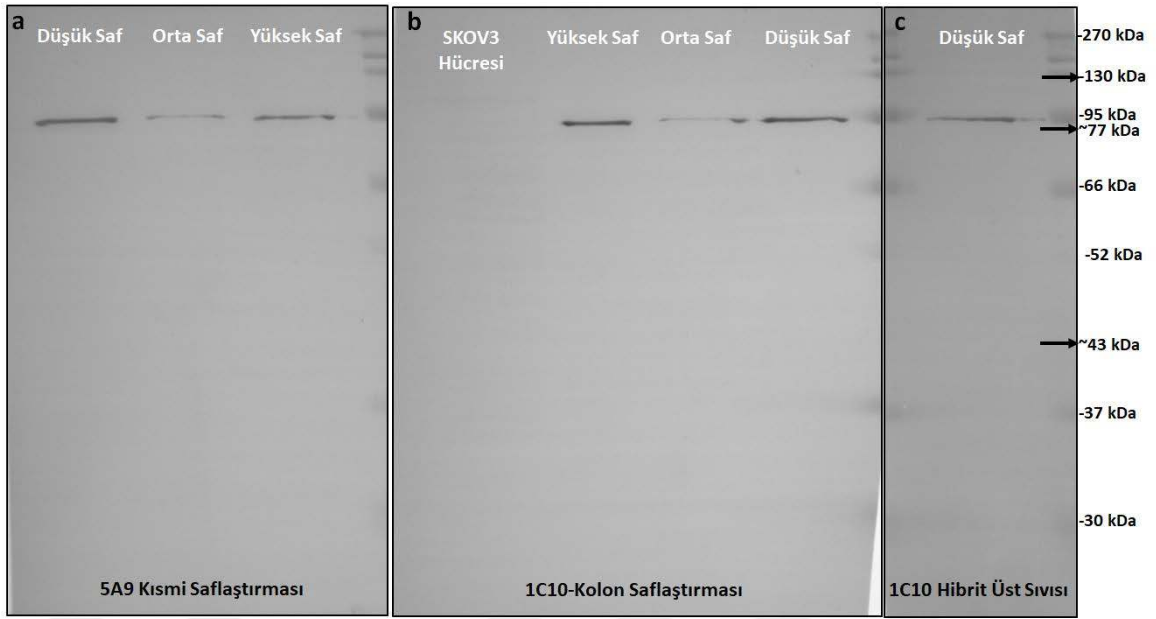
Şekil 4.37’de, çalışmayan Western blot örneği olarak 1C10’a ait hibrit üst sıvısı ve saflaştırılmış antikor ile, 5A9’a ait kısmi saflaştırılmış antikorlar ile yapılmış Western blot sonuçları gösterilmiştir. Oluşan yanıt ise sekonder antikor kaynaklı, spesifik olmayan yanıttır. Buna göre:

- Şekil 4.37a’da 5A9’un kısmi saflaştırılmış antikorları ile yürütülen deneyi çalışmamış olmasına rağmen, 4.36d’de 5A9 üst sıvısı kullanılarak yapılan deneyin çalıştığı ve 77 kDa’a özgün yanıt ürettiği gösterilmiştir. Bu durumun daha önce de belirtildiği üzere saflaştırılmış ürünlerin sulandırılmalarında bloklama çözeltisi kullanılması nedeni ile oluştuğu düşünülmektedir.

- Hem saflaştırılmış antikor sulandırılmalarının kullanıldığı hem de hibridoma üst sıvılarının kullanıldığı Western blot analizlerinde, antijen miktarının artırılması, alternatif bloklama çözeltilerinin kullanılması, farklı çözeltiler ile primer antikor sulandırılmalarının hazırlanması ve yüksek miktarda antikor kullanımı ile sonuçlarda iyileşme sağlanabilir.

- İndirekt ELISA’da çalışan antikorlar ile yürütülen Western blot deneylerinin çalışmaması, elektroforez için SDS-Page kullanılarak proteinlerin denatüre edilmesi kaynaklı olabilir. Bu gibi antikorlar ile native jel elektroforezi yöntemleri kullanılmalıdır.

- İlginç bir şekilde, Şekil 4.36c’de 77 kDa yanıtı ve olası NanI özgünlüğü gösterilen 3C5’in, Tablo 4.9’da 1D10 HT ile çalışabildiği de belirtilmiştir. Benzeri şekilde, 4.37b ve 4.37c’de ise negatif yanıtı gösterilen 1C10 antikorunun da 1D10 HT ile çalışabildiği belirtilmiştir. Optimize edilmiş deney koşulları yanlış pozitif sonuçların da azaltılmasına yardımcı olacaktır.



Şekil 4.37. 5A9 antikorunun kısmi saflaştırma ürünü (a) ile 1C10 antikorunu ileri saflaştırma ürünü (b) ve hibrit üst sıvısının (c) çalışmayan Western blot analizi sonucu. Düşük orta ve yüksek saflıktaki nöraminidaz antijenlerinin yanı sıra, SKOV3 hücre hattı ekstraktı %10'luk SDS-Page jelinde ayrıştırıldıktan sonra PVDF membrana transfer edilmiş ve membran süt tozu ile bloklanmıştır. Beklenen nöraminidaz bant boyutları 129 kDa, 77 kDa ve 43 kDa bölgelerindedir.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde:

- Çalışma sırasında çok sayıda monoklonal antikor geliştirilmiştir.
- Hayvanların immünizasyonu sırasında kullanılan antijenler yüksek safsızlıklar içermektedir. Bu safsızlıklardan her birisi ise kendi başına immünojen görevi görerek monoklonal antikor yanıtı uyartabilir. Herhangi bir yapının immün yanıt uyarma kapasitesi ise immünojenite olarak adlandırılır. Nöraminidazın ise hem immünojenitesi hem de bu antijenler içerisindeki oranı bilinmemektedir.
- İmmünizasyonlar sırasında kullanımı en doğru antijen, her 3 nöraminidaz tipini de içeren ve düşük oranda safsızlıklar taşıdığı görülen, düşük saflıktaki antijen olarak nitelendirilen antijen ürünüdür. Orta saflıktaki antijen içeriğinde, köken aldığı düşük saflıktaki antijende yer almayan safsızlıklar taşımaktadır. Yüksek saflıktaki antijen ise 3 nöraminidaz tipinden yalnızca ikisini bulundurmaktadır.

- Antijenlerin içeriğinde bulunan safsızlıklara rağmen nöraminidaza özgün monoklonal antikorun elde edilebildiği düşünülmektedir. Ancak bunun alternatif yöntemlerle teyit edilmesinde fayda vardır.

- Hem immünizasyonlarda kullanım, hem de monoklonal antikorların doğrulanmasında daha yüksek saflıkta *C. perfringens* nöraminidaz antijenlerinin edinilmesi, rekombinant üretimi veya mevcut antijenlerin elde edilebilecek kaliteli bir antikorla saflaştırılması fayda sağlayabilir.

- Yüksek saflıkta olduğu kesin olarak bilinen antijenlerle Western blot uygulaması, ilgili antijeni taşıdığı net olarak bilinen ve bilinmeyen hücrelerin birlikte kullanımı veya diğer alternatif yöntemlerle antikor doğrulama testlerinin yapılması ve antikorların özgünlüklerinin net bir şekilde doğrulanması önem taşımaktadır (Edfors vd., 2018).

- Hibrit taramaları sırasında, antijenlerde bulunan safsızlıklara karşı gelişebilecek monoklonal antikorların elenebilmesi amacı ile, erken aşamalarda Western blot analizleri de yapılmalı ve antijen özgünlükleri doğrulanmalıdır.

- Laboratuvar ortamında, mevcut antijenlerin pozitif kontrol olarak kullanılması ile gerçekleştirilen indirekt ELISA'lar sorunsuz çalışmıştır. Sandviç ELISA deneyleri sırasında görülen yüksek gürültü sinyali alınmasının sebebi ikincil antikorların da ticari nöraminidazlara bağlanması ve düşük özgünlüğe sahip poliklonal antikorların kullanılması olabilir. Bu durumun ortadan kaldırılabilmesi için farklı ikincil antikorların kullanımı, mevcut antikordan afinite kromatografisi ile istenmeyen antikorların uzaklaştırılması, özgünlüğü daha yüksek poliklonal antikorların temin edilmesi ve/veya işaretçi enzimler taşıyan nöraminidaza özgü monoklonallerin geliştirilmesi adımları uygulanabilir.

- Çalışmayan sandviç ELISA deneylerinin olası sebebi, monoklonal antikorların ticari nöraminidaz formları içerisinde yer alan farklı nöraminidazları veya safsızlıkları tanıması olabilir. Ayrıca, aynı nöraminidazı tanıyan antikorlar arasında, antikor boyutu ve tercih edilen epitop yakınlığı sebepleri ile sterik uyumsuzluk da söz konusu olabilir. Bu durumda, Western blot ve diğer teknikler ile antikor-antijen ilişkilerinin daha iyi karakterize edilerek doğru eşleşmelerin sağlanması önemlidir. Sterik engel azaltıcı tedbirler ise ELISA plakalarının katı yüzeyleri yerine, lateks boncuklar gibi kısmi hareket olanağı tanıyan yapılara antikorların tutturulması, IgM'lerin indirgeyici ajanların kullanımı ile monomerize edilmesi, IgM'lerin enzimlerle muamele edilerek daha küçük formlarının oluşturulması ve antikora özgü ağır ve hafif zincir bilgilerinin edinilerek rekombinant antikor formlarının geliştirilmesi olabilir (Taussig vd., 2007; Kamatchi vd., 2016; Weller, 2016; Teye vd., 2017).

- Nöraminidazın tespiti için sandviç ELISA yaklaşımı terk edilerek yarışmalı ELISA tekniklerinin optimizasyonu denenebilir. Bu sayede antijeni aynı anda tanıyabilecek iki antikor bulma zorunluluğu da ortadan kalkacak, tek antikor ile çalışma gerçekleştirilebilecektir. Dezavantajı ise, analiz için enzim ile işaretlenmiş nöraminidazların kullanılmasının da gerekecek olması nedeni ile zorluk ve maliyetidir.
- IgM/IgM monoklonal antikorlarının kullanıldığı sandviç ELISA'ların uygulanabilmesi amacı ile aynı tipte nöraminidaza bağlandığı gösterilen IgM'lerden en az birisi saflaştırılarak yeni kombinasyonlar denenebilir. Alternatif olarak, farklı tipte hafif zincir taşıyanlar IgM tipi antikorların bulunması halinde, saflaştırma yapılmaksızın yeni kombinasyonlar oluşturulabilir ve hafif zincire özgü ikincil antikorlar kullanılarak analizler gerçekleştirilebilir.
- Nöraminidazın *C. perfringens* tanısında hedeflenebilir bir protein olup olmadığının anlaşılması için monoklonal antikorların iyileştirilmesine ihtiyaç duyulmaksızın, poliklonal IgG/IgG antikorları kullanılarak çalışmalar yürütülebilir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, *C. perfringens* nöraminidazlarını tanıyabilecek monoklonal antikorların geliştirilmesi ve geliştirilen antikorların kullanıldığı *C. perfringens* ELISA tanı kiti prototiplerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Monoklonal antikor üretimi için hibridoma tekniğinden yararlanılmış, antijen olarak ise ticari olarak edinilmiş *C. perfringens* nöraminidazları kullanılmıştır.

Çalışmalar sonucunda, IgM tipinde 26 farklı mAb elde edilmiştir. ELISA tekniği ile gerçekleştirilen çapraz reaksiyon testlerinde bu antikorlardan 19'unun hem BSA hem de süt tozu bloklamasında, 3'ünün yalnızca BSA bloklamasında, 4'ünün ise yalnızca süt tozu bloklamasında kullanılabileceği gösterilmiştir. Geliştirilen tüm antikorlar kullanılan ticari *C. perfringens* nöraminidaz ürününe karşı kuvvetli indirekt ELISA yanıtı oluşturmuştur. Ancak, bu antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen sandviç ELISA tekniğine dayalı, saha örneklerinde *C. perfringens* tanısı denemeleri ve *C. perfringens* tanı kiti prototiplerinde ise yanıt alınamamıştır. Sandviç ELISA uygulamalarının aynı anda aynı antijene bağlanabilen iki antikor kullanımı gereksinimi nedeni ile antikorların nöraminidaz özgünlüklerinin ortaya konulması amaçlanmış ve Western blot çalışmaları yürütülmüştür.

Test edilen antikorlardan 1C7, 3C5 ve 5A9'un 77 kDa bölgesine bağlandığı ve NanI'ya özgün olabileceği gösterilmiştir. Diğer antikorlarda ise spesifik olan veya olmayan bağlanma görüntülenememiştir. Bu nedenle, native jel elektroforezi sonrası Western blot uygulamasının yanı sıra, kullanılan antijen miktarı, antikor miktarı, bloklama çözeltisi optimizasyonları ile çalışmalar sürdürülmelidir. Ek deneme olarak, kullanılan ticari nöraminidaz ürünlerinin safsızlıklar taşıdığı ve sandviç ELISA kombinasyonlarında yer alan farklı araştırmacı veya firmalarca üretilmiş diğer birincil ve ikincil antikorların bu safsızlıkları da tanıdığı görülmüştür. Bu sebeplerle, prototipte yer alacak antikorların içeriği iyi bilinen antijenler ve nöraminidaz içermeyen hücrelerin kullanımı ile veya tanınan proteinin saflaştırılıp enzim aktivitesi incelenerek özgünlüklerinin teyit edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışma sürecinde, kullanılabilecek antikor üretim teknikleri arasından sahip olduğu *in vivo* antikor olgunlaştırma mekanizmaları ile yüksek afiniteye, çözünürlüğe, fizyolojik ve kimyasal dayanıma sahip antikorların geliştirilmesine olanak tanıyan hibridoma tekniği tercih edilmiş (Spencer vd., 2012; Rabia vd., 2018) ve başarı ile kullanılmıştır. Antijen tercihi yönünden ise *C. perfringens* nöraminidazları arasında ortak, *C. perfringens*'e özgü dizi bölgelerini taşıyan peptidlerin dizaynı ve antijen olarak kullanımı ile tam boyuttaki enzimlerin doğrudan kullanımı değerlendirilmiştir. Kısa peptidler yerine,

daha uzun bölgelerin veya tam boyut proteinlerin kullanımı doğru protein katlanmaları ve sunulan epitopları yönünden birden fazla hedefe özgün antikorlar gelişimine olanak verebilmesi yönünden avantajlıdır. Dezavantajı ise türler arası benzerlik taşıyan bölgelerin de sunulabilmesi, böylece hedef proteine karşı özgünlük sağlansa da tür özgünlüğü sağlanmasının güç olmasıdır (Li vd., 2014; Greenfield vd., 2021). Çalışmamızda, alanda güvenilir kabul edilen bir firma tarafından halihazırda *C. perfringens* nöraminidazının ticari, fonksiyonel ve saflaştırılmış formlarının piyasaya sunuluyor olması erişim kolaylığı yönünden de avantaj kabul edilmiş ve antijen olarak tam boyutlu enzimleri içeren bu ticari ürünler kullanılmıştır.

Çalışma dizaynında, yüksek saflıktaki antijene en çok ihtiyaç duyulan immünizasyonlar sırasında ticari formlar arasından yüksek saflıkta olanlar tercih edilmiştir. Hibrit taramaları ve çapraz reaksiyon analizlerinde ise orta saflıktaki nöraminidaz formu kullanılmıştır. Taramamalar sırasında, *C. perfringens*'in nöraminidazını tanımasının yanı sıra, tanı için geliştirilecek prototipte karşılaşılabilecek olası diğer antijenleri tanımadığının da detaylı bir şekilde ortaya konulması planlanmıştır. Bu amaçla, kanda yüksek oranda bulunan hayvan proteinleri ile de ayrıntılı çapraz reaksiyon testleri yürütülmüştür. Başarılı antikorların ise prototipte denenmesi ve son aşama olarak da edinilecek diğer canlı nöraminidazları ile de test edilmesi planlanmıştır. Çalışmalar sonucunda, ticari *C. perfringens* nöraminidazı ELISA'da tanıyabilen 26, hem ELISA hem Western blotta tanıyan 3 mAb geliştirilmiştir. Ancak, yapılan analizler kullanılan ticari ürünlerde safsızlıklar olduğunu da gösterdiğinden, ek doğrulama analizlerinin özgünlüğün teyit edilmesinde faydalı olacağı değerlendirilmektedir.

Elde edilen mAb'lar ile *C. perfringens* tanısına olanak verecek ELISA prototipi oluşturmaya çalışılmış, bu amaçla büyük moleküllerin tespitinde yaygın olarak kullanılan sandviç ELISA denemeleri yürütülmüştür (Rhiel ve Becker, 2021). Yapılan çalışmalarda ise düşük sinyal/gürültü oranına sahip, tekrarlanabilirlik yönünden sorunlu, bu sebeplerle de başarısız sonuçlar elde edilmiştir. Kendi başlarına indirekt ELISA'da yüksek afinite ile çalışan antikorların, sandviç ELISA'da kullanılabilmesi için antijene aynı anda, yüksek afinite ile bağlanabilen iki antikorlu kombinasyonlarının oluşturulması gerekmektedir. Bu sebeple, antikorların tanıdığı nöraminidaz tiplerine olan özgünlükleri de göz önüne alınarak ve sterik engel azaltıcı tedbirler uygulanarak yeni kombinasyonlarının oluşturulması gerekmektedir (Li vd., 2016; Weller, 2016). Ayrıca, kullanılan ikincil antikorlardan kaynaklanan gürültünün azaltılması amacı ile ikincil antikorların ek saflaştırmalarla

iyileştirilmesine, alternatiflerinin kullanılmasına veya işaretli primer antikorların elde edilmesi ihtiyaç vardır.

Monoklonal antikor üretimi elli yıla yaklaşan tarihi ile iyi karakterize edilmiş, yaygın kullanımı olan ve farklı avantajlar sunan birçok teknikten yararlanmaktadır. Ancak organizmaların doğrudan kullanıldığı hibridoma tekniğinden büyük ölçüde *in vitro* ilerleyen faj görüntüleme tekniğine kadar, kullanılan tüm teknikler canlıya özgü immün sistem ve gelişecek immün repertuarın öngörülemezliklerini taşımaktadır (Bradbury vd., 2018; Liu ve Wu, 2018). Geliştirilecek olan antikorların ise özgünlük ve yüksek afinite gibi temel özelliklerin yanı sıra, hedeflenen uygulamaya göre yüksek çözünürlük, ısı ve kimyasal dayanım, depolama dayanıklılığı gibi farklı özelliklere sahip olmasına da ihtiyaç duyulabilmektedir. Doğru organizma seçiminden, antijene, immünizasyon protokolünden, doğrulama metodolojisi ve hedef kullanıma uygunluğa kadar birçok süreç başarıda belirleyici rol oynamaktadır. Ek olarak, antikorların afinite, çözünürlük, ısıya dayanıklılık gibi bazı özellikleri hedef antikorun elde edilmesinden sonra da yüksek oranda geliştirilebilirken, en önemli özelliği olan özgünlüğü çalışma başlangıcında belirlenmek zorunda olan antijene bağlıdır ve sonradan limitli geliştirme potansiyeli taşımaktadır (Meliopoulos ve Schultz-Cherry, 2018; Simons vd., 2020; Liew vd., 2021).

Bu tez çalışması, hibridoma tekniği ile antikor geliştirme sürecinin dinamikliğini ve doğrulama çalışmalarının önemini de göstermektedir. Geliştirilecek olan herhangi bir immünolojik yöntemin başarısı antikorunun kalitesi ile yakından ilgilidir (Peruski ve Peruski, 2003). Yürütülen çalışmada antijenin seçimi, gelişen antikor tipinde belirleyici olabilecek immünizasyon takvimi uygulanması, çok sayıda antijen ile gerçekleştirilen çapraz reaksiyon analizleri, üretilen IgM tipi antikorların başarısını arttırabilecek sandviç ELISA prototip optimizasyonları ile çalışmaya yön verilmeye çalışılmıştır. Antijendeki safsızlıklar ve IgM tipi antikora yönelik, çalışma başarısını artırıcı çözümler üretilmeye çalışılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile *C. perfringens* nöraminidazlarına karşı IgM tipinde 26 farklı mAb üretilmiş, bunlardan 3 tanesinin ELISA tekniğinin yanı sıra, Western blot tekniğinde de uygulanabileceği gösterilmiştir. Sandviç ELISA tekniğine dayanan, *C. perfringens* tanısında nöraminidaz kullanımının incelenmesini sağlayacak prototipler ise, uyumlu antikor çiftleri bulunamaması nedeni ile oluşturulamamıştır. Ek olarak, tesadüfen BSA proteinine yüksek afinite gösteren, IgM tipindeki 4F3 mAb da elde edilmiştir. Alandaki çalışmaların devam etmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuçlar, antikor geliştirme

alışmalarında karşılaşılan sürecin dinamikliğinin gösterilmesi ve çok yönlü doğrulama çalışmalarını yürütölmesinin önemini de ortaya koymaktadır.



KAYNAKLAR

- Abdelsalam, M., 2017. Potential Role of Anaerobic Bacteria as Fish Pathogens. *Journal Of Aquaculture Research And Development*, 08.
- Abdolmohammadi Khiav, L., Zahmatkesh, A., 2021. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. *Tropical Animal Health And Production*, 53, 1–12.
- Abubackar, H.N., Veiga, M.C., Kennes, C., 2015. Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. *Bioresource Technology*, 186, 122–127.
- Adcock, P.W., Saint, C.P., 2001. Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using chromogenic and fluorogenic substrates. *Applied And Environmental Microbiology*, 67, 4382–4.
- Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschlaeger, N., Frey, J., Miserez, R., Abril, C., 2008. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 127, 179–185.
- Andrew, S.M., Titus, J.A., 2001. Purification of Immunoglobulin G. İçinde: Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, s. Unit 2.7.
- Berry, P.R., Rodhouse, J.C., Hughes, S., Bartholomew, B.A., Gilbert, R.J., 1988. Evaluation of ELISA, RPLA, and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens. *Journal Of Clinical Pathology*, 41, 458–461.
- Berth, M., Delanghe, J., 2004. Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of the literature. *Acta Clinica Belgica*, 59, 263–273.
- Boraston, A.B., Ficko-Blean, E., Healey, M., 2007. Carbohydrate Recognition by a Large Sialidase Toxin from *Clostridium perfringens*†. *Biochemistry*, 46, 11352–11360.
- Bradbury, A.R.M., Trinklein, N.D., Thie, H., Wilkinson, I.C., Tandon, A.K., Anderson, S., Bladen, C.L., Jones, B., Aldred, S.F., Bestagno, M., Burrone, O., Maynard, J., Ferrara, F., Trimmer, J.S., Görnemann, J., Glanville, J., Wolf, P., Frenzel, A., Wong, J., Koh, X.Y., Eng, H.Y., Lane, D., Lefranc, M.P., Clark, M., Dübel, S., 2018. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *MAbs*, 10, 539.
- Buschiazzo, A., Alzari, P.M., 2008. Structural insights into sialic acid enzymology. *Current Opinion In Chemical Biology*, 12, 565–572.
- Chen, K., Ahmed, S., Sheng, Y.J., Sun, C., Deng, C.L., Ojha, S.C., 2020. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification-based assays for clostridium perfringens-associated diseases: A systematic review and meta-analysis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 58.

- Chiarezza, M., Lyras, D., Pidot, S.J., Flores-Diaz, M., Awad, M.M., Kennedy, C.L., Corder, L.M., Phumoonna, T., Poon, R., Hughes, M.L., Emmins, J.J., Alape-Giron, A., Rood, J.I., 2009. The NanI and NanJ Sialidases of *Clostridium perfringens* Are Not Essential for Virulence. *Infection And Immunity*, 77, 4421–4428.
- Corkrey, R., McMeekin, T.A., Bowman, J.P., Olley, J., Ratkowsky, D., Ross, T., 2018. The maximum growth rate of life on Earth. *International Journal Of Astrobiology*, 17, 17–33.
- Corrêa, A.L., Senna, J.P.M., de Sousa, Á.P.B., 2016. Effects of passage number on growth and productivity of hybridoma secreting MRSA anti-PBP2a monoclonal antibodies. *Cytotechnology*, 68, 419–427.
- Cortés-Sánchez, A.D.J., 2018. *Clostridium perfringens* in foods and fish. *Regulatory Mechanisms In Biosystems*, 9, 112–117.
- Daneshmand, A., Kermanshahi, H., Mohammed, J., Sekhavati, M.H., Javadmanesh, A., Ahmadian, M., Alizadeh, M., Razmyar, J., Kulkarni, R.R., 2021. Intestinal changes and immune responses during *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. *Poultry Science*, 101652.
- Das, S., Majumder, S., Nag, M., Kingston, J.J., 2019. A sandwich duplex immuno PCR for rapid and sensitive identification of *Clostridium perfringens* alpha and enterotoxin. *Anaerobe*, 57, 63–74.
- Edfors, F., Hober, A., Linderbäck, K., Maddalo, G., Azimi, A., Sivertsson, Å., Tegel, H., Hober, S., Szigyarto, C.A.K., Fagerberg, L., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lindskog, C., Forsström, B., Uhlen, M., 2018. Enhanced validation of antibodies for research applications. *Nature Communications* 2018 9:1, 9, 1–10.
- Feng, C., Li, J., Snyder, G., Huang, W., Goldblum, S.E., Chen, W.H., Wang, L.-X.X., McClane, B.A., Cross, A.S., 2017. Antibody against microbial neuraminidases recognizes human sialidase 3 (NEU3): The neuraminidase/sialidase superfamily revisited. *MBio*, 8.
- Fernandez-Miyakawa, M.E., Fisher, D.J., Poon, R., Sayeed, S., Adams, V., Rood, J.I., McClane, B.A., Uzal, F.A., 2007. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infection And Immunity*, 75, 1443–1452.
- Figueiredo, G.G.O., Lopes, V.R., Romano, T., Camara, M.C., 2020. *Clostridium*. *Beneficial Microbes In Agro-Ecology*, 477–491.
- Fisher, D.J., Miyamoto, K., Harrison, B., Akimoto, S., Sarker, M.R., McClane, B.A., 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Molecular Microbiology*, 56, 747–762.
- Flanagan, J.J., Tweten, R.K., Johnson, A.E., Heuck, A.P., 2009. Cholesterol exposure at the membrane surface is necessary and sufficient to trigger perfringolysin O binding. *Biochemistry*, 48, 3977–87.

- Fleming, S., 1985. Enterotoxemia in neonatal calves. *The Veterinary Clinics Of North America. Food Animal Practice*, 1, 509–14.
- Freedman, J.C., Shrestha, A., McClane, B.A., 2016. Clostridium perfringens enterotoxin: Action, genetics, and translational applications. *Toxins*, 8, 73.
- Fuller, S.A., Takahashi, M., Hurrell, J.G.R., 1988. Cloning of Hybridoma Cell Lines by Limiting Dilution. *Current Protocols In Molecular Biology*, 1, 11.8.1-11.8.2.
- Gagnon, P., Hensel, F., Richieri, R., 2008. Purification of IgM monoclonal antibodies. *BioPharm International*, 21, 26.
- Garcia, J.P., Beingesser, J., Fisher, D.J., Sayeed, S., McClane, B.A., Posthaus, H., Uzal, F.A., 2012. The effect of Clostridium perfringens type C strain CN3685 and its isogenic beta toxin null mutant in goats. *Veterinary Microbiology*, 157, 412–419.
- Gerwig, G.J., 2021. Analysis of Sialic Acids Sialic acids. İçinde: Gerwig, G.J. (Ed.), The Art of Carbohydrate Analysis. Springer International Publishing, Cham, ss. 229–243.
- Gibert, M., Jolivet-Reynaud, C., Popoff, M.R., Jolivet-Renaud, C., 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens. *Gene*, 203, 65–73.
- Gilda, J.E., Ghosh, R., Cheah, J.X., West, T.M., Bodine, S.C., Gomes, A. V., 2015. Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLOS ONE*, 10, e0135392.
- Greenfield, E.A., DeCaprio, J., Brahmandam, M., 2021. Selecting the Antigen. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021, pdb.top099945.
- Gubash, S.M., Ingham, L., 1997. Comparison of a new, bismuth-iron-sulfite-cycloserine agar for isolation of Clostridium perfringens with the tryptose-sulfite-cycloserine and blood agars. *Zentralblatt Fur Bakteriologie: International Journal Of Medical Microbiology*, 285, 397–402.
- Guo, P., Zhang, K., Ma, X., He, P., 2020. Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges. *Journal Of Animal Science And Biotechnology*, 11, 1–10.
- Hanly, W.C., Artwohl, J.E., Bennett, B.T., 1995. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal*, 37, 93–118.
- Haque, S., Sharma, R.K., Barman, N.N., Devi, L.B., Barkalita, L.M., Hussain, I., 2018. Characterization of enterotoxin producing clostridium perfringens isolated from foods of animal origin. *Indian Journal Of Animal Research*, 52, 111–115.
- Hoffmann, S., Ahn, J.-W., 2021. Economic cost of major foodborne illnesses increased \$2 billion from 2013 to 2018. *Amber Waves: The Economics Of Food, Farming, Natural Resources, And Rural America*, 2021.
- Hold, G.L., Pryde, S.E., Russell, V.J., Furrie, E., Flint, H.J., 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 33–39.

- Holmes, K., Lantz, L.M., Fowlkes, B.J., Schmid, I., Giorgi, J. V., 2001. Preparation of Cells and Reagents for Flow Cytometry. *Current Protocols In Immunology*, 44.
- IGM Biosciences, 2020. Structural comparison of IgG and IgM Antibodies- IGM Biosciences [WWW Document]. URL <https://igmbio.com/technology/structural-comparison-of-igg-and-igm/> (Erişim Tarihi: 28.12.2021).
- Ishioka, T., Aihara, Y., Carle, Y., Shigemura, H., Kubomura, A., Motoya, T., Nakamoto, A., Nakamura, A., Fujimoto, S., Hirai, S., Oishi, K., Nagaoka, H., Kimura, H., Murakami, K., 2020. Contrasting Results from Two Commercial Kits Testing for the Presence of *Clostridium perfringens* Enterotoxin in Feces from Norovirus-Infected Human Patients. *Clinical Laboratory*, 66, 929–936.
- Janvilisri, T., Scaria, J., Gleed, R., Fubini, S., Bonkosky, M.M., Gröhn, Y.T., Chang, Y.F., 2010. Development of a microarray for identification of pathogenic *Clostridium* spp. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease*, 66, 140–147.
- Josic, D., Lim, Y.-P., 2001. Analytical and preparative methods for purification of antibodies. *Food Technology And Biotechnology*, 39, 215–226.
- Kadra, B., Guillou, J.P., Popoff, M., Bourlioux, P., 1999. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunology And Medical Microbiology*, 24, 259–66.
- Kamatchi, R., Charumathi, J., Ravishankaran, R., Kaliraj, P., Meenakshisundaram, S., 2016. Construction and bacterial expression of a recombinant single-chain antibody fragment against *Wuchereria bancrofti* SXP-1 antigen for the diagnosis of lymphatic filariasis. *Journal Of Helminthology*, 90, 74–80.
- Keyburn, A.L., Bannam, T.L., Moore, R.J., Rood, J.I., 2010. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins*, 2, 1913–27.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I., Moore, R.J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*, 4.
- Keyt, B.A., Baliga, R., Sinclair, A.M., Carroll, S.F., Peterson, M.S., 2020. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. *Antibodies 2020, Vol. 9, Page 53*, 9, 53.
- Kiu, R., Hall, L.J., 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes And Infections*, 7, 1–15.
- Koseki, K., Wada, T., Hosono, M., Hata, K., Yamaguchi, K., Nitta, K., Miyagi, T., 2012. Human cytosolic sialidase NEU2-low general tissue expression but involvement in PC-3 prostate cancer cell survival. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 428, 142–149.

- Krishnan, L., Dicaire, C.J., Patel, G.B., Sprott, G.D., 2000. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: Comparison to conventional liposomes and alum. *Infection And Immunity*, 68, 54–63.
- Labbe, R.G., Huang, T.H., 1995. Generation Times and Modeling of Enterotoxin-Positive and Enterotoxin-Negative Strains of *Clostridium perfringens* in Laboratory Media and Ground Beef. *Journal Of Food Protection*, 58, 1303–1306.
- Law, J.W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., Lee, L.-H., 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers In Microbiology*, 5, 1–19.
- Lebrun, M., Mainil, J.G., Linden, A., 2010. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *The Veterinary Record*, 167, 13–22.
- Lee, G.M., Varma, A., Palsson, B.O., 1991. Application of Population Balance Model to the Loss of Hybridoma Antibody Productivity. *Biotechnology Progress*, 7, 72–75.
- Lee, S.H., Han, B.S., Choe, J., Sin, J.I., 2017. Preferential production of IgM-secreting hybridomas by immunization with DNA vaccines coding for Ebola virus glycoprotein: Use of protein boosting for IgG-secreting hybridoma production. *Clinical And Experimental Vaccine Research*, 6, 135–145.
- Lewis, A.L., Lewis, W.G., 2012. Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. *Cellular Microbiology*, 14, 1174–1182.
- Li, J., McClane, B.A., 2014. The Sialidases of *Clostridium perfringens* Type D Strain CN3718 Differ in Their Properties and Sensitivities to Inhibitors. *Applied And Environmental Microbiology*, 80, 1701–1709.
- Li, J., McClane, B.A., 2018. NanI Sialidase Can Support the Growth and Survival of *Clostridium perfringens* Strain F4969 in the Presence of Sialylated Host Macromolecules (Mucin) or Caco-2 Cells. *Infection And Immunity*, 86.
- Li, J., Sayeed, S., Robertson, S., Chen, J., McClane, B.A., 2011. Sialidases Affect the Host Cell Adherence and Epsilon Toxin-Induced Cytotoxicity of *Clostridium perfringens* Type D Strain CN3718. *PLoS Pathogens*, 7, e1002429.
- Li, J., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2016. *Clostridium perfringens* Sialidases: Potential Contributors to Intestinal Pathogenesis and Therapeutic Targets. *Toxins*, 8.
- Li, W., Joshi, M.D., Singhanian, S., Ramsey, K.H., Murthy, A.K., 2014. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines 2014, Vol. 2, Pages 515-536*, 2, 515–536.
- Liew, O.W., Ling, S.S.M., Lilyanna, S., Zhou, Y., Wang, P., Chong, J.P.C., Ng, Y.X., Lim, A.E.S., Leong, E.R.Y., Lin, Qifeng, Lim, T.K., Lin, Qinsong, Ng, E.M.W., Ng, T.W., Richards, A.M., 2021. Epitope-directed monoclonal antibody production using a mixed antigen cocktail facilitates antibody characterization and validation. *Communications Biology* 2021 4:1, 4, 1–17.

- Lin, A., Kase, J.A., Moore, M.M., Son, I., Tran, N., Clotilde, L.M., Jarvis, K., Jones, K., Kasturi, K., Nabe, K., Nucci, M., Wagley, G.S., Wang, F., Ge, B., Hammack, T.S., 2013. Multilaboratory validation of a luminex microbead-based suspension array for the identification of the 11 most clinically relevant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O serogroups. *Journal Of Food Protection*, 76, 867–70.
- Liu, X., Wu, J., 2018. History, applications, and challenges of immune repertoire research. *Cell Biology And Toxicology*, 34, 441–457.
- Lucey, B.P., Hutchins, G.M., 2004. William H. Welch, MD, and the discovery of *Bacillus welchii*. *Archives Of Pathology & Laboratory Medicine*, 128, 1193–5.
- Maida, I., Bosi, E., Perrin, E., Papaleo, M.C., Orlandini, V., Fondi, M., Fani, R., Wiegel, J., Bianconi, G., Canganella, F., 2013. Draft Genome Sequence of the Fast-Growing Bacterium *Vibrio natriegens* Strain DSMZ 759. *Genome Announcements*, 1.
- Matsushita, O., Yoshihara, K., Katayama, S., Minami, J., Okabe, A., 1994. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal Of Bacteriology*, 176, 149–56.
- McClane, B.A., Robertson, S.L., Li, J., 2013. *Clostridium perfringens*. İçinde: Food Microbiology. American Society of Microbiology, ss. 465–489.
- McClane, B.A., Rood, J.I., 2005. Clostridial Toxins Involved in Human Enteric and Histotoxic Infections. İçinde: Clostridia. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, FRG, ss. 169–209.
- Mehdizadeh Gohari, I., A. Navarro, M., Li, J., Shrestha, A., Uzal, F., A. McClane, B., 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*, 12, 723–753.
- Meliopoulos, V.A., Schultz-Cherry, S., 2018. Although it's painful: The importance of stringent antibody validation. *PLoS Pathogens*, 14, e1006701.
- Mitchell, R.J., Kim, J.S., Jeon, B.S., Sang, B.I., 2009. Continuous hydrogen and butyric acid fermentation by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755: effects of the glucose concentration and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 100, 5352–5355.
- Miyashiro, S., Nassar, A.F.C., Del Fava, C., Cabral, A.D., Silva, M., 2007. *Clostridium perfringens* types A and D associated with enterotoxemia in an 18-month-old goat. *Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*, 13, 885–893.
- Momose, Y., Maruyama, A., Iwasaki, T., Miyamoto, Y., Itoh, K., 2009. 16S rRNA gene sequence-based analysis of clostridia related to conversion of germfree mice to the normal state. *Journal Of Applied Microbiology*, 107, 2088–2097.

- Myers, G.S.A., Rasko, D.A., Cheung, J.K., Ravel, J., Seshadri, R., DeBoy, R.T., Ren, Q., Varga, J., Awad, M.M., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Haft, D.H., Dodson, R.J., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S.A., Khouri, H., Dimitrov, G.I., Watkins, K.L., Mulligan, S., Benton, J., Radune, D., Fisher, D.J., Atkins, H.S., Hiscox, T., Jost, B.H., Billington, S.J., Songer, J.G., McClane, B.A., Titball, R.W., Rood, J.I., Melville, S.B., Paulsen, I.T., 2006. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Research*, 16, 1031–1040.
- Nagano, Y., Itoh, K., Honda, K., 2012. The induction of Treg cells by gut-indigenous *Clostridium*. *Current Opinion In Immunology*, 24, 392–397.
- Nair, G.B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, M.K., Krishnan, T., Ganguly, S., Saha, D.R., Rajendran, K., Manna, B., Ghosh, M., Okamoto, K., Takeda, Y., 2010. Emerging trends in the etiology of enteric pathogens as evidenced from an active surveillance of hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. *Gut Pathogens*, 2, 4.
- Navarro, M.A., Li, J., McClane, B.A., Morrell, E., Beingesser, J., Uzala, F.A., 2018. NanI Sialidase Is an Important Contributor to *Clostridium perfringens* Type F Strain F4969 Intestinal Colonization in Mice. *Infection And Immunity*, 86.
- Neuraminidase - The Human Protein Atlas [WWW Document], 2021. URL <https://www.proteinatlas.org/search/neuraminidase> (Erişim Tarihi: 26.12.2021).
- Noor Mohammadi, T., Shen, C., Li, Y., Zayda, M.G., Sato, J., Masuda, Y., Honjoh, K., Miyamoto, T., 2022. Characterization of *Clostridium perfringens* bacteriophages and their application in chicken meat and milk. *International Journal Of Food Microbiology*, 361, 109446.
- Num, S.M., Useh, N.M., 2014. *Clostridium*: pathogenic roles, industrial uses and medicinal prospects of natural products as ameliorative agents against pathogenic species. *Jordan Journal Of Biological Sciences (JJBS)*, 7, 81–94.
- Paweska, J.T., Burt, F.J., Swanepoel, R., 2005. Validation of IgG-sandwich and IgM-capture ELISA for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans. *Journal Of Virological Methods*, 124, 173–181.
- Peruski, A.H., Peruski, L.F., 2003. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 506–513.
- Popoff, M.R., 1998. Interactions between bacterial toxins and intestinal cells. *Toxicon : Official Journal Of The International Society On Toxinology*, 36, 665–85.
- Popoff, M.R., 2016. Toxins of Histotoxic *Clostridia*. *Clostridial Diseases Of Animals*, Wiley Online Books,.
- Popoff, M.R., Bouvet, P., 2009. Clostridial toxins. *Future Microbiology*, 4, 1021–1064.
- Prescott, J.F., 2016. Brief Description of Animal Pathogenic *Clostridia*. İçinde: *Clostridial Diseases in Animals*. John Wiley & Sons, ss. 13–19.

- Rabia, L.A., Desai, A.A., Jhaji, H.S., Tessier, P.M., 2018. Understanding and overcoming trade-offs between antibody affinity, specificity, stability and solubility. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 365–374.
- Redondo, L.M., Redondo, E.A., Dailoff, G.C., Leiva, C.L., Díaz-Carrasco, J.M., Bruzzone, O.A., Cangelosi, A., Geoghegan, P., Fernandez-Miyakawa, M.E., 2017. Effects of *Clostridium perfringens* iota toxin in the small intestine of mice. *Anaerobe*, 48, 83–88.
- Rhiel, L., Becker, S., 2021. Applications of Antibodies in Therapy, Diagnosis, and Science. In: Rüker, F., Wozniak-Knopp, G. (Ed.), *Introduction to Antibody Engineering*. Springer International Publishing, Cham, ss. 129–159.
- Richeson, J.T., Hughes, H.D., Broadway, P.R., Carroll, J.A., 2019. Vaccination Management of Beef Cattle: Delayed Vaccination and Endotoxin Stacking. *The Veterinary Clinics Of North America. Food Animal Practice*, 35, 575.
- Rodriguez-Walker, M., Daniotti, J.L., 2017. Human Sialidase Neu3 is S-Acylated and Behaves Like an Integral Membrane Protein. *Scientific Reports*, 7.
- Roggentin, P., Schauer, R., Hoyer, L.L., Vimr, E.R., 1993. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Molecular Microbiology*, 9, 915–921.
- Rood, J.I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B.A., Melville, S.B., Moore, R.J., Popoff, M.R., Sarker, M.R., Songer, J.G., Uzal, F.A., Van Immerseel, F., 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, 53, 5.
- Rood, J.I., Cole, S.T., 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews*, 55, 621–48.
- Satyavarapu, E.M., Nath, S., Mandal, C., 2021. Desialylation of Atg5 by sialidase (Neu2) enhances autophagosome formation to induce anchorage-dependent cell death in ovarian cancer cells. *Cell Death Discovery* 2021 7:1, 7, 1–16.
- Sayed, S., Uzal, F.A., Fisher, D.J., Saputo, J., Vidal, J.E., Chen, Y., Gupta, P., Rood, J.I., McClane, B.A., 2008. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Molecular Microbiology*, 67, 15–30.
- Scharff, R.L., 2012. Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *Journal Of Food Protection*, 75, 123–131.
- Schoch, C.L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S., Karsch-Mizrachi, I., 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: The Journal Of Biological Databases And Curation*, 2020.
- Schwerdtfeger, S.M., Melzig, M.F., Melzig, M.M., 2010. Sialidases in biological systems. *Pharmazie*, 65, 551–561.
- Severi, E., Hood, D.W., Thomas, G.H., 2007. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 153, 2817–2822.

- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H., 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99, 996–1001.
- Silva, R.O.S., Oliveira Junior, C.A., Guedes, R.M.C., Lobato, F.C.F., Silva, R.O.S., Oliveira Junior, C.A., Guedes, R.M.C., Lobato, F.C.F., 2015. *Clostridium perfringens*: a review of the disease in pigs, horses and broiler chickens. *Ciência Rural*, 45, 1027–1034.
- Simons, J.F., Lim, Y.W., Carter, K.P., Wagner, E.K., Wayham, N., Adler, A.S., Johnson, D.S., 2020. Affinity maturation of antibodies by combinatorial codon mutagenesis versus error-prone PCR. *MAbs*, 12.
- Simpson, K., Browning, M., 2017. Antibodies That Work Again and Again and Again. *Içinde: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. ss. 41–59.
- Smith, S., Schaffner, D.W., 2004. Evaluation of a *Clostridium perfringens* predictive model, developed under isothermal conditions in broth, to predict growth in ground beef during cooling. *Applied And Environmental Microbiology*, 70, 2728–33.
- Spencer, S., Bethea, D., Raju, T.S., Giles-Komar, J., Feng, Y., 2012. Solubility evaluation of murine hybridoma antibodies. *MAbs*, 4, 319.
- Sridapan, T., Tangkawsakul, W., Janvilisri, T., Kiatpathomchai, W., Dangtip, S., Ngamwongsatit, N., Nacapricha, D., Ounjai, P., Chankhamhaengdech, S., 2021. Rapid detection of *Clostridium perfringens* in food by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow biosensor. *PLOS ONE*, 16, e0245144.
- Stanker, L.H., Hnasko, R.M., 2015. A double-sandwich ELISA for identification of monoclonal antibodies suitable for sandwich immunoassays. *Methods In Molecular Biology*,.
- Taussig, M.J., Stoevesandt, O., Borrebaeck, C.A.K., Bradbury, A.R., Cahill, D., Cambillau, C., de Daruvar, A., Dübel, S., Eichler, J., Frank, R., Gibson, T.J., Gloriam, D., Gold, L., Herberg, F.W., Hermjakob, H., Hoheisel, J.D., Joos, T.O., Kallioniemi, O., Koegl, M., Konthur, Z., Korn, B., Kremmer, E., Krobisch, S., Landegren, U., van der Maarel, S., McCafferty, J., Muyldermans, S., Nygren, P.Å., Palcy, S., Plückthun, A., Polic, B., Przybylski, M., Saviranta, P., Sawyer, A., Sherman, D.J., Skerra, A., Templin, M., Ueffing, M., Uhlén, M., 2007. ProteomeBinders: planning a European resource of affinity reagents for analysis of the human proteome. *Nature Methods*, 4, 13–17.
- Teye, K., Hashimoto, K., Numata, S., Ohta, K., Haftek, M., Hashimoto, T., 2017. Multimerization is required for antigen binding activity of an engineered IgM/IgG chimeric antibody recognizing a skin-related antigen. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7, 1–12.
- Theoret, J.R., Li, J., Navarro, M.A., Garcia, J.P., Uzal, F.A., McClane, B.A., 2018. Native or Proteolytically Activated NanI Sialidase Enhances the Binding and Cytotoxic Activity of *Clostridium perfringens* Enterotoxin and Beta Toxin. *Infection And Immunity*, 86.

- Traving, C., Schauer, R., 1998. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular And Molecular Life Sciences (CMLS)*, 54, 1330–1349.
- Uhlen, M., 2017. Response to: Should we ignore western blots when selecting antibodies for other applications? *Nature Methods* 2017 14:3, 14, 215–216.
- Uzal, F.A., Freedman, J.C., Shrestha, A., Theoret, J.R., Garcia, J., Awad, M.M., Adams, V., Moore, R.J., Rood, J.I., McClane, B.A., 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiology*, 9, 361–77.
- Uzal, F.A., McClane, B.A., Cheung, J.K., Theoret, J., Garcia, J.P., Moore, R.J., Rood, J.I., 2015. Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. *Veterinary Microbiology*, 179, 23–33.
- Uzal, F.A., Vidal, J.E., McClane, B.A., Gurjar, A.A., 2010. *Clostridium Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *The Open Toxinology Journal*, 2, 24–42.
- Vernacchio, L., Vezina, R.M., Mitchell, A.A., Lesko, S.M., Plaut, A.G., Acheson, D.W.K., 2006. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: Incidence, clinical presentation and microbiology. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 25, 2–7.
- Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L., Steenbergen, S.M., 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology And Molecular Biology Reviews : MMBR*, 68, 132–53.
- Wade, B., Keyburn, A., 2015. The true cost of necrotic enteritis. *Poultry World*,.
- Wandstt, J.R., Carlont, R.I., Schoemaker, H., Isselbachert, K.J., Zurawski, V.R., 1981. Immunodiagnosis of hepatitis B with high-affinity IgM monoclonal antibodies* (radioimmunoassay/hepatitis B surface antigen/hybridomas). *Medical Sciences*, 78, 1214–1218.
- Wang, B., Dong, W., Ma, L., Dong, Y., Wang, S., Yuan, Y., Ma, Q., Xu, J., Yan, W., Nan, J., Zhang, Q., Xu, W., Ma, B., Chu, Y., Zhang, J., Li, L., Li, Y., 2021. Prevalence and Genetic Diversity of *Clostridium perfringens* Isolates in Hospitalized Diarrheal Patients from Central China. *Infection And Drug Resistance*, 14, 4783.
- Wang, Y.H., 2020. Sialidases From *Clostridium perfringens* and Their Inhibitors. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*,.
- Welch, W.H., Nuttall, G.H.F., 1892. A Gas-Producing Bacillus (*Bacillus Aerogenes Capsulatus*, Nov. Spec.) Capable of Rapid Development in the Blood-Vessels After Death. *The Johns Hopkins Hospital Bulletin*, 81–91.
- Weller, M.G., 2016. Quality Issues of Research Antibodies. *Analytical Chemistry Insights*, 11, 21–7.
- Winogradsky, S.N., 1895. Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. *Archives Des Sciences (St. Petersburg) Biologiques*, 3, 297–352.

- Yang, H., Lu, L., Chen, X., 2021. An overview and future prospects of sialic acids. *Biotechnology Advances*, 46, 107678.
- Yokoyama, W.M., 2001. Monoclonal Antibody Supernatant and Ascites Fluid Production. İçinde: *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Zaragoza, N.E., Orellana, C.A., Moonen, G.A., Moutafis, G., Marcellin, E., 2019. Vaccine production to protect animals against pathogenic clostridia. *Toxins*, 11, 525.
- Zhang, B.-W., Li, M., Ma, L.-C., Wei, F.-W., 2006. A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. *Biochemical Genetics*, 44, 494–503.

