

39970

**SDS-PAGE, AGAROSE VE CELLULOSE ASETATE TEKNİKLERİ
KULLANILARAK FARELERDE (*Mus musculus* var. *albinus*)
OLUŞAN ANYONİK İMMÜNGLOBULİN PRODÜKSİYONUNUN
SAPTANMASI**

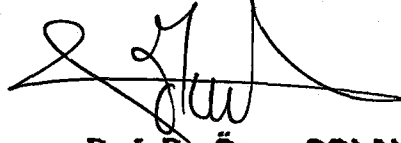
HATİCE KORKMAZ

**Ç. Ü.
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MASTER TEZİ**

**ADANA
OCAK 1995**

Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında MASTER tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan

Prof. Dr. Ömer ÇOLAK



Üye

Yrd. Doç. Dr. Burhan ARIKAN

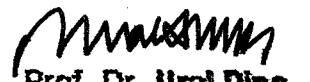
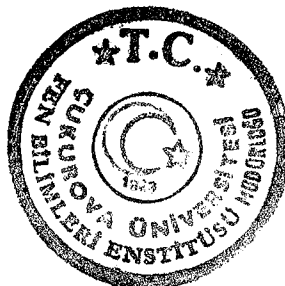


Üye

Yrd. Doç. Dr. Sadık DİNÇER

Kod No: 2007

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. Ural Dinç
Enstitü Müdürü

**BU ÇALIŞMA ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ ARAŞTIRMA FONU
TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.**

PROJE NO: FBE 94-97

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: PROF. DR. ÖMER ÇOLAK

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	I
Şekil listesi	II
ÖZ	III
ABSTRACT	IV
1. GİRİŞ	1
1.1. İmmünoloji	1
1.1.1. Antijenler	3
1.1.2. Hücresel Antijenler	3
1.1.3. Heterofil Antijenler	3
1.1.4. İzofil Antijenler	4
1.1.5. Kan Grubu (ABO) Antijenleri	4
1.1.6. Mikroorganizma Antijenleri	4
1.1.6.1. Kapsül Antijenleri	4
1.1.6.2. Hücre Duvarı Antijenleri	4
1.1.6.3. Kirpik Antijenleri	4
1.1.6.4. Hücre Dışı Antijenler	5
1.1.7. Bir Maddenin Antijen Özelliği Gösterebilmesinde Etkili Olan Başlıca Özellikler	5
1.1.7.1. Canlıların Genetik Yapısı	5
1.1.7.2. Molekül Büyüklüğü	5
1.1.7.3. Antijen Verme Metodu	5
1.1.7.4. Canlıların Türü, Yaşı ve Cinsiyeti	6
1.1.7.5. Molekülün Kimyasal Yapısı	6
1.1.7.6. Adjuvantların Etkisi	6
1.1.8. Freund's Adjuvant	6
1.1.9. İmmün Globulinlerin Yapıları ve Fonksiyonları	7
1.1.10. Bağışık (İmmün) Cevap	9
1.1.11. İmmün Sistemin Organları	11
1.1.11.1. Kemik İliği	11
1.1.11.2. Timus	11

1.1.11.3. Dalak.....	12
1.1.11.4. Lenf Nodları.....	12
1.1.11.5. Peyer Plakları.....	12
1.1.12. Fare'nin Lenfoid Organları.....	13
1.1.13. İmmün Sistemin Hücreleri.....	14
1.1.13.1. Makrofajlar.....	14
1.1.13.2. Lenfositler.....	15
1.2. Elektroforez.....	17
1.2.1. Poliacylamide jeller.....	18
1.2.1.1. Jelin Yapısı ve Oluşumu.....	18
1.2.1.2. Polimerizasyon ve Katalizörler.....	18
1.2.1.3. Jeli Oluşturan Bileşenlerin Fizikokimyasal Özellikleri.....	19
1.2.1.4. Separating Jellerin Hazırlanması.....	20
1.2.1.5. Gradient-PAGE Jel Elektroforezi.....	21
1.2.1.6. SDS-Polyacrylamide Jel Elektroforezi.....	21
1.2.1.7. Polyacrylamide-Slab Jel Elektroforezi.....	22
1.2.1.8. Protein Bandlarını Saptama Yöntemleri.....	23
1.2.1.9. Polyacrylamide Jel elektroforez Uygulamalarındaki Hataların nedenleri.....	23
1.2.2. Filtre Kağıdı Elektroforezi.....	25
1.2.3. Cellulose Acetat Elektroforezi.....	25
1.2.4. Nişasta Jel Elektroforezi.....	26
1.2.5. İzoelektrik Focuslama.....	26
1.2.6. İki Boyutlu Elektroforez Tekniği.....	28
1.2.7. Agaroz Elektroforez Tekniği.....	29
1.2.8. İmmün Elektroforez Teknikleri.....	31
1.2.8.1. İki Boyutlu İmmün Elektroforez.....	31
1.2.8.2. Roket İmmün Elektroforez.....	31
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	31
3. MATERYAL VE METOD.....	36
3.1. MATERYAL.....	36

3.1.1. Polyacrylamide Jel Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler.....	37
3.1.1.1. Acrylamide Monomer Solüsyonu.....	37
3.1.1.2. Separating (Ayırma) Jel Tamponu.....	37
3.1.1.3. Stacking (Dengeleme) Jel Tamponu.....	37
3.1.1.4. SDS (Sodium-Dodecyl-Sulphate) Solüsyonu.....	37
3.1.1.5. Ammonium Persulphate	37
3.1.1.6. Elektrod (Running) Tamponu.....	37
3.1.1.7. TEMED.....	37
3.1.2. Solubilizasyon (Örnek Hazırlama) Tamponları.....	37
3.1.2.1. Fritz'in Solubilizasyon Tamponu.....	37
3.1.2.2. Laemmli Solubilizasyon Tamponu.....	37
3.1.3. Marker Proteinler.....	38
3.1.3.1. MW ND 500.....	38
3.1.3.2. Bovine Serum Albumin.....	38
3.1.4. Boyama Solüsyonları.....	38
3.1.4.1. Coomassie Brilliant Blue R-250.....	38
3.1.4.2. Boyadan Kurtarma (Destaining) Solüsyonu (CBB için).....	38
3.1.4.3. Ponceau S Boyama Solüsyonu.....	38
3.1.4.4. Boyadan Kurtarma (Ponceau S için).....	38
3.1.5. % 2'lik Gliserin.....	38
3.1.6. % 20'lik Sükroz.....	38
3.1.7. % 0.04'lük Bromophenol Blue.....	38
3.1.8. Agaroz Jel (% 0.8'lik).....	39
3.1.9. Kağıt Elektrophoret için Kullanılan Ekipman ve Çözeltiler.....	39
3.1.9.1. Barbitol Tampon.....	39
3.1.9.2. Selüloz poli asetat filtre.....	39
3.1.9.3. Madeni Yağ.....	39
3.1.10. Aşıların Hazırlanmasında Kullanılan Bakteriler.....	39
3.1.10.1. Gram Pozitif Bakteriler.....	39
3.1.10.2. Gram negatif Bakteriler.....	39
3.1.11. Bakteri Antijenleri.....	39
3.1.11.1. "H" Antijenleri.....	39
3.1.11.2. "O" Antijenleri.....	39
3.1.12. Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besi Yerleri.....	39

3.1.12.1. Buyyon.....	39
3.1.12.2. Chapman agarı.....	40
3.1.12.3. Vogel-Johnson Agarı.....	40
3.1.12.4. Kanlı Jeloz.....	41
3.1.12.5. MDCLS Agar.....	41
3.1.12.6. GSP Agar.....	41
3.1.12.7. Gela Buyyon.....	42
3.2. METOD.....	42
3.2.1. Bakteri İzolasyonları.....	42
3.2.1.1. <i>Staphylococcus</i> 'ların İzolasyonu.....	42
3.2.1.2. <i>Streptococcus</i> 'ların İzolasyonu.....	42
3.2.1.3. <i>Pseudomonas</i> 'ların İzolasyonu.....	42
3.2.1.4. <i>Klebsiella</i> 'ların İzolasyonu.....	43
3.2.2. Antijenlerin Hazırlanması.....	43
3.2.2.1. "O" antijenleri.....	43
3.2.2.2. "H" Antijenleri.....	43
3.2.3. Aşıların Uygulanması (İmmünizasyon).....	44
3.2.3.1. Farelerin Adjuvant Uygulanmadan Aşılanması.....	44
3.2.3.2. Freund's Complete Adjuvant Kullanarak Farelerin Aşılanması.....	45
3.2.4. Elektroforez deneyleri İçin Örneklerin Hazırlanması.....	45
3.2.4.1. Farelerin kesilmesi.....	45
3.2.4.2. Proteinlerin Ekstraksiyonu.....	46
3.2.4.2.1. Solubilizasyon Tamponu ile Ekstraksiyon.....	46
3.2.4.2.2. Denatüre Edilmeden (Dondurup-ezme) Ekstraksiyon.....	46
3.2.5. Akrilamid jellerin Hazırlanması.....	47
3.2.5.1. Homojen SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması.....	47
3.2.5.2. Stacking jel Hazırlama.....	47
3.2.5.3. SDS-PAGE Gradient Jellerin Hazırlanması.....	48
3.2.5.4. Nativ-PAGE Slab Jelinin Hazırlanması.....	50
3.2.5.5. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	50
3.2.6. Elektroforez deneyleri.....	50
3.2.6.1. Protein Örneklerinin Jele Uygulanması.....	50
3.2.6.2. Separasyon.....	51

3.2.6.3. Kağıt Elektroforezi ile Serum Proteinlerinin Separasyonu.....	52
3.2.7. Poliakrilamid jellerinin Boyanması.....	52
3.2.7.1. Coomassie Brilliant Blue ile Boyama.....	52
3.2.8. Selüloz Membranların Boyanması.....	52
3.2.9. Protein Bandlarının Moleküler Ağırlıklarının Hesaplanması.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	53
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	67
6. ÖZET.....	76
7. SUMMARY.....	77
8. KAYNAKLAR.....	78
9. TEŞEKKÜR.....	85
10.ÖZ GEÇMİŞ.....	86

TABLO LİSTESİ

**İ
Sayfa**

Tablo 1. Lenfoid Organların Alt Grupları: Lenfositler.....	13
Tablo 2. Polyacrylamid Jelleri Oluşturan Bileşenlerin Fiziksel Özellikleri.....	19
Tablo 3. Farklı Molekül Ağırlığına Sahip Makromoleküllerin Separasyonunda Kullanılan Jel Konsantrasyonları.....	24



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. İmmün Globulin Molekülünün Yapısı.....	7
Şekil 2. Fare'nin Lenfold Organları.....	14
Şekil 3. Lökositlerin Sınıflandırılması.....	15
Şekil 4. Fare'lere Antijenlerin Enjeksiyonu (Subkutan).....	44
Şekil 5. Kesilen Farelerden Organların Çıkarılması (Diseksiyon).....	45
Şekil 6. Gradient SDS-PAGE Jel Dökme Aparatı.....	49
Şekil 7. Akrilamid Jellerin Vertikal Olarak Uygulandığı Elektroforez Ekipmanı.....	51
Şekil 8. % 7.5'lik Homojen SDS-PAGE Jelinde Karaciğer ve Kalp Örneklerinin Separasyonu.....	54
Şekil 9. % 10'luk Homojen SDS-PAGE Jelinde Karaciğer ve Kalp Örneklerinin Separasyonu.....	55
Şekil 10. % 3.5-10'luk Gradient SDS-PAGE Jelinde Böbrek Örneklerinin Separasyonu.....	56
Şekil 11. %3.5-10'luk Gradient SDS-PAGE Jelinde (Adjuvant uygulanmasından sonra) Kan Serumlarının Separasyonu.....	57
Şekil 12. % 6-12'lik Gradient SDS-PAGE Jelinde Karaciğer, Böbrek ve Kalp Örneklerinin Separasyonu.....	58
Şekil 13. % 7-25'lik Gradient SDS-PAGE Jelinde Dalak ve Kalp Örneklerinin Separasyonu.....	59
Şekil 14. % 0.8'lik Agaroze Jelde Kan Serum Proteinlerinin Separasyonu.....	60
Şekil 15. % 7.5'lik Homojen Nativ-PAGE Jelinde Denatüre Edilmiş ve Edilmemiş Karaciğer Örneklerinin Separasyonu.....	61
Şekil 16. Kontrol Kan Serumuna Ait Kağıt Elektroforez Sonuçları.....	62
Şekil 17. <i>Staphylococcus</i> Antijeni ile Aşılanmış Fare Kan Serumlarının Kağıt Elektroforez Sonuçları.....	63
Şekil 18. <i>Streptococcus</i> Antijeni ile Aşılanmış Fare Kan Serumlarının Kağıt Elektroforez Sonuçları.....	64
Şekil 19. <i>Klebsiella</i> sp-2 Antijeni ile Aşılanmış Fare Kan Serumlarının Kağıt Elektroforez Sonuçları.....	65
Şekil 20. <i>Pseudomonas</i> Antijeni ile Aşılanmış Fare Kan Serumlarının Kağıt Elektroforez Sonuçları.....	66

Öz

Bu çalışmada çeşitli bakteri antijenlerinin *Mus musculus* var. *albinus* farelerinde immüitenin gelişmesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Karaciğer, kalp, dalak, böbrek ve serum örnekleri homojen SDS-PAGE, gradient SDS-PAGE, Nativ-PAGE, Agarose jel ve sellüloz asetat elektroforez teknikleri kullanılarak analiz edilmişlerdir.

En iyi immün cevabın adjuvantsız aşı uygulamasında karaciğer, adjuvantlı aşı uygulamasında ise karaciğer ve kalpte olduğu bulunmuştur. Bakteri antijenleri arasında *S. albus* ve *Klebsiella* sp. antijenleri yüksek immünojenik etki göstermiştir.

Elektroforez teknikleri arasında en başarılı separasyon 27 band ile gradient SDS-PAGE jelinde, en düşük separasyon 4 band ile agarose jelde gözlenmiştir. SDS-PAGE sistemlerinde çok sayıda protein fragmenti saptanırken, nativ-PAGE sisteminde fragment lerin sayıca azaldığı ve denatüre olmamış örneklerin hiç bandlaşma göstermediği bulunmuştur.

Kontrol örneklerine göre aşı uygulanmış örneklerde, daha yoğun ve ilk kez ortaya çıkan protein bandları immüitenin göstergesidir.

ABSTRACT

In this study, different bacteria antigens effect on improving immunity in *Mus musculus* var. *albinus* mice have been investigated. Liver, hearth, spleen, kidney and sera samples were analyzed by using such as homogen SDS-Page, gradient SDS-Page, Native-Page, agarose gel and cellulose acetate electrophoresis techniques respectively.

When antigens injected to mice without adjuvant, the best immune response was observed in liver but, antigen application with adjuvant the best immune response was obtained in liver and hearth. Among the bacteria antigens *S. albus* and *Klebsiella* sp. were showed the highest immunogenic effect.

Among electrophoresis techniques the most succesfull separation was obtained in gradient SDS-PAGE with 27 proteins fragments and the lowest separation was observed in agarose gel with 4 proteins fragments. A lot of proteins fragments were determined in SDS-PAGE systems. When Native-Page system used, protein fragments were decreased and no band in nondenaturated samples.

When compared control and other samples, some protein fragments first placed and some of them were more dense in antigen application lines according to controls. This findings are indicating of immunity.

1. GİRİŞ

Antijen özelliği taşıyan proteinlerin memeli hayvan hücrelerinde meydana getirdiği bağışık cevap etkenin tipine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Özellikle daha önce uyarılmış lenfositlerin, ikinci kez aynı etkenle karşılaştığında bakteriyel ve viral hastalıklarda organizmanın koruyucusu şeklinde görev yaptıkları bilinmektedir. Globulin adı verilen özel protein gruplarının meydana getirdiği bağışıklık olgusu antijen özelliği gösteren etkenlere karşı yüksek bir spesifiteye sahiptir (Knippers, 1985). Örn; IgG bakteri, virüs, çeşitli toksinler ve Rh antikorlarına karşı oluşan bir globulindir (Race, 1973; Corradin ve ark., 1977; Engers ve Fitch, 1977; Glasebrook ve Fitch, 1980).

Serum immün globulin fraksiyonlarının kantitatif ve kalitatif olarak araştırılmasında başlangıçta çeşitli serolojik metodlar ve immün elektroforez teknikleri kullanılmıştır (Race, 1973; Axelsen ve ark., 1973). Ancak polyacrylamide jel tekniklerinin proteinlerin separasyonundaki başarısı anlaşıldıktan sonra bu teknik immünolojik araştırmalarda geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Özellikle kantitatif olarak oldukça düşük konsantrasyondaki protein fragmentlerinin saptanmasında bu teknik yüksek bir ayırma gücüne sahiptir (Gaal ve ark., 1980).

1.1. İMMÜNOLOJİ

Genel anlamı ile kendi kalıtsal yapısına yabancılık özelliği taşıyan özel yapıdaki maddeleri (Antijen) ayırt edebilecek gelişme düzeyi ve yeteneğindeki organizmaların, bu maddelere karşı gösterdikleri tepkilerin tümü ile ilgilenen bir bilim dalıdır (Bilgehan, 1981; Knippers, 1985).

Organizmanın her türlü yabancı maddeye gösterdiği tepkimeye bağışık (immün) cevap denmektedir. Bağışık cevap hücrelerin tepkimeleri şeklinde ortaya çıkar (Eisen, 1990).

İmmünoloji ve immünite ile ilgili ilk fikirler insanların enfeksiyon hastalıkları ile olan ilişkileri gözlenerek oluşmuştur. Kızamık, boğmaca, çiçek v.b. hastalıkları geçiren insanların bir daha ömür boyuna bu hastalıklara yakalanmamaları, bir toplumda ortaya çıkan salgınlarda bir çok kimsenin ölmesine karşın bazı kimselerin hastalığı hafif geçirmeleri veya hiç hastalanmamaları insanların immünoloji ile ilgili ilk gözlemleri olmuştur (Bilgehan, 1981; Müftüoğlu ve ark., 1993).

Bir İngiliz hekimi olan EDWARD JENER 1798'de çiçek hastalığı görülen inekleri sağan kadınların ellerinde çıkan püstüller yolu ile asıl çiçek hastalığına karşı bağışık hale geldiklerini gözleyerek çiçek aşısı uygulamasını (aşılama) ortaya atmıştır (Bilgehan, 1981).

1880 yılında Pasteur'un hayvanlar için *şarbon*, insanlar ve hayvanlar için ilk olarak *kuduz* aşısını bulması, bakteri aşılarının (*tifo*, *tifüs*, *boğmaca*, *veba*, *kofera* vb.) Salmon ve Smith tarafından ortaya çıkarılması, Roux ve Yersin'in difteri ekzotoksinini keşfinden sonra Ehrlich, Löwenstein, Ramon'un toksoid aşılarını bulması, Behring ve Kitasato tarafından *tetanus* ekzotoksinine karşı hastaların kanında antitoksinin ortaya çıkarılması, Pfeiffer tarafından memeli hayvan serumlarında özel antikorlarla birleşerek hücre eritici ve buna benzer litik etki gösteren komplemanın bulunması, fagositozun ve fagositoza etkili antikorların bulunması (Metchnikoff) birbiri ardından antijen-antikor ilişkileri ve bu ilişkilerle ilgili çeşitli serolojik reaksiyonların keşfi immünolojinin ilk gelişiminde ve temelinde yer almaktadır. Bu buluşlardan sonra immünolojik olayların yalnızca mikroorganizmalarla diğer canlılar arasında ve özellikle canlıların enfeksiyon hastalıklarından korunması ile ilgili olaylar olmadıkları anlaşılmıştır (Bilgehan, 1981; Cooper, 1982).

Immünolojide antijen, antikor ve hücrelerin in vivo ve in vitro ilişkileri ve sonuçları incelenirken antikorların *gama-globulin* yapısında oldukları (Tiselius 1937) ispatlanmıştır. Antikor görevi yapan birçok değişik tip moleküle *immün globulinler (Ig)* adı verilmiştir. Her türde immün globulinler temel yapılarına ve gösterdikleri fiziksel ve kimyasal farklılıklara göre *IgG*, *IgA*, *IgD*, *IgE*, *IgM* şeklinde sınıflandırılmışlardır (Bilgehan, 1981; Axelsen ve ark., 1973; Cooper, 1982; Hudson ve Hay, 1980; Muftuoğlu, 1978; Eisen, 1990).

Yapılan araştırmalar sonucu antikorların plazma hücrelerinde sentezlendiği bulunmuştur. Antijen niteliğindeki maddelerin organizmaya girmesiyle ortaya çıkan immün cevapta, en etkili hücreler lenfositlerdir. Antijenlerin lenfositlerle ilişki kurmadan önce *Retikuloendotelial sistem* (RES) hücreleri tarafından alınıp, hazırlandığı bilinmektedir (Bilgehan, 1981).

Günümüzde immünoloji; her gün daha ileri boyutlara doğru gelişen ve başta mikroorganizmaların diğer canlılarla olan ilişkileri ve enfeksiyon hastalıklarından korunma, bunların teşhisi ve tedavi yöntemleri olmak üzere; allerjik olaylar, kan grupları, otoimmün hastalıklar, tümör immünolojisi, organ nakli, genetik ile ilgili immün eksiklikler, sitoloji ve benzeri konuları kapsayan bir bilim dalı haline gelmiştir (Cooper, 1982).

1.1.1. ANTİJENLER

Hayvan vücuduna çeşitli yollardan (daha çok parenteral; deri altı, damar içi, kas içi, periton içine) verildiklerinde, antikor adı verilen özel yapıdaki proteinlerin sentezlenmesine yol açan, her türlü yabancı maddeye antijen denir (Maddy, 1976; Freeman, 1979; Knippers, 1985; Stryer, 1988; Hudson ve Hay, 1980; Cooper, 1982).

Antijenler doğal (nativ veya naturel), sentetik ve konjugatif (yarı sentetik) olmak üzere genel olarak üç ana grupta toplanabilirler. Nativ antijenler doğal kaynaklardan elde edilmiş olanlardır (örneğin; serum proteinleri). Sentetik antijenler laboratuvarlarda üretilmişlerdir (örneğin; amino asitlerin ko-polimerleri). Konjugatif antijenler ise doğal antijenlere dinitrophenyl (DNP) ve arsenilate gibi çeşitli kimyasalların ilave edilmesiyle elde edilmiş olanlardır (örneğin; Bovine Serum albumin). Tek başına antikor sentezini başlatma yeteneğinde olmayan ancak bir makromolekülle bağlandığında aktiveşen, organizma için yabancı, küçük moleküllere hapten adı verilmektedir (Freeman, 1979; Cooper, 1982; Stryer, 1988).

Proteinler, polipeptidler, polisakkaritler, saf olmayan nükleik asitler ve haptenlerle bağlanmış lipidler antijenik özellik gösteren makromoleküllerdir (Freeman, 1979).

1.1.2. HÜCRESEL ANTİJENLER

Hücre duvarı ve hücre membranları antijenik özellik gösteren çeşitli maddeleri ihtiva etmektedir. Bu maddelerin antijenik özellikleri canlıların filogenetik olarak yakınlıkları veya uzaklıklarına göre değişmektedir. Bunlar genel anlamda heterofil ve izofil antijen olarak iki gruba ayrılmaktadırlar (Freeman, 1979).

1.1.3. Heterofil antijenler: İnsanlarda, düşük organizasyonlu hayvanlarda, mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan antijenlerdir. Heterofil antijenler arasında en iyi bilinen Forssman antijenidir. Forssman antijeni *Trichinella spiralis*, bazı gram negatif bakteri suşları, *Pneumococlar*, *Bacillus anthracis* ve *Pasteurella cuniculidia* gibi mikroorganizmalarda da bulunmuştur. Bu antijen sığır, domuz, tavşan, sıçan, primat ve kuşların çoğu, kurbağalar ve bazı balıklarda bulunmaz (Eisen, 1990).

1.1.4. İzofil antijenler: Aynı türe ait canlılarda bulunan antijenlerdir.

Ayrıca organ veya dokulara ait antijen grupları da bulunmaktadır. Bunlar hem heterofil hemde türe özel antijenler olarak adlandırılabilirler. Göz merceği, beyin, testis, tiroid gibi dokulara ait antijenler organa özel antijenler için klasik örnekler olup bu antijenlerin izolasyonu oldukça zordur (Freeman, 1979).

1.1.5. Kan grubu (ABO) antijenleri: Kan grubu antijenleri kırmızı kan hücrelerinin hücre yüzeyinde bulunurlar ve izoantijenlere dahildirler.

1.1.6. Mikroorganizma antijenleri: Tüm canlılarda olduğu gibi bakteriler ve virüslerde de kimyasal yapılarına uygun olarak çeşitli tipte antijen özelliği gösteren maddeler vardır (Freeman, 1979).

Bakteriler ilkel bir hücre sistemine sahip olmakla birlikte yapısal maddeleri, ortama salgıladıkları enzimleri veya toksinleri diğer canlılar için güçlü immünojenik özellik göstermektedir. Bu antijenlerin incelenmesi ile bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılması yapılabildiği gibi, mevcut antijenlere karşı organizmada oluşan antikorların tespiti ile enfeksiyon hastalıklarının tespiti konabilmektedir. Bakteri antijenleri hücre yapılarına uygun olarak farklı şekildedirler.

1.1.6.1. Kapsül antijenleri: Kapsüllü bakterilerde bulunurlar ve çoğu zaman polisakkarit yapısındadırlar. Ancak *Bacillus anthracis*'te olduğu gibi polipeptid yapısında da olabilirler.

1.1.6.2. Hücre duvarı antijenleri: Bakterilerin esas hücresel antijenleri hücre duvarı yapısında bulunur. Gram negatif bakterilerde duvarın dış bölgesinde lipopolisakkarit yapısında antijenler bulunmaktadır. Bu antijenlerin lipid yönleri toksik, polisakkarit yönü ise antijenik özellik göstermektedir. Antijen özelliği gösteren polisakkarit bölümüne somatik (vücut=O) antijenleri denir. "O" antijenleri barsak bakterilerinde özellikle de *Salmonella*'lar da iyi incelenebilmişlerdir. "O" antijenleri genellikle ısıya ve alkole dirençlidir.

1.1.6.3. Kırpık (H) antijenleri: Hareketli bakterilerde kırpıkların yapısında bulunan antijenlerdir. Protein yapısındadırlar ve ısıya, asitlere ve alkole dirençsiz fakat formole dirençlidir.

1.1.6.4. Hücre dışı antijenler: Bakterilerin bulundukları ortama (hücre dışına) salgıladıkları ve genellikle protein yapısında antijen özelliği gösteren maddelerdir "ekzotoksinler ve enzimler" (Çetin, 1968; Bilgehan, 1981).

Bir antikor, makromoleküler yapıdaki bir antijenin sadece bir bölgesine spesifik bir affinite gösterir. Antijen üzerinde antikoron spesifik olarak bağlandığı bu bölgeye "antijenik determinat" veya "epitop" denir (Freeman, 1979; Stryer, 1988).

Organizma için yabancı olan bir madde, antikor oluşumuna neden oluyorsa buna antijenik veya immünojenik adı verilmektedir. Proteinler, polisakkaritler, nükleoproteinler, ve lipoproteinler gibi birçok nativ makromoleküller antijendir. Fakat saf nükleik asitler ve lipidler genelde antijenik değildir (Freeman, 1979; Cooper, 1982; Stryer, 1988).

1.1.7. Bir maddenin antijen özelliği gösterebilmesine etkili olan başlıca özellikler

1.1.7.1. Canlıların genetik yapısı: Her canlı, hayatsal işlevlerini yürütmek üzere kendi yapısal ve fonksiyonel maddelerini sentezleme yeteneğindedir. Bu maddeler hemen her canlıda protein, lipid, polisakkarit v.b. gibi çeşitli temel maddelerden oluşur. İki canlı evrimsel akrabalık bakımından birbirlerine ne kadar uzaklarsa, bu canlılara ait biyomoleküller o kadar güçlü antijenik özellik taşımaktadırlar. (Freeman, 1979; Bilgehan, 1981; Cooper, 1982; Müftüoğlu ve ark., 1993).

1.1.7.2. Molekül büyüklüğü: Amino asitler veya monosakkaritler gibi çok küçük moleküller antijenik özellik göstermezler. Genel kural olarak molekül ağırlığı 10000'den küçük moleküller zayıf, molekül ağırlığı 100.000'den fazla makromoleküller (özellikle proteinler) ise güçlü immünojenik etki göstermektedirler (Freeman, 1979; Bilgehan, 1981; Müftüoğlu ve ark., 1993).

1.1.7.3. Antijen verme metodu: Bir antijenin organizmaya verilme yolu (özellikle enjeksiyon etkilidir) ve antijenin dozu, immün cevabın oluşumunda çok etkilidir. Dalak intravenöz (damar içi) yolla antijen verildiği zaman genelde ilk antikor oluşturan organdır. Fakat lenf nodlarındaki immün cevap daha çok subkutan (deri altı) enjeksiyonlardan sonra uyarılır (Sela, 1970; Müftüoğlu ve ark., 1993).

1.1.7.4. Canlının türü, yaşı ve cinsiyeti: Antijenin enjekte edildiği canlının türü, cinsiyeti ve yaşına göre antijenik etki değişiklik göstermektedir. Farklı iki tür canlıda aynı antijenin ortaya çıkaracağı tepki de farklıdır (McDevitt, 1969). İnsan ve hayvanlarla yapılan araştırmalarda oto-antijenlere karşı immün cevabın artması ve eksojen antijenlere karşı azalmasının yaşı ile ilişkisi olduğu ortaya çıkarılmıştır (Maletto ve ark., 1994).

1.1.7.5. Molekülün kimyasal yapısı: Bir molekülün immünojenik olması için kompleks bir yapıda olması gerekmektedir (Freeman, 1979).

1.1.7.6. Adjuvant'ların etkisi: Adjuvant etkisi gösteren çeşitli maddeler (Freund's complete, Freund's incomplete, Bentonit, Aliminyum hidroksit v.b) antijen etkisi gösteremedikleri halde bir arada bulundukları antijenlerin antijenik özelliğini artırırlar. (Hudson ve Hay, 1980; Eisen, 1990).

Antijenler, çözülmez formlarda veya bir adjuvantla birlikte uygulandığı zaman çok daha fazla immünojeniktirler. En yaygın kullanılan adjuvant çözülebilir formdaki antijenin stabil bir yağ emülsiyonu ile kombinasyonundan oluşmuş FREUND's complete adjuvanttır. Adjuvantın etkisi kesin bilinmemektedir. Fakat antijen miktarı çok düşük olduğunda veya antijenik özelliği zayıf antijenler, adjuvantlarla beraber uygulanarak etkileri artırılabilir. Bazı adjuvantlar antijen ile birleşerek vücutta uzun süre kalabilmekte ve antijenlerin ilişkiye gireceği hücre gruplarına taşınmaktadırlar. Buna ilaveten adjuvant içindeki *Mycobacterium tuberculosis* antikor sentezini hızlandırmakla birlikte enjeksiyon bölgesinde granülom oluşumunu teşvik ederek bir dezavantaj oluşturmaktadır (Freeman, 1979; Hudson ve Hay, 1980; Cooper, 1982).

Çözülebilir formlardaki antijenler genellikle vücutta çabuk bozulduklarından antijenik etkileri kısa sürelidir. Gram negatif bakterilerden elde edilen lipopolisakkarit yapısındaki endotoksinler antijenle birlikte verildiğinde adjuvant etkisi gösterirler. Adjuvant hazırlanmasında *Bordetella pertussis* ve *Corynebacterium parvum* gibi bakterilerde kullanılmaktadır (Freeman, 1979).

1.1.8. FREUND's ADJUVANT

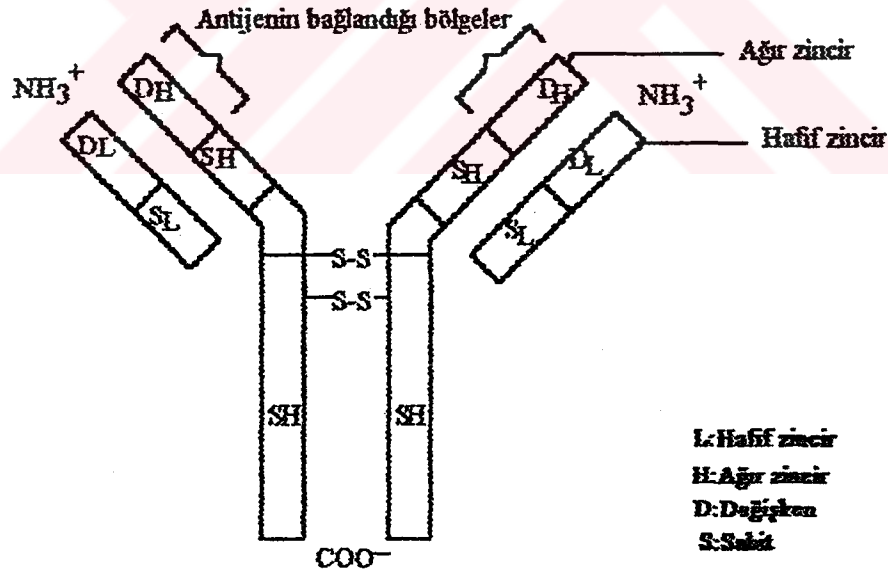
Freund's complete adjuvant *Mycobacterium tuberculosis* içeren deterjan (mannide mono-oleate) ve yağ (Bayol F) karışımından meydana gelmiştir. Incomplete adjuvant ise sadece deterjan ve yağ karışımıdır. Freund's adjuvant yıllar önce bulunmuş ve hala bilinen en etkili non-spesifik immün güç

artırıcı bir bileşiktir. Yaygın olarak kullanılan bazı Adjuvant'ların humoral ve hücresel bağışıklığın uyarılmasındaki etkileri Bomford tarafından detaylı şekilde araştırılmıştır (Bomford,1980). *Mycobacterium* ilave edilmiş adjuvant hem hücresel immüniteyi hemde antikor sentezini hızlandırmaktadır (Freeman, 1979).

1.1.9. İmmüoglobullerin Yapıları ve Fonksiyonları

İmmün globullerin (Ig) büyük bir çoğunluğu 4 polipeptid zincirinden yapılıdır. Bunlar birbirine benzer iki L (hafif) ve iki H (ağır) zincirinden oluşmuşlardır. L zincirleri yaklaşık 220 amino asit içerirken H zincirleri 440 amino asitten oluşmaktadırlar (Atassi, 1979; Knippers, 1985; Eisen, 1990).

Bu dört zincir öyle bir şekilde bir arada tutulur ki antikor molekülü Y harfi görünümündedir. Y şeklinin antijene bağlanan çatal kısmı, tanıma bölgesi olarak kabul edilir. Sap kısmı ise, antikoru diğer biyolojik özelliklerini sağlamaktadır (Knippers, 1985).



Şekil 1. İmmün globulin molekülünün yapısı (Frederick ve ark. 1985).

İmmüoglobulin G (IgG) 2 L 2 H zincirden meydana gelmiştir. Diğer immüoglobuller, yapısal olarak benzerlik gösterebilir de fonksiyonları farklıdır. Antikorların en yaygın formunu IgG oluşturur ve doğumdan önce anneden fetusa geçer. Mikroorganizmalar ve toksinlerle savaşır, komplemanı tutar ve fagositoz yapan hücrelere bağlanır. Uzun süreli antijen etkisinde kaldığında

sadece IgG'nin kandaki konsantrasyonunun yükselmesi normal insan kanındaki immünglobulinlerin miktarları hakkında bir gösterge oluşturmaktadır. İnsan dolaşım sistemindeki IgG sınıfı immünglobulin moleküllerinin yarılanma süreleri ve yıkılmaları diğer serum proteinlerinden çok daha yavaştır (Wawrzynczak ve ark., 1992). IgG normalde insan plazmasında çok düşük konsantrasyonda bulunmasına rağmen (10-400 ng/mL) insan popülasyonlarında ciddi allerjilere neden olduğu bulunmuştur. Allerjiler arasında dermatidler, besin allerjileri ve çeşitli astım allerjileri sayılabilir (Hellman, 1994).

IgG'ye zıt olarak IgM bir antijene maruz kalınmasından hemen sonra sentezlenir fakat fetusa plasenta yolu ile geçmez. IgM 5 adet temel çift zincirli yapıya sahip olması nedeniyle antijen ile birden fazla bölgeden bağlanır ve bu yüzden virüs ve bakteriler gibi yapılarla birleşme ve onların nötralizasyonunda daha fazla etkilidir. Yüksek değerli olduğu için bakteriyel aglütine etmede çok etkilidir. Bu nedenle vücudun bakteriemiye karşı en etkili öncü savunucusudur. Görünüşte antijen türevleri için IgM'in spesifitesi IgG kadar fazla değildir. Bu sebeple bilinen zararlı toksinlerin nötralizasyonunda IgM IgG'den daha az etkilidir. IgM, IgG gibi çeşitli bileşikleri aktive ederek yabancı hücrelerin ilizi olmasını teşvik etmede aktif bir rol oynar. IgM, aynı zamanda antijen aglütinasyonunda ve opsonizasyonda fagositler için partiküller hazırlanması prosesinde etkilidirler (Axelsen ve ark., 1973).

IgA'nın 2 formu vardır. Serum IgA antikor tek üniteli form olup (IgG gibi 2 hafif, 2 ağır zincir ihtiva eder) kanda az miktarda bulunur. Serum IgA stratejik konumundan dolayı bakteri ve virüslere karşı savunmanın ilk adımını oluşturur ve IgA zararlı organizmaları ortamdaki uzaklaştırma yeteneğine sahiptir. Salgılanan IgA proteolitik enzimlere karşı dirençlidir ve bu enzimler, proteinleri çözülebilir formlardaki daha küçük birimlere parçalarlar. Bu dirençlilik nedeniyle, molekülün salgı yapan bölgesinin barsak gibi potansiyel tehlike oluşturan bölgelerde zararlı etkilere karşı bir stabilite kazanılır. IgA mukoz membranların epitel yüzeylerini geçerek savunmanın ikinci adımını meydana getirirler. Bu nedenle özellikle solunum yollarında zararlı organizmaların antijenlerine karşı korunmayı sağlar. *In vivo* çalışmalar bakteriyel enfeksiyonlarda IgA düzeyinin arttığını göstermiştir (Wiederkehr ve ark., 1991).

IgD hakkındaki bilgiler daha azdır. Bu molekül ilk kez *multiple myeloma*'ı (bir çeşit kanser) bir hastanın kanında belirlenmiştir. Normal serumda oldukça düşük miktarlarda bulunan IgD'nin spesifik bir biyolojik rolü vardır. IgD ayrıca *sistemik lupus erythematosus* gibi hastalıklar, immün sistemin bozulmasıyla ilişkili spesifik hastalıklar görülen kişilerde salgılanmaktadır. IgD gebelik

esnasında ve çoğunlukla da allerji görülen hastalarda artmaktadır ve daha çok lenfositler üzerinde bulunur.

IgE'nin klinik bakımından oldukça büyük bir önemi vardır. Bu grup antikorlar çok şiddetli ve akut allerjik reaksiyonlarda antijenle birleşmeden sorumludur. Ayrıca IgE'nin normal kan serumundaki konsantrasyonu çocukluk çağında artar ve genelde çeşitli allerjik durumlar hariç düşük bir miktarda kalır (Axelsen ve ark., 1973; Müftüoğlu, 1978; Cooper, 1982).

1.1.10. BAĞIŞIK (İMMÜN) CEVAP

Bağışık cevap, ancak kendi kalıtsal yapısına yabancılık özelliği gösteren özel maddeleri tanıyabilecek gelişme düzeyindeki ve yeteneğindeki canlı organizmalar tarafından verilebilir. Genel olarak immün cevap oluşumuna neden olan her türlü maddeye antijen veya immünojen denir. Bu nedenle immün cevap, organizmanın antijenlere karşı oluşturduğu reaksiyonların tümünü kapsamaktadır.

Bağışık cevap humoral ve hücrel olarak iki gruba ayrılmaktadır. Humoral cevap antijenlerle immünizasyondan sonra immün sistem elemanları tarafından antikorların sentezlenmesini, hücrel bağışıklık ise yabancı antijenlere karşı organizmanın korunmasında lenfokinler ve duyarlı hücrelerin oluşmasını ifade eder (Cooper, 1982).

Antijen karakteri taşıyan proteinlerin memeli hayvan hücrelerinde ortaya çıkardığı bağışık cevap, etkenin tipine göre değişiklik göstermektedir (Knippers, 1985). Immün sistem hayvansal organizmayı viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlara karşı korumaktadır ve bilhassa omurgalı hayvanlarda daha iyi gelişmiştir (Stryer, 1988). Her biri organizmanın savunma fonksiyonuna yönelik farklı görevler ile donatılmış ve kendi aralarında çeşitli şekilde ilişkili olan hücre tiplerinden meydana gelen karmaşık bir sistemdir. İnsanda yaklaşık 10^{12} hücreden meydana geldiği tahmin edilen immün sistemi yaklaşık karaciğer büyüklüğünde bir organ teşekkül eder. Tabiki bu sistemin hücreleri vücuda dağılmış haldedir. Kanda ve lenfte akyuvarlar olarak, hücre düzeyinde bulunan sistem elemanları lenf düğümlerinde, timus, dalak ve ince barsakta peyer plakları şeklinde toplu halde bulunurlar. B tipi lenfositler belirli koşullarda immün cevap reaksiyonu göstermek üzere herhangi bir enfeksiyon etkenine karşı immün globulin adı verilen antikorları üreterek reaksiyon verirler. Immün

globulinler hücrelerden seruma geçer ve dolaşım ile vücuda kısa sürede dağıtılırlar. Bu antikorlar hatasız bir şekilde vücuda yabancı olan maddelere bağlanırlar. Bağlandıkları virüs ve bakteri yüzey strüktürlerinde organizma için yabancı karbonhidrat ve proteinler bulunur (Knippers, 1985).

Her antijen büyük bir Isabelle kendini tanıyan bir immün globulin sentezine yol açarak kendi kendisinin eliminasyonuna sebep olur. Teorik olarak sınırsız sayı ve tipte antijen olabileceği göz önüne alınırsa, immün sisteminde o kadar sınırsız antikor üretebilme yeteneğinde olması düşünülür. Bu nedenle, omurgalı bir hayvanda birkaç yüz milyondan bir milyara kadar farklı antikorların oluşabileceği kabul edilir (Knippers, 1985).

B hücrelerinin oldukça kompleks olan gelişimi, dağılımı ve immün globulinlerin salgılanmasından elde edilen sonuçlara göre antikorların farklılıklar gösterdikleri bulunmuştur (Tissot ve ark., 1993). Bu çeşitlilik öyle komplekstir ki sağlıklı ergin kişilerden alınan serum örnekleri elektroforetik tekniklerle analiz edildiklerinde ürünlerin tek tek separe edilmesi mümkün olmayabilir. Elektroforez teknikleri ile ayırt edilebilmeleri mümkün olan ve immün globulin üreten B hücrelerinin sayıca artması **monoklonal gammopathy (MG)** olarak adlandırılmıştır ve bu durum çok çeşitli hastalıklarda gözlenmiştir (Tissot ve ark., 1993). MG insanlarda herhangi bir hastalıkla kendini belli etmeyen durumlarda da gözlenebilir. Bu durumda **Benign monoklonal gammopathy (BMG)** veya belirti vermeyen MG olarak adlandırılır (Tissot ve ark., 1993).

İnsanın da içinde bulunduğu, gelişmiş organizmalarda immün cevap çeşitli sonuçlara yol açarak ortaya çıkar. Bazı patolojik durumlar hariç organizma yaşam sürecinde birlikte bulunduğu doku ve antijenleri tanır ve bunlara karşı cevap oluşturmaz. Antijenlerle karşılaşan bir organizmanın oluşturduğu immün cevap sonuçları çok çeşitlidir. Bunlardan başlıcaları şu şekilde sıralanabilir (Bilgehan, 1981),

- 1-Antijen-antikor ilişkileri ve bu ilişkiden doğan biyolojik ve serolojik olaylar.
- 2-Aşırı duyarlılık tepkimeleri.
- 3-Oto-immün tepkimeler ve bunlara bağlı klinik olaylar.
- 4-Tümör immünolojisi olayları.

Antijenin spesifik bir antikorla birleşmesi sonucu oluşan yapılara **immün kompleksler (IC)** denir. IC'ler ya direkt fagosit edilirler ya da kompleman sistemiyle reaksiyona girerek dolaşımdan uzaklaştırılırlar. IC yapılarının vücut sıvılarında dolaşmaya başlamasıyla birlikte, çözünebilir antijen formlarına karşı

humoral immün savunma mekanizması aktifleşir. Sonuçta IC'ler dolaşımdan uzaklaştırılmaz ve vücutta kalırlar. Dolaşım sisteminde bulunan IC düzeylerinin saptanması için enfeksiyon hastalıkları, oto-immün hastalıklar ve çeşitli malignensi durumlarında hastaların vücut sıvıları kullanılmaktadır. IC'lerin çok yüksek konsantrasyonlarda olduğu durumlar, sistemik lupus erythematosus (SLE), Sjögren's sendrom, rheumatoid arthritıs ve ankylosing spondilitis gibi romatoid hastalıklardır. Diğerleri viral hepatit ve sekonder syphilis gibi uzun süre vücutta varlığını sürdüren hastalıklardır. Ayrıca IC'ler multiple sclerosis, progressive rubella panencephalitıs, sub-akut sclerosing panencephalitıs ve amyotrophic lateral sclerosis gibi spesifik nörolojik hastalıklarda da dolaşımda bulunmaktadır (Wiederkehr ve ark., 1991).

Bir çok multiple sclerosis'li hastanın beyin omurilik sıvısından da IC'lerin izole edilebildikleri, fakat düşük miktarlarda bulundukları belirtilmiştir. Ayrıca IC'ler glomerular ve idrar kesesi hastalıklarında idrardan da izole edilebilmiştir. İdrar kesesi kanseri görülen hastalara ait idrar örnekleri analiz edildiğinde IC miktarı düşük düzeyde bulunmuştur (Wiederkehr ve ark., 1991).

Serum, beyin omurilik sıvısı ve idrardaki IC seviyeleri, IC'nin hücresel karakterleri immünolojik, kimyasal ve fiziksel temellere dayalı birçok metod kullanılarak hesaplanmıştır (Wiederkehr ve ark., 1991).

1.1.11. İMMÜN SİSTEMİN ORGANLARI

1.1.11.1. Kemik iliği: Kemik iliğinin temel fonksiyonu kan hücrelerini üretmektir. Kan hücrelerinin kompozisyonu kemik iliği ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle değişik fizyolojik şartlar altında farklı hücrelerin sayısı da değişmektedir. Monositler kemik iliğinde B hücrelerine ve makrofajlara dönüşür. Bütün patolojik durumlar derhal kemik iliğinin kompozisyonunu etkiler. Sonuçta myeloid doku, demir ve lipid depolar. Kemik iliğinde bulunan monositler diğer dokulardaki makrofajlar gibi çalışarak plazma hücreleri ve lenfositlerle birlikte fagositoz yaparlar. Bu nedenle kemik iliği immün sistemde önemli bir rol oynar. Bütün stem hücreleri kemik iliği orijinelidir. Kemik iliğinde üretilen hücreler timusa veya memelilerde Bursa fabricius'a eşdeğer hücrelere göç ederek görevlerini tamamlarlar (Cooper, 1982).

1.1.11.2. Timus: 1960 yılının başlarında timus'un endokrin sistemle birlikte bir organ gibi işlev yaptığı kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda Timus'un lenfositler için bir rezervuar görevi yaptığı ortaya konmuştur. Bu

nedenle Timus immün sistemin merkezi olarak bilinir ve immünolojik cevabın gelişmesinde hem erken hem de ilerleyen dönemlerde aktif bir şekilde çalışır. Gelişmesini tamamlamamış omurgalılarda Timus çıkarıldığı zaman, immün cevap yetersiz kalmış ve canlı patojenlere yenik düşmüştür. Çünkü Timus ergenlik çağına kadar gelişmeye devam eden bir organdır. Bu organ, lenfoid sistemin (dalak, lenf nodları ve kan dolaşımındaki lenfositler) gelişmesi üzerine direkt etkilidir. Monositler bu organda immün cevapta etkili olan T hücrelerine dönüştürülür (Eisen, 1990).

Timus sternum'un hemen üzerinde ve thorax'ın altında lokalize olmuştur. Pembemsi-gri renkli, üçgen şeklinde ve birçok memeli hayvanda 2 lobludur. *Amphibia*, *Reptil* ve *Aves* gibi diğer hayvanlarda ise çok lobludur (Cooper, 1982; Eisen, 1990).

1.1.11.3. Dalak: Dalak lenfoid organların en büyüğüdür. Lenf nodlarından çok Timus'a benzer. Dalakta afferent lenfoid damarlar ve lenf sinüsleri yoktur. Dalak kanı ve lenf nodları da lenf sıvısını filtre ederken timus her ikisi içinde etkisizdir. Dalak eritrositlerin parçalandığı organ olup bütün kan hücreleri için depo görevi yapar (Eisen, 1990).

Dalağın immün sistemdeki en önemli rolü, lökosit hücrelerini oluşturmaktır. Embriyo döneminde lenfosit ve granülositler dalakta yapılırken yetişkinlerde lenfositler dalakta üretilmezler. Bu organ bakteri gibi patojen yapıları filtre ederek dolaşımdan uzaklaştırır. Bu fonksiyonu ile immün reaksiyonlarda temel bir görev yapar (Cooper, 1982).

1.1.11.4. Lenf nodları: Lenf nodları doku boşluklarının dışında yerleşmiş lenf damarlarıyla birleşerek patojen yapılarla ilişkiyi sağlar ve vücut savunmasının ilk basamağını oluştururlar. Lenf nodları immün sistemin anatomik ve fonksiyonel iki bölgesine sahiptir. Bunlar T ve B lenfositlerinin bulunduğu bölgelerdir. T hücreleri hücresel immüniteden, B hücreleri ise humoral immüniteden (antikor sentezi) sorumludur. Lenf nodları böbrek şeklinde olup çapları 1-24 mm arasında değişir ve genellikle gruplar halinde bulunurlar (Cooper, 1982).

1.1.11.5. Peyer plakları: Peyer plakları'nın, sistemik immün cevabın düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Peyer plaklarının inaktivasyonu, lokal antijen proseslerini ve barsak epitellerinin antijen alımını değiştirmektedir. Antijen miktarının artması dalak'ta yüksek bir immün cevap oluşmasına neden

olmaktadır. Heatley ve arkadaşları (1981), Intra-Intestinal immünizasyonun peyer plaklarındaki sistemik immün cevabın artmasını indüklediğini göstermiştir (Husband ve Gowans, 1978; Heatley ve ark., 1981). Peyer plaklarının barsaktaki lokal immün cevabın indüklenmesindeki önemli rolünden başka sistemik toleransın gelişmesinden de sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Soesatyo ve ark., 1990).

Barsakların immünizasyonundan sonra sistemik immün cevabın düzenlenmesinde peyer plaklarının rol oynadığı gösterilmiştir. Peyer plaklarının inaktive edilmesi; barsaktaki antijen alımını değiştirir, lokal suppressör T hücrelerinin uzaklaştırılması üzerine etki yapar ve bu değişiklikler dalaktaki immün reaksiyonların artmasına neden olur (Soesatyo ve ark., 1990).

Sıçanlarda peyer plaklarının sistemik ve lokal immün vevap üzerine olan inaktivasyon etkileri araştırılmıştır. Koterizasyon yöntemi peyer plaklarının inaktivasyonunu artırmıştır. Dalak, mesenterik lenf nodu ve barsak villuslarındaki ikincil immün cevap immüno-histokimyasal yöntemler kullanılarak tesbit edilebilmiştir (Soesatyo ve ark., 1990).

1.1.12. FARELERİN LENFOİD ORGANLARI

İnsanın klinik önemi nedeniyle deney hayvanı olarak kullanılan fareler en iyi model hayvanlardır. Bu sebeple immün sistemi detaylı olarak bilinmektedir. Lenfoid organlar içinde en önemlilerinden birisi kan olup, fare kanının 1 mL'sinde $5-11 \times 10^6$ lenfosit bulunmaktadır. Hücre içeriği yaşla orantılı olarak değişiklik göstermektedir (özellikle thymus). Ayrıca suş, cinsiyet, sağlık durumu ve canlıya ait immün sistemin durumu bu çeşitliliği etkilemektedir. Verilen bu kan değerleri 4-8 haftalık BALB/c ve CBA farelerinin çeşitli organlarından elde edilen verilerdir (Hudson ve Hay, 1980). Tablo 1'de farenin önemli lenfoid organları ve onların hücresel kompozisyonu görülmektedir (Hudson ve Hay, 1980).

Tablo 1. Lemfoid organların alt grupları: Lenfositler

ORGAN	T-lenfosit %	B-lenfosit %	Diğer Hücreler %
THYMUS	97	1	2
LENF NODLARI	77	18	5
DALAK	35	38	27
KAN	70	24	6
TORASIK LENF BEZİ	80	19	1

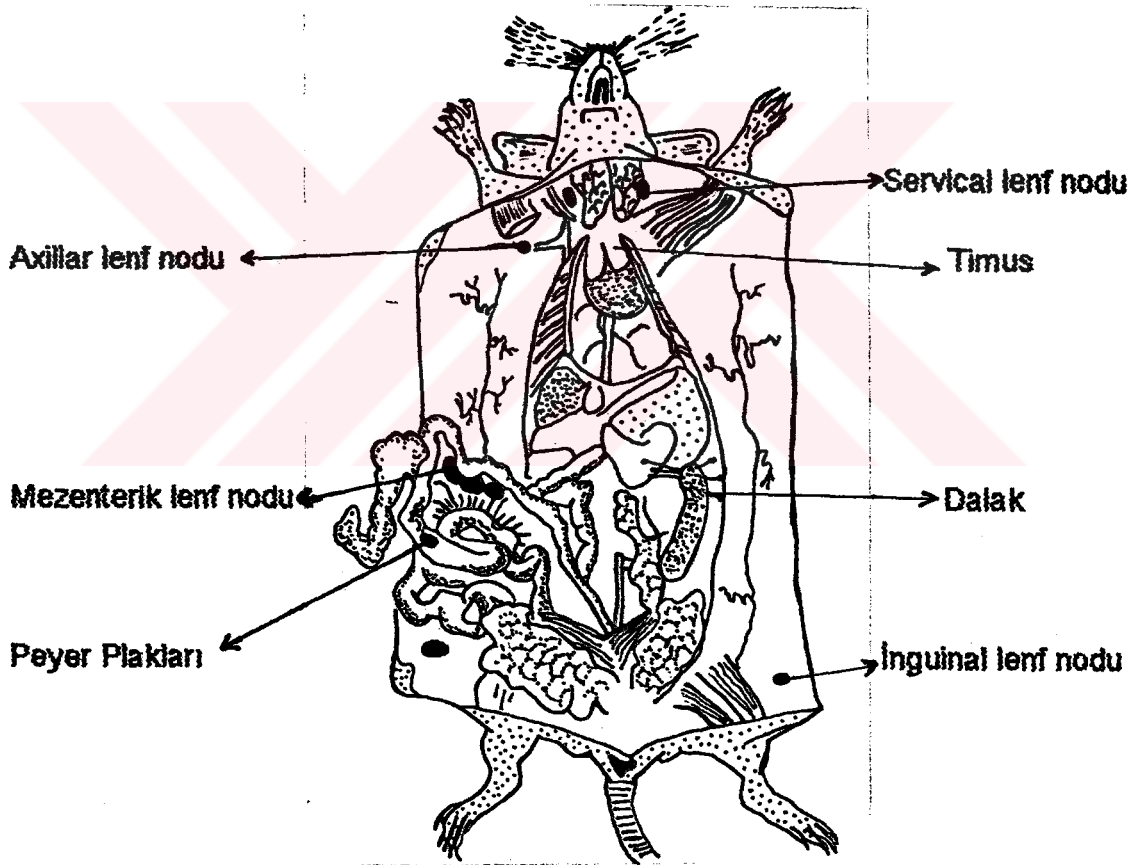
Tablodaki hücrelerin tanımlanması:

T lenfosit: Thy.1 antijeni varlığında ve membran yüzeyinde Ig'nin yokluğunda thymus küçük lenfositleri üretir,

B lenfositleri: Thy.1 antijeninin membran yüzeyinde bulunmaması ve Ig varlığında Bursa-equivalentten üretilir.

Diğer hücreler "Null": Thy.1 veya membran yüzeyinde Ig'nin olmadığı durumlarda küçük çekirdekli hücreler sentezlenir. Bu hücreler bazen lenfoid sisteme dahil edilirken bazen de bu sistemin dışında bırakılırlar. Belki de çoğu bir hücreden köken almaktadır (Hudson ve Hay, 1980).

Farenin lenfoid organları ve vücutta dağılımı şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. Farenin lenfoid organları ve vücutta dağılımı (Hudson ve Hay, 1980).

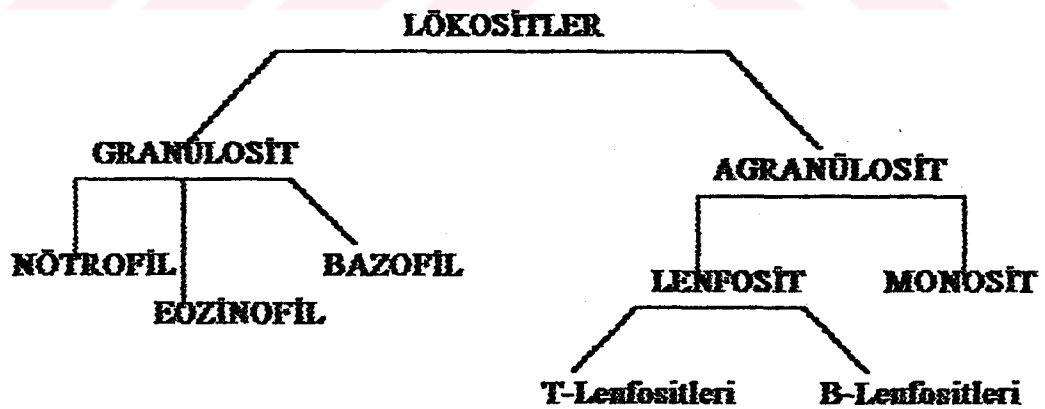
1.1.13. İMMÜN SİSTEMİN HÜCRELERİ

1.1.13.1. Makrofajlar: Vücuda giren antijeni (hangi yolla girerse girsin) ilk önce karşılayan hücreler makrofajlardır. Esas kaynakları kemik iliği olan

makrofajlar, kapiller damar duvarlarının endotel hücreleri, lenfold doku, kemik iliği, karaciğer, dalak gibi organların sinüs boşluklarını çevreleyen hücreler, dalak pulpası ve lenf düğümlerinde medulla kordonundaki dendritik hücreler, sabit histiyositler ve monositlerdir. **Retikülo endotelyal sistem (RES)** adı verilen bu hücrelerin oluşturduğu sistemde özellikle lenf düğümleri, lenfold doku, dalak ve kemik iliğindeki makrofajların hücresel ve humoral bağışık cevapta rolleri çok önemlidir. Organizmaya giren antijenler fagositoz veya pinositoz yoluyla makrofajlar tarafından alınarak yoğunlaştırılırlar (Hudson ve Hay, 1980).

Makrofajların tümör nekrosis faktörleri ve Interlökin-6 oluşturma yeteneklerinin, yaşlanmayla birlikte azaldığı gözlenmiştir. Yardımcı salgı hücrelerine karşı oto-immün cevap oluşumu, aynı antijenle uyarılmış erkek sıçanların 12 aylıklarında 3 aylık olanlara göre daha fazla görülmüştür (Maletto ve ark., 1994).

1.1.13.2. Lenfositler: Kanın bileşiminde bulunan akyuvarlar (beyaz küre) temel olarak granülositler ve agranülositler olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadırlar. Granülositler kendi aralarında nötrofil, eozinofil ve bazofil, agranülositler de lenfosit ve monosit olarak alt gruplara ayrılmaktadırlar (Noyan, 1988). T ve B hücreleri lenfositlerin alt gruplarıdır (Eisen, 1990). Şekil 3.



Şekil 3. Lökositlerin sınıflandırılması (alt grupları).

Daha çocuk yaşta iken vücuduna kızamık virüsü giren bir insan hastalanır ve tekrar aynı virüsle herhanıgi bir şekilde karşılaşsa bile uzun bir süre korkmasına gerek yoktur. İmmün sistem sayesinde gerçekleştirilen koruma, bu tip tehlikeli antijenlere karşı spesifiktir. Kişi artık bu antijeni tanımıştır ve uzun

sürede bu koruma devam eder. Bu spesifik immün cevabın temel ünitesi ise lenfositlerdir. Lenfositler haberci hücrelerden farklılaşarak (yumurtalık, kemik iliği ve fetal karaciğerden üremiş) sentral lenfoid organlara (timus, bursa-equivalent) göç ederler. Farklılaşmasını tamamlayan lenfositler buradan da periferik lenfoid organlara taşınırlar. Periferik lenfoid organlar kan, dalak, lenf nodları, peyer plakları, lenfoid boşluklardır. Bu durumda, canlı genelde immünolojik olarak doyum noktasındadır ve antijenlerin etkisine karşı kendini koruma yeteneğindedir (Hudson ve Hay, 1980).

Lenfositler, T ve B lenfositler şeklinde iki büyük alt gruba ayrılırlar. Kemik iliğinden timus'a gelen lenfoblastlar timik faktörün etkisiyle farklılaşarak hızla çoğalırlar. Günde 3-4 kez bölünerek çoğalan bu lenfositler küçük lenfositlerdir. Timusta antijenik ve immünolojik olarak yeni yetenekler kazanan bu lenfositlere timus'a bağımlı anlamında T-lenfositleri denir (hücre sel immün cevapta esas rol oynarlar). Kemik iliğinde oluşan lenfositler timus'a uğramadan lenfoid dokularda değişikliğe uğrarlar. B-hücreleri normal olarak antijenik bir uyarıdan sonra plazma hücreleri'ne dönüşerek antikor oluştururlar. Bir kısmı da tekrar küçük lenfosit formlarına dönüşerek daha sonraki immün cevaplarda görev alacak hafıza (memory) hücrelerini oluştururlar. Plazma hücreleri dakikada $1-2 \times 10^3$ molekül oranında antikor üretirler. T-lenfositleri ise blast hücreleri formuna dönüşürler ve salgılamak için antikor üretmezler. Bu hücrelerin spesifik etkili fonksiyonu direkt hücre ile ilişkili sonucu o hücrenin öldürülmesi şeklindedir (Cooper, 1982).

T-yardımcı hücrelerinin T-suppressör yardımcı hücrelere değişimi mitojenlere karşı immün cevabı azaltmıştır. Özellikle T-hücrelerinin uyarılması antikorlardaki kalitatif ve kantitatif değişimin bu olaylarla ilgili olduğunu göstermektedir (Maletto ve ark., 1994).

T-hücrelerinin uyarılması ve sayıca artmasında çeşitli gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) bakteriler ve *Candida albicans* kullanılmıştır. *Streptococcus*'ların neden olduğu enfeksiyonların immün sistemi uyardığı ortaya çıkarılmıştır (Kabelitz ve ark., 1990).

Antijenik bir uyarıdan önce lenfositlerin çoğu pasif haldedir. B-lenfositlerinin yüzeyine reseptörler sıralandığı zaman hücreden antikor olarak aynı antijenik spesifite gösteren immün globulin moleküllerinin salgısı başlar. T-lenfositleri de

molekül reseptörlerine sahiptir fakat onlar hala karakterize edilememiştir. İmmün globulin reseptör molekülleri hücre membranında sabit değildir fakat anti-Ig gibi çapraz bağlı ajanlarla birlikte hareket edebilirler. Bununla birlikte bloke olmuş reseptörler ya dağıtılarak ya da endositozis yoluyla hücrelerde yok edilirler. Bu olay belki de yeni reseptörlerin sentezine mücadele etmek için antijenik ilişkiden sonra oluşan fizyolojik bir prosestir. Dalakta B-lenfositlerinin farklılaşmasının birçok aşaması aynı anda gerçekleşmektedir. Pek çok genç hücre antijen ile ilişki kurduktan sonra plazma hücrelerine dönüşmeye ve antikor üretmeye başlar (Hudson ve Hay, 1980).

Antijenlerin etkisinde kalan lenfositler hızla değişikliğe uğrayarak morfolojik farklılaşma sonucu aynı özellikteki kardeş hücrelere bölünmeye başlarlar. Tek tek uyarılan her hücre aynı antijen için tepki verecek etkili hücre klonlarına dönüşür. İmmün cevap azaldığı zaman etkileyici hücreler uzun süre aktif kalmazlar ve Memory hücreler veya küçük lenfositlerin yardımıyla tekrar oluşturulurlar. Bir canlı patojen bir suşun avirülen yada ölü formu ile daha önceden karşılaşmışsa, patojen bir virülenle karşılaştığında immün sistemi uyarılabilir (Cooper, 1982).

Biyoloji, tıp, eczacılık ve daha birçok bilim dalında önemli biyolojik proteinlerin fonksiyonlarının tanımlanmasında, karakterize edilmesinde, kantitatif olarak ölçülmesinde ve izole edilmesinde, çeşitli modern separasyon metodları kullanılmaktadır. Separasyon metodları, çeşitli vücut sıvısı ve dokularında bulunan proteinlerin analiz edilmesi ve fraksiyonlara ayrılmasında kullanılmaktadırlar. Bu metodlar kimyasal ve fiziksel olarak ikiye ayrılmaktadır. Kimyasal metodlar; alkol veya polivalent katyonlarla presipitasyon v.b., fiziksel metodlar ise kromatografi, ultrasantrifüjasyon ve elektroforez yöntemlerini içermektedir (Race, 1973).

1.2. ELEKTROFOREZ: Belli bir elektrik yüküne sahip biyomoleküllerin elektriksel bir alanda "sahip oldukları elektrik yüküne bağlı olarak" anod veya katoda göç etmeleri prensibine elektroforez denir (Vesterberg, 1993). Moleküllerin elektriksel alanda göç etmeleri moleküler ağırlık, ortamın pH'sı, kullanılan ayırma ortamının por çapı, sıcaklık, elektroforez zamanı, uygulanan akım gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterir (Maniatis ve ark., 1982; Perbal, 1984; Walker ve ark., 1988).

Elektroforez çeşitleri, uygulama şekilleri ve kullanım alanları aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır.

1.2.1. POLYACRYLAMİDE JELLER

1.2.1.1. Jelin yapısı ve oluşumu:

Polyacrylamid jeller ortamda inisyatör ve katalizör bulunduğu zaman N-N'-bis acrylamid ile acrylamidin çapraz bağlar oluşturarak polimerize olmaları sonucu meydana gelirler. Böylece belirli por büyüklüğüne sahip çapraz bağlanmış bir matriks oluşur. Acrylamid-bis acrylamid oranı çok önemli olup, jelin fiziksel ve mekanik özelliğini büyük ölçüde etkiler. Akrilamid ve bis akrilamid konsantrasyonundaki artış, jelin sertliğini ve kırılma dayanıklılığını artırırken, azalma yumuşaklığı ve elastikiyeti artırmaktadır. Jeli oluşturan monomerlerin yüzdesi düşük olursa porlar geniş olur ve böyle jeller molekül ağırlığı büyük olan proteinlerin separasyonunda kullanılırlar. Yüksek jel yüzdeleri küçük porlar oluşturacağından bu tip jeller molekül ağırlığı küçük proteinlerin separasyonunda kullanılırlar. Örneklerin separasyonu sırasında protein bantlarının daha düzgün olması için polimerizasyondan sonra separating jelin üzerine stacking jel dökülerek tarak yerleştirilir ve örnekler oluşan gözlemlere konur (Gaal ve ark., 1980).

Bisacrylamid, polimerizasyonda zincir tamamlayıcı olarak görev yapmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu zaman jelin maksimum por büyüklüğünün azalmasına neden olur (Walker ve ark., 1988).

1.2.1.2. Polimerizasyon ve Katalizörler:

Acrylamid'in polimerizasyonu kimyasal ve fotokimyasal olmak üzere iki yolla gerçekleştirilebilir. En fazla kullanım alanı bulan kimyasal katalizör sistemleri;

a-Amonyumpersülfat-TEMED

b-Amonyumpersülfat-3 dimetilaminopropiyonitril (DMAPN)

c-Hidrojen peroksit-demirpersülfat-askorbik asit karışımlarıdır. Amonyum persülfat suda çözündüğü zaman stabilitesini kaybettiği için bunun yerine potasyum persülfat kullanılması önerilmiştir (Walker ve ark., 1988).

Polimerizasyon bazik ortamda persülfattan serbest oksijen radikallerinin katalizlenmesi sonucu oluşan monomer radikallerine gereksinim duyar.

Reaksiyonun gerçekleşmesi için mutlaka bazık ortam gereklidir. Çünkü düşük pH değerlerinde polimerizasyon gerçekleşmez. Moleküler oksijen polimerizasyonu engellediği için jelden uzaklaştırılması gerekir. Ayrıca, karışımdaki serbest oksijen çıkarılmasa, polimerizasyon sırasında açığa çıkan ısı, jelde kabarcıklar oluşmasına neden olmaktadır. Kullanılan ayıraçlarda bulunabilecek kirliliğin yanında ortam ısısındaki değişiklikler polimerizasyon olayını büyük ölçüde etkileyen faktörlerdir. Foto polimerizasyon, TEMED-Riboflavin sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen bir olaydır. Riboflavin riboz grubuna sahip bir boya olup indirgeyici ajan gibi davranır. Fotokimyasal reaksiyona örnek olarak verilebilecek olan bu sistemde, polimerizasyon lamba ışığı altında gerçekleşmektedir. Kimyasal polimerizasyonun aksine, fotokimyasal polimerizasyonda çok az da olsa moleküler oksijene ihtiyaç vardır (yaklaşık %1 oranında) (Gaal ve ark., 1980).

1.2.1.3. Jeli Oluşturan Bileşenlerin Fizikokimyasal Özellikleri

Akrilamid, bisakrilamid ve TEMED'in fiziksel özellikleri tablo 1'de görülmektedir.

Akrilamid, asidik veya alkali koşullar altında akrilik aside hidrolize olmaktadır. Akrilik asit, elektroforez sırasında bazı proteinlerin hareketini yavaşlatmakla birlikte tam olarak engellemez. Akrilamid hidroksil bileşikler ile α -aryloksy veya alloxypionamide, amonyak ile α α' α'' -nitrilopropionamide, ve merkaptanlar ile α -alkylmercaptopropionamid yapıları oluşturmaktadır. Akrilamid ve bisakrilamid'in en önemli reaksiyonu polimerizasyon olayı olup, bu olay doğal ışık, γ -radyasyonu veya ultrasonik olarak başlatılabilir. Bu yüzden, stok solüsyonlar karanlıkta ve soğuk bir ortamda (4°C) saklanmalıdır.

Tablo 2. Polyakrilamid jelleri oluşturan bileşenlerin fiziksel özellikleri

Özellikler	Akrilamid	Bisakrilamid	TEMED
Mol. ağırlığı	71.08	154.16	116.20
Görünüşü	Beyaz-kristal	Beyaz-kristal	Sarı yağ
Koku	-	-	Amonyak
Çözünürlüğü	Su-O.Ç*	Su	Su-O.Ç.*
Yoğunluğu	1.122	-	0.777

* Organik çözücüler

Öre suda çözündüğü zaman siyanat formuna dönüşebilir. Bu formda sıcaklık ve pH'daki artışa bağlı olarak proteinlerin karbamilasyonuna neden olmaktadır. Amonyum persülfat, suda fazla stabil değildir. Bu nedenle, kullanılmadan önce taze olarak hazırlanması gerekir. Amonyum persülfatin yerine, potasyum persülfatta kullanılabilir. Persülfat, proteinleri okside ederek jelde artefaktlar oluşmasına neden olabilir. Bu yüzden, ya ön elektroforez işlemi yaparak veya tampon çözeltisi ile yıkanarak jelden uzaklaştırmak gerekir. Eğer persülfat konsantrasyonu 8-14 gr/ml den daha yüksekse, kullanılan tampona bağlı olarak, mavi renk meydana gelir (Gaal ve ark., 1980).

1.2.1.4. SEPARATING JELLERİN HAZIRLANMASI

Separating jel genellikle amonyum persülfatla polymerize edilir. Jellerin polymerizasyonları için amonyum persülfat yerine riboflavin kullanılırsa jelin daha geniş porlara sahip olduğu belirtilmiştir (Vesterberg, 1993).

Persülfat konsantrasyonu artırılarak polymerizasyonun hızlandırılabileceği fakat bunun polymer zincirlerinin ksalmasına neden olacağı ileri sürülmüştür. Tris ve glicinatın TEMED ile birlikte polymerizasyonu önemli ölçüde katalize ettiği belirtilmiştir. Diğer taraftan proteinler jelin polimerizasyonunu yavaşlattıklarından bu olumsuz etki ortama yüksek konsantrasyonda TEMED ilave edilerek ortadan kaldırılabilir (Jeyaseelan ve ark., 1987).

Akrilamid konsantrasyonunun % 20 veya daha fazla olmasının aşırı ısı oluşumu nedeniyle polymerizasyonun homojen gerçekleşmesini engellediği belirtilmiştir. Bunu engellemek için potasyum ferrisiyanat konulması veya TEMED'in konulmaması önerilmiştir. Amonyum persülfatin örnekleri oksitlemesi antioksidanlar kullanılarak önlenabilir. Fakat bu ajanlar yüksek konsantrasyonda kullanılırlarsa polymerizasyon engellenir ve proteinlerin hareketi yavaşlar. Antioksidanların bu olumsuz etkisi polymerizasyonun oda sıcaklığı yerine 37 °C de yapılması ile ortadan kaldırılabilir. Polymerizasyon oranı ve etkisi büyük ölçüde reaksiyon koşullarına bağlıdır (tampon sistemi, pH, iyonik güç, katalizör konsantrasyonu ve inisyatörler). Bu nedenle iyi sonuç almak için bunlar standartlaştırılmıştır.

1.2.1.5. GRADIENT PAGE JEL ELEKTROFOREZİ

Slater (1968) proteinlerin analizi için polyakrilamid gradient jel tekniğinin kullanılmasını önermiştir. Bu araştırmacı sıçan serum proteinlerinin gradient jellerde homojen jellere göre daha iyi separe olduklarını bulmuştur. Bu teknikte protein bandları oldukça keskin ve ince bir görünüm almaktadırlar (Gaal ve ark., 1980).

Gradient jeller farklı konsantrasyona sahip iki jel karışımının birbiriyle karıştırılmasıyla hazırlanırlar. Gradient jellerde polymerizasyon işlemi konveksiyon akımlarını önlemek için jelin yoğunluğu daha düşük olan üst tarafından başlatılır. Bu amaçla yoğunluğu düşük olan kısma daha fazla katalizör konur (Jeyaseelan ve ark., 1987).

Gradient jeller akrilamid kadar, sucrose veya glyserol yoğunluk gradientleri şeklinde de hazırlanırlar. Gradient jeller özellikle serum proteinlerinin analizi için kullanılırlar. İnsan serum proteinleri ile yapılan bir çalışmada %3.5-10 'luk gradient jeller kullanıldığında 28 band elde edilmişken homojen jellerle 21 band elde edilmiştir (Gaal ve ark., 1980).

Polyakrilamid gradient jel elektroforez yöntemi hem protein, RNA ve nükleoproteinlerin separasyonu hemde proteinler ve RNase'ın moleküler ağırlıklarının saptanması için kullanılır (Walker ve ark., 1988).

Gradient jellerin kullanım aralığı genellikle %3-%30 acrylamid içeren konsantrasyonlarda değişir (Walker ve ark., 1988). Acrylamid konsantrasyonu, separe edilecek proteinlerin molekül ağırlıklarına bağlı olarak seçilir. Moleküler ağırlıkları bir birine yakın olan proteinlerin bir birinden ayrılması, gradient jellerde diğer jellerden çok daha kesin olmaktadır.

Elektroforez sırasında akrilamid konsantrasyonuna bağlı olarak proteinlerin hareketi konsantrasyonun arttığı bölgede daha yavaştır. Fakat separasyon daha yüksektir. Makromoleküllerin hareketi jel konsantrasyonunun artış yönünde elektrik etkisine bağlı olarak giderek yavaşlar (Podulso, 1980).

1.2.1.6. SDS-POLYACRYLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

SDS-polyakrilamid jel elektroforez yöntemi en fazla proteinlerin analizi ve özelliklerinin saptanmasında kullanılmaktadır. SDS-PAGE yönteminin uygulama

alanı blottlama teknikleri (Western blot) ve iki boyutlu elektroforez tekniğinin gelişmesiyle birlikte oldukça genişlemiştir.

Sodium dodecyl sülfat (SDS) anyonik bir deterjan olup, proteinlere sıkıca bağlanarak denatüre eder. SDS molekülü bir polypeptid zincirini meydana getiren amino asitlerin yaklaşık yarısına bağlanır. SDS'nin proteine bağlanma özelliği farklı protein konsantrasyonlarında denenmiş ve bir gram protein için ortalama 1.4 gr SDS kullanılması gerektiği saptanmıştır. Protein molekülleri negatif yüklü olduklarından SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru göç ederler. Protein-SDS kompleksleri polyakrilamid jellerde yürütüldükleri zaman jelin elek etkisi nedeniyle farklı büyüklükteki proteinlerin farklı şekilde hareket ettikleri görülür. Bu yüzden SDS ile muamele edilmiş proteinlerin separasyonu proteinlerin büyüklüğündeki farklılığı yansıtır. Bu özellikler dikkate alındığında SDS jel elektroforez yönteminin moleküler ağırlıkları bilinmeyen proteinlerin analizleri için uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Weber ve Osborn, 1969).

Proteinlerin moleküler ağırlıklarının araştırılması moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinler kullanarak elektroforez ortamındaki hareketlerinin karşılaştırılmasıyla hesaplanır. Moleküler ağırlık hesaplamaları %10 akrilamid jeller kullanarak yapılmaktadır (Weber, 1972; Podulso, 1980; Walker ve ark., 1988).

1.2.1.7. POLYAKRİLAMİD SLAB JEL TEKNİĞİ

Slab jeller silindirik jellerle karşılaştırıldığı zaman bazı avantajlara sahiptirler. Bunların başında aynı anda çok sayıda örneğin separasyonunun gerçekleştirilmesi gelmektedir. Slab jellerin hassasiyeti daha yüksektir, oluşan ısıнын dağılımı daha iyidir ve jel yüzeyinde hemen hemen hiç artefakt oluşmaz. Buna karşılık slab jel tekniği daha fazla akrilamid kullanılması nedeniyle daha pahalıdır. Slab jel elektroforezi hem vertikal hemde horizontal gerçekleştirilebilir. Slab jel yöntemi proteinlerin iki boyutlu analizlerinde de kullanılmaktadır. Teicky (1967) slab jel tekniğiyle aynı anda 49 farklı örneğin analizini gerçekleştirmiştir. Elektroforezden sonra örneklerin karşılaştırılması ve optik değerlendirilmesi daha kolaydır. Yürütme sırasında tampon seviyesinin değişmesi sonucu separe olan bandlarda dağılmalar meydana geldiğinden slab jel tekniğinin horizontal uygulanması genellikle önerilmemektedir. Slab jellerin hazırlanması diğer homojen jellerden farklılık göstermez (Gaal ve ark., 1980).

1.2.1.8. PROTEİN BANDLARINI SAPTAMA YÖNTEMLERİ

SDS-PAGE elektroforezinden sonra protein bandlarının ortaya çıkarılması amacıyla kullanım alanı bulmuş bir çok yöntem bulunmaktadır. Bunlar içinde en fazla kullanılan bandların boyandıktan sonra değerlendirilmesidir. Bu amaç için en uygun ve hassas olanları Coomassie blue R 250 ve gümüş boyama yöntemleridir (Küntzer ve ark., 1994; Granzier ve Wang, 1993) Coomassie blue R 250 ile boyanmış bandlarda yaklaşık 0.2-0.5 µgr düzeyinde protein miktarı kolaylıkla saptanabilmektedir. Bu boya, proteinlerin polar olmayan bölgeleriyle non-kovalent, amino grupları ile de elektrostatik bağlar oluşturur. Boyama işleminden sonra bandların görünür hale getirilebilmesi için mutlaka jeldeki boyanın uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaç için kullanılacak çözelti metanol, asetik asit ve su karışımından oluşmaktadır. Gümüş boyama yöntemi elektroforez çalışmalarına son yıllarda girmiş olup, Coomassie blue R 250'den 100 kat daha hassastır (Anderson ve ark., 1991; Miller ve Gemenier, 1993). Bu iki boyama yönteminin dışında proteinlerin analizi için floresan veren protein işaretleyicilerde kullanılmaktadır. Bu arama yönteminin asıl avantajı, Coomassie blue'dan çok daha hassas olması (fluorescamin ile yaklaşık 1 ngr'lık protein aranabilir) ve karanlık bir odada jelin UV etkisine bırakılarak elektroforezin izlenebilmesidir.

Proteinler radyoaktif işaretlenerek otoradyografi veya sıvı sintilasyon sayıcısı yardımıyla da saptanabilirler. İşaretleme amacıyla ^3H , ^{14}C ve ^{131}I kullanılmaktadır. Bütün bu yöntemler spesifik olmayıp, doğadaki bütün proteinler için kullanılabilir. Bununla birlikte spesifik boyama yöntemleri de kullanılmaktadır. Bunun en güzel örneğini glycoproteinlerin boyanmasında kullanılan Periodic Acid-Schiff (PAS) yöntemi oluşturmaktadır.

1.2.1.9. POLYACRYLAMİD JEL ELEKTROFOREZ

UYGULAMALARINDAKİ HATALARIN NEDENLERİ

Elektroforez çalışmalarında sıcaklık kritik bir faktördür. Blatter ve Bradley (1972) düşük sıcaklıklarda suyun yüksek viskoziteye sahip olması nedeniyle sıcaklıkla birlikte proteinlerin hareketinin büyük ölçüde değiştiğini belirtmişlerdir. Örneğin, sıcaklık 17°C den 18°C 'ye yükseldiğinde proteinlerin hareketi %20 den

daha fazla artmaktadır. Isı dağılımı homojen değilse jelin iç kısımlarında yüzeyine göre daha fazla ısı oluşacağından bandlarda eğrilikler görülür. Bunun nedeni bu bölgelerdeki moleküler hareketin artmasıdır. Bunu önlemek için, jel daha fazla sulandırılmalı veya elektroforez buzdolabında yapılmalıdır (Gaal ve ark., 1980).

Polymerizasyon çok hızlı gerçekleşirse farklı jel konsantrasyonları ve proteinlerin cam yüzeyine yapışmasından dolayı bandlarda eğrilmeler meydana gelir. Bunu önlemek için TEMED veya persülfat konsantrasyonu azaltılmalı veya jele potasyum ferrisiyanid katılmalıdır.

Jelin kullanılmadan uzun süre bekletilmesi, saf olmayan kimyasallar, hava kabarcıkları veya jel üzerine suyun dikkatsiz konması, az yada çok ciddi zararlara neden olabilir. Eğer proteinler presipite olurlarsa bandlarda kuyruklanma meydana gelir (özellikle separating jel ve stacking jel sınırında). Proteinlerin presipitasyonu stacking jelin yoğun olması veya protein-protein arasındaki etkileşimden kaynaklanabilir.

Eektroforez işlemi yapılırken yürütme zamanının kısa tutulması, uygun olmayan jel konsantrasyonu, tamponun pH'sı, yanlış iyonik güç seçimi, örnek tamponunun yüksek iyonik gücü, aşırı ısı oluşumu, jel ve cam plakalar arasındaki tampon sızıntısı gibi faktörler komponentlerin separasyonunu zayıflatmaktadır (Walker ve ark., 1988; Jeyaseelan ve ark., 1987).

Tablo 3. Farklı molekül ağırlığına sahip makromoleküllerin separasyonunda kullanılan polyacrylamid jel konsantrasyonları

Akrilamid	Bis	Separasyon
Konsantrasyonu	Konsantrasyonu	Büyüklüğü
(%T)	(%C)	(Dalton)
15-20	0.2	1-4 x 10 ⁴
10-15	0.3	4 x 10 ⁴ -10 ⁵
5-10	3-2	1-3 x 10 ⁵
5	5	3-5 x 10 ⁵
2-5	6	> 5 x 10 ⁵

1.2.2. FİLTRE KAĞIDI ELEKTROFOREZİ

1950'li yıllarda makromolekül karışımlarının filtre kağıdı ve zon elektroforez tekniği kullanılarak başarıyla separe edildikleri 6 değişik laboratuvar tarafından açıklanmıştır (Race, 1973). Bu yöntem oldukça geniş bir uygulama alanı bulmuş ve değişik alanlarda analitik çalışmaların yapılabilmesi için bir yol açmıştır. Günümüzde, elektroforezi için kullanılan daha uygun ayırma ortamlarının gelişmesiyle birlikte filtre kağıdının önemi azalmıştır (Vesterberg, 1993).

Elektroforez için kullanılan filtre kağıdı en az %96 oranında α -selüloz içermekte olup bu bileşik konsantre sodyum hidroksit içinde çözünmemektedir. Elektroforez sırasında filtre kağıdı tampon çözeltisi ile ıslatılır. Filtre kağıdının suyu absorblama kapasitesi önemli bir faktör olup kağıdın yapısına bağlı olarak değişmektedir. Çünkü ıslatılmış filtre kağıdının elektriksel iletkenliği kağıdın absorbladığı tampon miktarına bağlıdır (Axelsen ve ark., 1973; Race, 1973).

Filtre kağıdındaki sıvıların hareketi elektroozmosis ve aşağıda belirtilen diğer faktörler nedeniyle etkilenebilir. Eğer elektrod kompartmanlarındaki tampon çözeltileri arasında dengesizlik varsa sifon etkisi meydana gelmektedir. En önemli olanı ise elektrik akımı nedeniyle yüksek ısı oluşması sonucu sıvıların buharlaşmasıdır. Buharlaşma, kağıttaki elektrolit konsantrasyonu ve iyonik gücün artmasına neden olmaktadır. Buharlaşma yeterince düşük iyonik güce sahip tamponlar kullanılarak minimum düzeyde tutulabilir. Sistemin yeterince soğutulması da buharlaşmayı önleyen bir faktördür. Diğer taraftan tampona %5-15 oranında gliserol veya propilen glycol ilave edilerek buharlaşma azaltılabilir (Gaal ve ark., 1980).

1.2.3. SELÜLOZ ASETAT ELEKTROFOREZİ

Selüloz asetat elektroforezi ile zone elektroforezi prensip ve uygulama olarak filtre kağıdına çok benzer. İki yöntem arasındaki farklılık iki ayırma ortamının farklı özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Selüloz asetat membranları mikroskobik boyutlarda, süngere benzeyen homojen bir mikropor yapısına sahiptir. Porların ortalama çapları birkaç mikrondur. Protein bandlarının yayılması, filtre kağıdına göre çok daha azdır. Selüloz asetat membranları oldukça saftır (Race, 1973).

Hemiselüloz ve lignin bulunmamakla birlikte iz miktarda ağır metal içermektedir. Proteinlere bağlanma kapasitesi filtre kağıdından çok daha düşüktür. Bu yüzden filtre kağıdı ile karşılaştırıldığı zaman moleküllerin sürüklenme davranışının elimine edildiği görülmektedir. Boyamadan sonra kağıdın kendisi boyanmaz ve oluşan bantlar daha da belirginleşerek keskin bir görünüm alırlar. Elektroforez süresi daha kısadır. Selüloz asetat elektroforezi immünodiffüzyon çalışmalar için uygun bir yöntemdir (Axelsen ve ark., 1973).

Yöntemin uygulanması sırasında kağıt şeritler tampon çözeltisine batırılarak doyurma işlemi yapılır. Elektroforez aletine gergin şekilde yerleştirilerek bir süre kağıttan akım geçirilir. Örnek uygulamaları kağıdın katod ucundan yaklaşık 1 cm içeriye uygulanır. Elektroforez sırasında uygulanacak akım, kullanılan tamponun iletkenliğine ve uygulanacak olan materyalin niteliğine göre seçilir. Genellikle selüloz asetat kağıtlarında 0.4-0.5 mA/cm den daha yüksek elektrik uygulanmaz (Kalınlık genellikle 120 μ dur). Elektroforezden sonra boyama işlemi ve boyanın geri alınması işlemleri yapılır ve kağıt şeritler kurutulduktan sonra şeffaflaştırmak için madeni yağ ile doyurulur. Boyanmamış kağıt üzerinde boyalı protein bantları densitometrede değerlendirilir (Race, 1973).

1.2.4. NİŞASTA JEL ELEKTROFOREZİ

Nişasta gel elektroforezi ortamın elek etkisinden yararlanarak bileşiklerin bir birinden ayrılmasında kullanılan ilk elektroforez yöntemidir. Nişasta suda çözünmeyen bir polysakkariddir. Elektroforez amacıyla kullanılan nişastalar içinde patates nişastasının en uygun olduğu bulunmuştur (Vesterberg, 1993). Jelin por büyüklüğü jeldeki nişasta konsantrasyonu ve hidroliz derecesiyle saptanır (Vesterberg, 1993).

Çok büyük (örn; IgM) veya asimetric (örn; fibrinojen) moleküller nişasta jelline girmediklerinden çok küçük globuler proteinler separe edilirler (Gaal ve ark., 1980).

1.2.5. İZOELEKTRİK FOKUSLAMA

Izoelektrik fokuslama (IEF) yöntemi pH gradienti oluşturma temeline dayanmaktadır. pH carrier amfolit olarak bilinen özel tamponların kullanılması ile gradient anotdan katoda doğru sürekli artmaktadır. Her bir protein molekülü

kendi izoelektrik noktasına eşit pH değerine göç eder. Bu yöntem iki boyutlu elektroforez tekniğinin gelişmesini sağlamıştır. İki boyutlu teknikte proteinler birinci boyutta izoelektrik fokuslama tekniğiyle yüklerine göre, ikinci boyutta ise slab jeller kullanarak büyüklüklerine göre separe edilirler (Vesterberg, 1993). IEF'nin ayırma gücü çok yüksek olup genellikle polyakrilamid jellerde gerçekleştirilir. Bununla birlikte büyük proteinlerin bu jellerde separe edilmeleri zordur. IEF yöntemi günümüzde bitki, mikroorganizma, hayvan ve insan proteinlerinin analizlerinde ve adli tıp alanında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Walker ve ark., 1988; Vesterberg, 1993).

Izoelektrik fokuslama elektroforez alanındaki yöntemlerin en yenilerinden biridir. Elektroforez sırasında anot ve katod arasında pH gradienti oluşturulur. Yüklü moleküller kendi yüklerine göre, ters yüklü elektrotlara doğru hareket ederek tek bir band oluşturacak şekilde ayırma ortamında dağılırlar. Moleküller amfoterik pH ortamında hareket ederlerse bu sırada yükleri sürekli olarak değişir ve sonunda moleküller, yüklerinin sıfır olduğu bir noktaya ulaşırlar. Bu pH aralığında moleküllerin izoelektrik noktası ortamın pH'sına eşittir. Aynı izoelektrik noktaya sahip moleküller dar bir bandda toplanırlar. pH gradienti değişmediği sürece fazla değişiklik olmaz ve moleküller bu şekilde kalırlar. Çünkü elektriksel alan moleküllerin dağılmasını inhibe etmiştir. Bu yöntemin en yaygın kullanım ismi **izoelektrik fokuslama** olmakla birlikte literatürlerde izoelektrik separasyon ve izoelektrik yoğunlaştırma gibi isimlerle de kullanılmaktadır (Walker ve ark., 1988; Jeyaseelan ve ark., 1987).

Bu prensibin ilk uygulaması Szuki ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (1912). Bu araştırmacılar bitki proteinlerinin hidrolizatlarından glutamik asidi separe etmişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

Izoelektrik fokuslama yöntemi ile amino asit ve peptid gibi amfoterik bileşikler pH gradienti bulunan elektriksel alanda separe edilirler. Anod bölgesi asidik katod bölgesi ise baziktir. Bu şekilde elektrotlar arasında stabil bir pH gradienti oluşturulur. Örnekler seçilen pH aralığında sahip oldukları izoelektrik noktalarına göre separe olurlar. Elektrotlar arasında stabil pH gradienti düşük moleküller ağırlıklı taşıyıcı amfolitler kullanarak oluşturulabilir. Taşıyıcı amfolitlerin ticari şekilleri genellikle sentetik alifatik polyamino polykarboksilik asit türevleri olup geniş (ör; pH= 3-10) ve dar pH aralığına sahiptirler (pH:4-5) (Righetti ve Drysdale, 1976).

Nötral pH gradienti terimini ilk kez Svenson ortaya atmıştır. Burada sodyum sülfat gibi nötral tuzlar platin elektrotlar arasında elektroliz edilirler. Sisteme amfoterik bileşikler ilave edilirse katod negatif, anod pozitif yüklenecektir. Çünkü negatif yüklü iyonlar katoda pozitif yüklü iyonlar anoda doğru göç ederler. Izoelektrik fokuslama yöntemi proteinler, polypeptidler ve nükleik asitlerin separasyonunda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Gaal ve ark., 1980).

IEF sistemlerinin en yaygın kullanım şekli taşıyıcı amfolitlerle doyurulmuş cam veya plastik yüzeyler üzerine dökülmüş jellerin horizontal uygulanmasıdır. Genellikle polyacrylamid jel kullanılmakla birlikte bazan polyakrilamid jellerin etkisinden kaçınmak için yüksek moleküler ağırlığa sahip proteinlerin separasyonunda agaroz jeller kullanılır. Bütün IEF jelleri genellikle düşük konsantrasyonda gerçekleştirilir. Jelin polymerizasyonunda katalizör olarak riboflavin kullanılır ve foto-polimerizasyon işlemi uygulanır. Hızlı separasyon için yüksek voltaj uygulaması yapılır (2000 volt ve üstü). Separasyon sırasında ısı oluşumunu engellemek için soğutma işlemi uygulanması gerekir (Righetti, 1983).

Separasyon işleminden sonra örneklerin jelde diffüzyonunu engellemek için jel hemen fiksasyon çözeltisine konularak 30 dakika fikse edilir (%10 trichlorasetik asit) (Righetti ve Drysdale, 1976).

1.2.6. İKİ BOYUTLU ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ

1975 yılında O'Farrell ve arkadaşları birinci boyutu IEF ve ikinci boyutu SDS-PAGE slab jel şeklinde uyguladıkları iki boyutlu jel teknikleri kullanarak SDS-üre karışımı ile hazırlanmış protein örneklerinin separasyonlarını gerçekleştirmişlerdir (O'Farrell, 1975; Vesterberg, 1993). Bu araştırmacılar çok düşük konsantrasyondaki proteinlerin bile ikinci boyutta otoradyografi yöntemi ile saptandığını belirtmişlerdir. Bir kaç yıl sonra Anderson iki boyutlu jel tekniği kullanarak insan serum proteinlerinin separasyonunu gerçekleştirmiştir. İki boyutlu jel tekniği, AIDS'in de dahil olduğu çeşitli hastalıklar üzerinde araştırma yapan mikrobiyoloji, hücre ve doku kültürü, genetik ve gen teknolojisi gibi biyolojik bilimlerin bir çok alanında büyük öneme sahiptir. İki boyutlu teknik kromozom, nükleik asit ve nükleotidlerin analizlerinde de önemlidir. Örneğin; bir proteindeki amino asit sırasının saptanması gibi çalışmalarda çok kullanışlıdır (Vesterberg, 1993).

Bu teknik mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanların da dahil olduğu gezegen üzerindeki canlı formlar arasındaki çeşitliliğin ortaya çıkarılmasında çok kullanışlı bir yöntemdir. İEF ve iki boyutlu teknikler mutasyonlar, kimyasallar ve radyasyon etkisinin araştırılması konularında da önemlidir. Bundan başka kanser, neoplastik transformasyon ve allerji gibi çeşitli hastalıklar ve immün sistemin ayrıntılı olarak araştırılmasında iki boyutlu elektroforez tekniği yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Walker ve ark., 1988; Vesterberg, 1993).

1.2.7. AGARÖZ ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ

Agaröz jel elektroforezi, DNA moleküllerinin araştırılması ve özelliklerinin saptanmasında kullanılan çok yönlü bir tekniktir. Hazırlanmasının kolaylığı, ucuz olması ve uygulama için küçük miktarlara gereksinim duyulması, tekniğin en önemli avantajlarıdır. Agaröz çeşitli kırmızı alglerden ekstrakte edilmiş bir polisakkarittir. Agaröz, α -D galaktopyranose ve 3,6 anhydro L-galaktoz birimlerinin 1-3 α -glikozid bağları şeklinde bağlanması ve disakkarid birimlerinin tekrarlanması sonucu meydana gelmiştir.

Polymerizasyon, hidrojen bağlarının çapraz bağlar oluşturmasıyla gerçekleşir. DNA molekülleri elektroforez sırasında sahip oldukları negatif yüklü fosfat grupları nedeniyle anoda doğru göç ederler. Göç hızı, elektroforez tamponu ve jelle uygulanan voltaj gradienti, jelin por büyüklüğü ve DNA molekülünün şekli ile moleküler büyüklüğüne göre saptanır (Jeyaseelan ve ark., 1987). DNA molekülünün elektroforez ortamındaki hareketi 4 ana parametreye bağlıdır.

1-DNA'nın moleküler büyüklüğü.

Lineer çift iplikli DNA moleküllerinin jel matrisindeki moleküler ağırlıkları azaldıkça elektroforez ortamındaki hareketleri hızlanmaktadır (Fischer, 1971).

2. Agaröz konsantrasyonu.

Farklı büyüklükteki DNA molekülleri farklı agaröz konsantrasyonlarında farklı oranda göç ederler. DNA'nın hareketi ile jel konsantrasyonu arasında lineer bir ilişki vardır.

3. DNA'nın Şekil.

Aynı moleküler ağırlığa sahip kapalı sirküler (form-1), açık sirküler (form-2) ve lineer (form-3) DNA molekülleri agaroz jelde farklı oranlarda göç ederler (Thorne, 1967). Bu üç formun nisbi hareketleri öncelikle jelin agaroz konsantrasyonuna bağlıdır. Fakat uygulanan akım, tamponun iyonik gücü ve form-1'deki süper coil yapılarının fazlalığı da hareketi etkilemektedir (Johnson ve Grosmann, 1977). Bazı durumlarda form-1 DNA molekülü form-3'den daha hızlı göç eder. Ethidium bromid konsantrasyonunun artması DNA'ya bağlanan boya miktarını artırır. Form-1 molekülündeki negatif super coil oluşumu arttığından molekülün göç hızı yavaşlamıştır. Form-2 ve form-3 DNA moleküllerinin hareketi moleküle bağlanan boya miktarındaki artışa bağlı olarak yüklerin nötralle olması sonucu farklı şekilde azalır. Örneğin form-1 molekülü için 0.1-0.5 µg/mL boya konsantrasyonu kritik sınırdır.

4. Uygulanan akım.

Düşük voltajlarda, lineer DNA fragmentlerinin göç oranları uygulanan akımla orantılıdır. Bununla birlikte, elektriksel alanın gücü artırılırsa büyük moleküler ağırlıklı DNA fragmentlerinin hareketleri farklı şekilde artar. Maksimum separasyon elde etmek için jele 5 V/cm'den daha fazla akım uygulamamak gerekir.

DNA fragmentlerinin separasyonlarında sıcaklığa bağlı olarak da değişiklikler meydana gelir. Agaroz jel uygulamaları genellikle oda sıcaklığında yapılır. Bununla birlikte %0.5' den daha az agaroz içeren jeller daha gevşek olduklarından bu tür jellerin 4°C de yapılması önerilmiştir (Maniatis ve ark., 1982).

Agaroz jel elektroforezi vertikal olduğu kadar horizontal konumda da uygulanabilir. Horizontal jeller çeşitli amaçlar için iyi bir ayırma sağladığı gibi uygulaması da basittir. Jeldeki DNA bandlarının saptanması için Ethidium bromid kullanılır. Bu boya DNA molekülünün baz çiftleri arasına girme yeteneğindedir ve jeller kısa dalga boyulu ultra viole ışınları ile muamele edildiğinde DNA molekülleri portakal renginde görülürler. %15'lik ethidium bromid konsantrasyonları DNA'nın hareketini yavaşlatmaktadır (Sharp ve ark., 1973).

1.2.8. İMMÜN ELEKTROFOREZ TEKNİKLERİ

1.2.8.1. İKİ BOYUTLU İMMÜN ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ

Bu metod iki elektroforez aşamasından oluşmaktadır. Birinci boyutta proteinler agaroz jel tekniği kullanılarak separe edilirler. İkinci boyutta antikor içeren agaroz jeli daha önce separe edilmiş jelin üzerine dökülerek birinci boyuta dik pozisyonda separasyona devam edilir (Axelsen ve ark., 1973).

İkinci elektroforetik uygulama sırasında proteinler antikorla presipitasyon meydana getirinceye kadar jel içinde hareket ederler ve sonuçta separe olan her protein için presipitasyon pikleri meydana gelir (Laurell, 1965).

Bu teknik hastalıklar sırasında serum proteinindeki değişikliklerin kantitatif saptanması amacıyla kullanılır. Tek bir deneyde yaklaşık 40 farklı serum proteininin kantitatif olarak saptanması mümkündür. Bu teknikle 0.1 µg/ml den daha düşük konsantrasyondaki proteinler saptanabilir (Walker ve ark., 1988).

1.2.8.2. ROKET İMMÜN ELEKTROFOREZ

Bu teknik protein karışımlarındaki tek bir proteinin konsantrasyonunun hesaplanması için kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemle yaklaşık 1µg/ml konsantrasyondaki protein miktarlarını saptamak mümkündür. Karşılaştırılacak örnekler yuvarlak çukurlara konur ve daha sonra non-spesifik antikor içeren jel içinde separe edilirler (Bock ve ark., 1971; Axelsen ve ark., 1973).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Escherichia coli'nin (E.coli) XMP Aminase enzimi %12'lik SDS-PAGE yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve jeller elektroforezden sonra Coomassie Blue R 250 boyası ile boyanmışlardır (Maruyama ve ark., 1986). 6

Otoimmün bozukluklar, tipik olarak dolaşım sistemindeki antijenlere özgü antikorlarla karakterizedirler. Farelerde *Coxsacki* virus B3 infeksiyonu sonucu otoimmün miyokarditis olduğu ve meydana gelen antikorlar özellikle hayvanın kalp dokusunu etkilediği bulunmuştur (Neumann ve ark., 1991).

Bir çok araştırmacı genelde farelerle yapılan çalışmalarda genetik varyantların veya mutasyonların indüklenmesi sonucu oluşan farklılıkların ortaya çıkarılması amacıyla iki boyutlu elektroforez teknikleri kullanmışlardır (Anderson ve ark., 1991).

O'FARELL ve arkadaşları 1975 yılında proteinlerin iki boyutlu elektroforez tekniği ile yüksek düzeyde fragmentlere ayırdıklarını bulmuşlardır. Bu yöntem o yıllardan itibaren çalışmalarda yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (O'Farell, 1975).

O'FARELL ve CASH iki boyutlu PAGE yöntemi kullanarak *E.coli* bakterilerinin analizlerini yapmışlardır (O'Farell, 1975; Cash, 1991).

İnfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojilerinin anlaşılması, hastalıkların eliminasyonu ve kontrol edilmesiyle ilgili stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabilir. Serolojik deneylerde virüs izolatları arasındaki antijenik farklılıkları saptamak için spesifik antikorlar kullanılmaktadır. Bununla birlikte bazı virüsler için uygun antikor bulunmadığından bunların epidemiyolojilerinin çalışılmasında moleküler tekniklerden yararlanılmaktadır. Retrovirusların epidemiyolojilerinin araştırılmasında tek boyutlu elektroforez sistemleri kullanılmaktadır (Cash, 1991).

Sıçan α -fetoproteinleri nişasta, SDS-PAGE veya sadece PAGE sistemleri kullanılarak analiz edilmişler ve bunların iki fraksiyondan oluştuğu bulunmuştur. Bu fraksiyonların moleküler ağırlıkları SDS-PAGE yöntemiyle 72500 ve 69500 dalton olarak saptanmıştır (Ehara ve Nishi, 1991).

Apolipoprotein-D 24-32 kDa moleküler ağırlığa sahip insan plasmasının yüksek yoğunluklu lipoprotein fraksiyonu olarak bilinen bir glikoproteindir. Apolipoprotein (Apo D) özellikle progesteron ve pregnenolole bağlanır. Apo D mesane veya safra kesesinde kist görülen hastalarda önemli bir protein komponenti olmakla birlikte aynı zamanda sağlıklı insanların idrarlarında da ortalama olarak 1.4 mg/L oranında bulunur. Bu proteinin idrardaki konsantrasyonunun saptanması tubüler proteinuri'nin erken tanısında kullanışlı bir yöntemdir. Bu proteinin saptanması için %12'lik SDS-PAGE elektroforez yöntemi kullanılmıştır (Blanco ve Pownall, 1993).

Karaciğerdeki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptör aktivitesinin saptanması; diyetlerin belirlenmesi, hormonal düzenleme ve plasma kolesterol düzeyinin ilaçla tedavisinde büyük rol oynamaktadır. Karaciğer LDL-reseptör proteinleri SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle separe edilerek analiz edilmişlerdir. SDS-PAGE ile yapılan bir çok araştırmada hayvan türleri, dokular

ve elektroforez koşullarına bağlı olarak moleküler ağırlığı 130000-160000⁰ arasında değişen tek protein bantları saptanmıştır (Himber, 1993).

İmmün hale getirilmiş fare serumlarında artan dinitrophenil (DNP)-spesifik antikorlar izoelektrik fokuslama yöntemiyle analiz edilerek çok sayıda IgG fraksiyonundan meydana geldikleri saptanmıştır (Nakamura ve ark., 1993).

E.coli pre-S1 füzyon proteini çeşitli işlemlerle saflaştırıldıktan sonra protein konsantrasyonunun belirlenmesi için %7,5'lik SDS-PAGE jellerinde analiz edilmişlerdir (Rhyum ve ark., 1994).

Serum albumini çok çeşitli fizyolojik fonksiyonu olan önemli bir plazma proteindir. İnsanlarda serum albumin seviyeleri stres, hormonal dengesizlik, beslenme ve karaciğer hastalıkları gibi etkenlere bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. İki boyutlu elektroforez yöntemleri kullanılarak analiz edilen çeşitli hayvan türlerine ait serumlarda serum albumininin farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur (Birke ve ark., 1979; Anderson ve ark., 1991; Miller ve Gemenier, 1993).

MATTHEW ve arkadaşları ile SANDERS ve arkadaşları gram negatif bakterilerin tip-1 kromozomal β -laktamazlarını izoelektrik fokuslama yöntemi ile analiz ederek birbirinden farklı büyüklükte çeşitli bantlar elde etmişlerdir (Matthew, 1975; Sanders ve ark., 1986).

Elektroforez yöntemi kullanılarak insan salya proteinlerinin analizleri yapılmıştır. Bu amaçla hem SDS-PAGE hemde iki boyutlu elektroforez yöntemlerinin iyi sonuç verdiği belirtilmiştir. Buna karşılık bu yöntemin özellikle salya gibi düşük protein içeriğine sahip ve az miktardaki örneklerin analizlerinde kullanılmalarının sınırlı olduğu belirtilmiştir (Marshall ve ark., 1993).

İki boyutlu elektroforez yöntemi kullanılarak fare organlarından izole edilen (karaciğer ve beyin) membran, mitokondri ve çekirdek gibi belirli yapılara ait hücre proteinleri analiz edilmiştir (Jungblut ve ark., 1993).

Apolipoprotein miktarının kandaki artışı, risk faktörü taşıması nedeniyle kardiyovasküler hastalıklar için bir göstergedir. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak apolipoprotein molekülünde 6-12 izozim bulunmuştur (Craig ve ark., 1993).

Analitik SDS-PAGE elektroforez teknikleri proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre separasyonu için etkili bir teknik olup yaygın şekilde kullanılmaktadır (Groschup ve ark., 1991).

Polyacrylamid jeller biyokimya alanında ilk kez RAYMOND ve WEINTRAUB tarafından kullanılmıştır (Wenisch ve ark., 1993).

WEISS ve arkadaşları akrilamid jellerin polimerizasyonlarının düşük sıcaklıkta veya düşük aktivatör konsantrasyonunda gerçekleştirilmesi halinde jelin daha geçirgen olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşılık yüksek aktivatör konsantrasyonlarının geçirgenliği azalttığı belirtilmiştir (Weiss ve ark., 1991).

Serum veya plasma örneklerinden saf halde elde edilen Ig fraksiyonları IEF (pH= 3,5-10 amfolit taşıyan) ve lineer gradient (%9-16) polyakrilamid jeller kullanılarak separe edilmişlerdir. Gümüş boyama işleminden sonra Ig L-zincir fraksiyonlarının IEF jelinde asidik bölgeye gradient jelde ise uygulama noktasından en uzak noktaya göç ettikleri saptanmıştır (Tissot ve ark., 1993).

ANDERSON iki boyutlu elektroforez tekniği kullanarak BALB/c farelerinden elde edilen serum örneklerini analiz etmiş ve L-zincirine bağlı olarak Ig'lerin klonal farklılıklarını araştırmıştır (Anderson, 1991).

Bir çok araştırmacı iki boyutlu elektroforez tekniğinin insanlardaki MG'yi tesbit etmek için kullanışsız olduğunu belirtmişlerdir (Tissot ve ark., 1993).

İki boyutlu elektroforez yöntemi kullanılarak IC'lerin analizleri sadece bir kaç laboratuvar da gerçekleştirilmiştir. İlk çalışmada klasik romatoid arthriti veya serolojik olarak pozitif sonuç veren hastaların synovial sıvılarından izole edilen IC'ler analiz edilmişlerdir. Diğer çalışmada SLE hastalarının serumlarından izole edilen IC komponentlerinin analizleri iki boyutlu elektroforez tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Bununla birlikte albumin, fibrinojen (plasma), lipoproteinler, haptogloblin β -zincirlerinin parçalanma ürünleri ve tanımlanamamış bazı komponentlerin küçük miktardaki örnekleri kullanılarak iki boyutlu elektroforez analizleri yapılmış ve IC komponentlerinde değişiklik olmadığı bulunmuştur (Wiederkehr ve ark., 1991).

Normal insan idrarında bol miktarda bulunan Tamm-Horsfall glycoprotein böbrekte fazla miktarda sentezlenmektedir. Bu proteinin önemli fizyolojik fonksiyonlarından biri enfeksiyonlara karşı ürothelial savunma sistemini oluşturmastır (Wiederkehr ve ark., 1991).

Çeşitli buğday varyetelerinde gliadin proteinleri arasındaki farklılıkları ortaya koyabilmek için %3-13 SDS-PAGE gradient elektroforez yöntemi kullanılmıştır (Wrigley ve ark., 1991).

İnsanlardan otopsi ile veya cerrahi müdahale ile alınan karaciğer örnekleri ve sıçanların akciğer parankima örnekleri solubulize edilerek IEF yöntemiyle separe edilmişlerdir (Alexei ve ark., 1991).

SDS-PAGE elektroforez yönteminin glomerüler ve tübüler proteinüri hastalıklarının birbirinden ayrılması amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir.

Tübüler proteinüri düşük moleküler ağırlıklı proteinlerle karakterize iken glomerüler proteinüri yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerle karakterizedir "Albumin'den daha fazla" (Gaal ve ark., 1980).

SDS-PAGE yöntemi kullanılarak proteinlerin antijenik özelliklerine göre separe edilebilecekleri belirtilmiştir. Elektroforez sırasında antikorlara ait ağır ve hafif zincirlerin kesin sınırlarla ayrıldıkları bulunmuştur (Gaal ve ark., 1980).

SDS'li ortamlarda birçok biyolojik aktif proteinin özelliğini kaybettiği fakat glucose-oksidase'in tamamen, papain ve pepsin'in ise nisbeten aktivitelerini korudukları bulunmuştur (Gaal ve ark., 1980).

ZEINEH ve arkadaşları (1973), SDS-PAGE yöntemi kullanarak idrar proteinlerinin analiz edilebileceklerini ve immünolojik aktivitelerinin saptanabileceğini belirtmişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

FELGUNHAUER (1968), antijenleri poliakrilamid jellerde yürüterek immünodiffüzyon testleri uygulamıştır. Bu test için elektroforez işleminden sonra jel 50-60 µL antikor içeren çözeltilere konulmuştur (Gaal ve ark., 1980).

COTTON ve MILCTEIN (1973), akrilamid IEF yöntemi kullanarak proteinleri separe etmişler ve elektroforezden sonra antikor emdirilmiş filtre kağıtlarını jelin üzerine kapatarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bıraktıktan sonra immünolojik aktiviteyi saptamışlardır (Gaal ve ark., 1980).

PITT-RIVERS ve IMPIOMBATO (1968), SDS'nin disülfid köprüsü bulunan proteinlere daha az bağlandıklarını belirtmişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

BANCHER ve CUTTMAN (1972), histon, polylysylglutamik asit, ferrodoksin ve diğer metillenmiş proteinlerin aşırı yüklerle sahip olduklarından SDS-PAGE elektrofrezinde anormal davranışlar gösterdiklerini belirtmişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

SWANK ve MUNKRES (1971), 10000 daltondan daha düşük moleküler ağırlığa sahip proteinlerin SDS-akrilamid elektrofrez yöntemiyle analiz edildiklerinde konformasyon farklılıkları nedeniyle moleküler ağırlığın saptanmasında büyük güçlüklerle karşılaştığını belirtmişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

SEGREST ve JACKSON (1972), glikoprotein moleküllerinin moleküler ağırlıklarını saptamak amacıyla SDS-akrilamid yöntemleri kullanıldığında glikoproteinlerin yapısında bulunan polisakkaritlerin SDS'ye bağlanmayı etkilediğini ve bu nedenle yanlış sonuçlar elde edildiğini belirtmişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

ALLISON ve arkadaşları (1974), TEMED bulunan ortamlarda proteinlerin elektroforetik hareketlerinde bazı anormallikler oluştuğunu belirtmişlerdir. Çünkü bu bileşik 20000 daltondan daha düşük ağırlığa sahip proteinlerin hareketini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu araştırmacılar etkinin ortadan kaldırılması için pre-elektroforez yapılmasını önermişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

Moving-Boundary elektroforez tekniğinde pH 8,4-8,6'lık tampon kullanıldığı zaman plazma proteinlerinin 5 yada 6 fraksiyona ayrıldıkları bulunmuştur. Bunlar, albumin, α_1 , α_2 , β ve γ globin fraksiyonlarıdır (Gaal ve ark., 1980).

β -globulin komponentlerinin kalsiyum bulunan tamponlarda daha yavaş göç ettikleri ve tek bir bantta toplandıkları belirtilmiştir. Buna karşılık Tris-Borate-EDTA karışımından oluşan tampon sistemlerinin yüksek bir ayırma gücü olduğu ileri sürülmüştür (Gaal ve ark., 1980).

WRIGHT (1972), bazı malignensi hasta serumları ile normal kişilerin serumlarını karşılaştırmak için gradient jel tekniğini kullanmıştır. Bu teknikle immün globulinlerin alt birimlere ayrılabilirdiğini de belirtmiştir. Post-albumin bölgesinde 20'den fazla band saptanırken, aynı şekilde pre-albumin bölgesinde de birçok band görüldüğünü belirtmiştir. Wright ve arkadaşları insan serumunu amfolin (pH=3-10) içeren IEF jellerinde separe ettikleri zaman 40 farklı band bulmuşlardır. Bu bandların büyük kısmının pH=4-6 bölgesinde yoğunlaştığı, immünglobulinlerin ise pH=6-9 bölgesinde toplandıklarını belirtmişlerdir (Gaal ve ark., 1980).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

Çalışmada materyal olarak çeşitli gram-pozitif (*Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*) ve gram-negatif (*Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriler ve bunlardan hazırlanan "H" (Kırpık) ve "O" (Vücut) antijenleri, Freund's complete adjuvant, *Mus musculus var. albinus* fareleri, SDS-PAGE-Slab (Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide), Native-PAGE-Slab, SDS-PAGE gradient jelleri, Marker Proteinler, Cellulose-poly-acetate filtre kağıtları, agarose jel, elektroforez ekipmanları (Hooffer güç

kaynağı, çeşitli boyutlarda elektroforez tankları, Hettich marka santrifüj, homojenizatör, fotoğraf makinası ve ekipmanları), SIGMA ve MERCK firmalarından alınmış çeşitli kimyasallar ve densitometre kullanılmıştır.

3.1.1. Polyacrylamide Jel Hazırlamada Kullanılan Çözeltiler (Jeyaseelan ve ark. 1987).

3.1.1.1. Acrylamide Monomer Solüsyonu: %40 T, %1 C
(T=Acrylamide, C=N,N'-methylenebisacrylamide)
*Not: Çözelti filtre edilerek +4°C'de saklanır.

3.1.1.2. Separating (Ayırma) Jel Tamponu: 1.5 M Tris-HCl, HCl ile
pH=8.8' ayarlanır.

3.1.1.3. Stacking (Dengeleme) Jel Tamponu: 0.5 M Tris-HCl, HCL ile
pH=6.8'e ayarlanır.

3.1.1.4. SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) Solüsyonu: %10 (w/v).

3.1.1.5. Ammonium Persulphate (Başlatıcı): %10 (w/v).

3.1.1.6. Elektrod (Running) Tamponu: 0.025M Tris, 0.192 M Glycine,
pH=8.3, %0.1 SDS (w/v).

3.1.1.7. TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.

3.1.2. Solubilizasyon (örnek hazırlama) tamponu: Proteinlerin denatüre edilerek alt birimlere ayrılmaları amacıyla kullanılmıştır.

3.1.2.1. Fritz'in Solubilizasyon Tamponu: 8 M Üre, 2 M Thioüre, %3 SDS, 25 mM Tris-Cl, 75 mM DTT (Dithiothreitol), pH=6.8 (Granzier ve Wang, 1993).

3.1.2.2. Laemmli Solubilizasyon Tamponu: 0.0625 M. Tris-HCl, pH=6.8, %2 SDS, %5 2-Mercaptoetanol, %10 Glicerol, %0.01 Bromophenol Blue (Örnekler kaynar suda 1.5 dakika inkübe edilmişlerdir) (Laemmli, 1970).

3.1.3. Marker Proteinler:

3.1.3.1. MW ND 500: (14200, 28000, 45000, 66000, 132000, 272000, 545000 dalton moleküler ağırlıkta).

3.1.3.2. Bovine Serum Albumin: (66000 dalton moleküler ağırlıkta)

3.1.4. Boyama Solüsyonları: Elektroforezden sonra separe edilmiş proteinlere ait bandların görünür hale gelmesi amacıyla kullanılmışlardır.

3.1.4.1. Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250: Polyacrylamide jellerin boyanması için kullanılmıştır. %0.1 CBB R-250 (w/v), %41.7 Methanol (v/v), %16.7 Acetic acid (v/v), %41.6 (v/v) distile su.

3.1.4.2. Boyadan kurtarma (Destaining) Solüsyonu (CBB için): %30 Methanol (v/v), %10 Acetic acid (v/v), %60 (v/v) distile su.

3.1.4.3. Ponceau S Boyama Solüsyonu: %0.15-0.20 ponceau S, %7.5 trichlorasetik asit. Özellikle cellulose asetate elektroforezinden sonra protein bandlarının görülmesi için kullanılmıştır (Gaal, ve ark., 1980).

3.1.4.4. Boyadan kurtarma (Panceau S için): %5 acetic acid ve %95 (v/v) distile su (Gaal ve ark., 1980).

3.1.5. %2'lik Gliserin: Polyacrylamide jeller boyama ve boyadan kurtarma aşamasından sonra bu çözeltinin içine konularak protein bandlarının şeffaflaşması sağlanmıştır.

3.1.6. %20'lik Sucrose: Örneklerin jele yüklenmesinden önce sulandırılmaları ve gradient jel hazırlamada yoğunluk gradienti oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.7. %0.04'lük Bromophenol Blue: Elektroforez esnasında proteinlerin jel içerisindeki hareketlerini gözleyerek elektroforez işleminin bitim zamanını tayin etmek için kullanılmıştır (Tsvetkova ve ark., 1991).

3.1.8. Agarose jel (% 0.8'lik): Serum proteinlerinin separasyonu için kullanılmıştır (Axelsen ve ark., 1973).

3.1.9. Kağıt Elektroforez İçin Kullanılan Ekipman ve Çözeltiler:

3.1.9.1. Barbitol tampon (Elektrod tampon, Sartorius SM 14203, pH=8.6): Üretici firmanın protokolü uygulanmıştır. Hem kağıt elektroforezi hemde agaroz jel elektroforezinde yürütme tamponu olarak kullanılmıştır.

3.1.9.2. Cellulose- poly-acetat filtre: Kan serumlarının separasyonu için kullanılmıştır.

3.1.9.3. Madeni yağ: Kağıt elektroforezinden sonra boyanan filtrelerin şeffaflaştırılması için kullanılmıştır.

3.1.10. Aşıların Hazırlanmasında Kullanılan Bakteriler:

3.1.10.1. Gram pozitif bakteriler: A grubu *B-haemolitik Streptococcus*, *Staphylococcus albus* (*S.albus*) ve *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) bakterileri kullanılmıştır.

3.1.10.2. Gram negatif bakteriler: *Klebsiella* sp-1 ve *Klebsiella* sp-2 ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) bakterileri kullanılmışlardır.

3.1.11. Bakteri Antijenleri: İmmünizasyon amacı ile kullanılmıştır.

3.1.11.1. "H" antijeni: Hareketli *P.aeruginosa*'dan hazırlanmıştır.

3.1.11.2. "O" antijeni: Diğer bakterilerden hazırlanmıştır.

3.1.12. Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri.

3.1.12.1. Buyyon besiyeri: Bakterilerin üretilmesi için temel besiyeridir (Çetin, 1968).

Bileşimi	g/L
Etözütü	10.0
Pepton	10.0
NaCl	5.0

3.1.12.2. Chapman (Staphylococcus) Agarı: Selektif agar (Anonymous, 1978).

Bileşimi	g/L
Maya özütü	2.5
Kazein peptonu	10.0
Jelatin	3.0
Laktoz	2.0
D(-) mannit	10.0
NaCl	75.0
K ₂ HPO ₄	5.0
Agar	12.0

3.1.12.3. Vogel-Johnson agarı: *Staphylococcus* selektif agarı (Antijen hazırlanması esnasında yoğun bir şekilde ve saf olarak *Staphylococcus* üretmek için kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	g/L
Kazein peptonu	10.0
Etözütü	5.0
D(-) mannit	10.0
K ₂ HPO ₄	5.0
Lityum Chloride	5.0
Glycocoll	10 ml
Phenol red	0.025
Agar	13

Besiyeri otoklav'da 15 dakika steril edildikten sonra 50°C'ye soğutulur ve üzerine filtrasyonla steril edilmiş %1'lik "Potasyum tellürit" çözeltisinden 20 mL ilave edilir.

3.1.12.4. Kanlı Jeloz: Hemolitik *Streptococcus*'ların izolasyonunda kullanılmıştır (Çetin, 1968).

Bileşim	g/L
Pepton	10
Et özütü	10
Kan	80 ml
NaCL	5
Agar	15

Besiyeri otoklavda 15 dakika steril edildikten sonra 45-50°C'ye soğutulur, ve üzerine %5-10 oranında defibrine kan ilave edilerek hazırlanır.

3.1.12.5. MDCLS-Agar: *Enterobacteriaceae* grubu (*Klebsiella* sp.) bakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır (Çolak ve Arıkan, 1990).

Bileşim	g/L
Pepton	10
Laktoz	10
Glukoz	1.0
Sodyum dezoksikolat	0.5
Sodyumtiyosülfat	0.5
Amonyumdemir(III)sitrat	0.5
Sodyum klorür	3
Nötral kırmızısı	0.04
Agar	15

3.1.12.6. GSP-Agar: *Pseudomonas*'ların izolasyonu amacıyla kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşim	g/L
Sodyumglutamat	10
Nişasta	10
KH ₂ PO ₄	0.2
MgSO ₄	0.5
Fenol red	0.36
Agar	12

Besiyeri otoklavda steril edildikten sonra 35°C'ye soğutulur ve gram-pozitif floranın üremesini inhibe etmek için besiyerine 100.000 ünite Penicillin sodyum tuzu ilave edilir.

3.1.12.7. Gela Buyyon: Kanalizasyondan alınan örneklerdeki koliform miktarını artırmak amacıyla kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşim	g/L
Kazein peptonu	10
Safra tuzu	5
Laktoz	10
Jansiye moru	0.04

3.2. METOD

3.2.1. Bakteri İzolasyonları

3.2.1.1. Staphylococcusların İzolasyonu: Ç.Ü. Balcalı Hastahanesi Merkez Laboratuvarından alınan kanlı jelozda üremiş beyaz pigmentli hemoliz yapmayan koloniler seçilmiş ve buyyon kültürleri hazırlanmıştır. Bu kültürden, Chapman agar'a azaltma metoduyla ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde beyaz pigment oluşturan ve gram boyama yönteminde pozitif sonuç veren koloniler *S. albus*, altın sarısı pigment oluşturanlar ise *S. aureus* olarak değerlendirilmiştir. Besiyerinde tek koloni şeklinde üreyen bakteri örneklerinden buyyon kültürleri hazırlanmıştır.

3.2.1.2. Streptococcus İzolasyonu: Balcalı Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarından alınan kanlı agar besiyerinde parlak ve etrafında geniş şeffaf hemoliz zonu bulunan küçük koloniler şeklinde üreyen *Streptococcus* bakterileri alınarak buyyon kültürleri hazırlanmıştır. Bakteriler gram boyama işleminden sonra tekrar kanlı agar besiyerine ekilerek test edilmişlerdir.

3.2.1.3. Pseudomonas izolasyonu: Laboratuvarımızda daha önce izole edilen ve stok kültürü yapılan *P. aeruginosa* bakterileri GSP agar besiyerine azaltma şeklinde ekilerek sterilite kontrolleri yapılmıştır. Besiyerinde 3 mm çaplı,

büyük, etrafında kırmızı-mor zon bulunan koloniler alınarak buyyon kültürleri hazırlanmıştır (Anonymous, 1978).

3.2.1.4. *Klebsiella* İzolasyonu: *Klebsiella* sp., hastane kanalizasyonu atıksu örneklerinden MDCLS-agar besiyerindeki üreme karakteristikleri dikkate alınarak seçilmiştir (Çolak ve Arıkan, 1990).

3.2.2. Antijenlerin Hazırlanması:

3.2.2.1. "O" antijenleri (vücut antijeni):

S. albus, *S. aureus*, β -Haemolitik *Streptococcus* ve *Klebsiella* sp.'den hazırlanmıştır. Selektif besiyerlerinde yoğun şekilde üretilen bakteri örnekleri steril fizyolojik su ile süspanse hale getirilip sentrifüj edilerek bakteriler çöktürülmüştür.

Bakteri pelletleri fizyolojik su ile üç kez yıkanmışlardır. Pellet 10 hacim %95'lik etanolle süspanse edilmiş ve 45°C'lik sıcak su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Örnekler 4500 rpm'de 10 dakika sentrifüj edilerek süpernatant atılmış ve bakteri pelletleri tuzlu suda %0.8'lik NaOH süspanse hale getirildikten sonra üzerine koruyucu olarak %0.25 chloroform ilave edilmiş ve buzdolabında saklanmışlardır. Antijenler 24 saat buzdolabında bekletildikten sonra buyyon kültürleri hazırlanıp sterilite kontrolü yapılmıştır. Antijen örnekleri 3 numaralı standart bulanıklık tüpünün yoğunluğunda sulandırılarak kullanılmışlardır (Çetin, 1968).

3.2.2.2. "H" antijenleri (kırpık antijeni):

P. aeruginosa bakterisinden hazırlanmıştır. Petri kutusuna yayılan (GSP agar) bakterinin S şeklinde (düzgün) ve hareketli (mikroskopta hareket muayenesi yapılmıştır) koloni seçilmiştir. Bu kolonilerden buyyon kültürü hazırlanarak (0.1 mL) yoğun bir şekilde bakteri üretebilmek amacıyla GSP agar'a yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra besi yeri üzerinde üreyen bakteriler toplanmış ve %0.9'luk NaCl çözeltisinde süspanse edilmişlerdir. Süspanسیون 3 kez steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra karışıma %0.1-0.2 oranında formalin ilave edilmiştir.

Antijen 24 saat buzdolabında bekletildikten sonra tekrar sterilite kontrolü yapılmıştır. Elde edilen süspansiyonun yoğunluğu formalinli buyyon kullanılarak 3 numaralı standart bulanıklık tüpüne göre seyreltilmiştir. Bu süspansiyon sonraki aşılamalarda kullanılmak için uzun süre saklanmıştır (Çetin, 1963).

3.2.3. Aşıların Uygulanması (immünizasyon):

3.2.3.1. Farelerin adjuvant kullanmadan aşılınması: 10-12 haftalık (Yoshida ve ark., 1991; Jungblut ve ark., 1993), 90-100 gram ağırlıktaki erkek ve dişi (Udhayakumar ve Muthukkaruppan, 1989) sağlıklı *Mus musculus var. albinus* fareleri seçilerek ayrı kafeslere alınmıştır. Saf halde izole edilen bakterilerden hazırlanan "O" ve "H" antijenleri sırasıyla 0.075, 0.150, 0.225 ve 0.3 mL miktarlarda 7 şer gün aralıklarla insülin enjektörü yardımıyla deri altına enjekte edilmişlerdir (Udhayakumar ve Muthukkaruppan, 1989; Kuhröber ve ark., 1994). Her deney grubu için 5 fare alınmış ve her hayvana 4 kez aşı uygulanmıştır. Kontrol olarak aynı kriterlere sahip fareler seçilerek kullanılmıştır. Fareler uygun koşullarda laboratuvarımızda üretilmiştir.



Şekil 4. Farelere antijenlerin enjeksiyonu (subkutan).

3.2.3.2. Freund's complete adjuvant kullanarak farelerin aşılanması :

Daha önce bahsedilen bakteri antijenleri bu kez Freund's complete adjuvantla birlikte uygulanmıştır (Udhayakumar ve Muthukaruppan, 1989; Kuhröber ve ark., 1994). Her bakteri antijeni ve kontrol grubu için 5'er adet (daha önce bahsedilen özellikteki) fare seçilmiştir. Aşılamalar yine 7 gün aralıklarla toplam 4 kez uygulanmıştır. İlk aşılama için 0.050 mL adjuvant + 0.050 mL bakteri antijeni ile karıştırılmış ve bu şekilde deri altına verilmiştir. Bu miktarlar her aşılama için 0.025 mL artırılabilmektedir (Axelsen ve ark., 1973; Udhayakumar ve Muthukaruppan, 1989).

3.2.4. Elektroforez deneyleri için örneklerin hazırlanması:

3.2.4.1. Farelerin kesilmesi: Son aşılamadan 7 gün sonra (Kuhröber ve ark., 1994; Kwapiński ve ark., 1972) kontrol ve deney grubu fareler 1:1 oranında eter:chloroform karışımında bir fanus içinde bayıldıktan sonra kesilerek (servikal dislokasyon) kanları sentrifüj tüplerine alınmıştır.



Şekil 5. Kesilen farelerden organların çıkarılması (diseksiyon).

Kan örnekleri oda sıcaklığında 2 saat pıhtılaştırıldıktan sonra (Nakaruma ve ark.,1993) 5000 rpm'de 15 dakika sentrifüj edilerek serumları ayrılmış ve elektroforez aşamasına kadar -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca kesilen farelerin karaciğer, kalp, böbrek ve dalakları alınarak steril renkli şişeler içerisinde -20 °C'de saklanmışlardır. Böylece örneklerin bozulması ve elektroforez esnasında oluşabilecek hatalar ortadan kaldırılmaktadır (Anderson ve ark., 1991).

3.2.4.2. Proteinlerin Ekstraksiyonu:

3.2.4.2.1. Solubilizasyon tamponu ile ekstraksiyon:

Her bir organdan 0.2 g örnek tartılarak 4 mL Fritz'in solubilizasyon (örnek) tamponu içinde henkel homojenizatörü kullanarak 9500 rpm'de 10 dakika homojenizasyon işlemine tabi tutulmuştur (Granzier ve Wang, 1993). Homojenatlar polipropilen tüplere alınıp 30 dakika 56°C'lik su banyosunda inkübe edilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır (Groschup ve ark., 1991). Karışım oda sıcaklığında 10 dakika 10000 rpm'de (Hettich marka sentrifüj kullanılarak) sentrifüj edildikten sonra üst faz elektroforez deneylerinde kullanılmak üzere eppendorf tüpleri içerisinde -20°C'de saklanarak örneklerin bozulması ve elektroforez esnasında oluşabilecek hatalardan korunulmuştur (Anderson ve ark., 1991).

3.2.4.2.2. Denatüre edilmeden (dondurup-ezme) ekstraksiyon:

İmmünizasyondan sonra farelerden alınan ve -20°C'de saklanan karaciğer örneklerinden 0.4 g tartılarak 1 mL distile su içerisinde bir havanda ezilmiş ve tekrar -20°C'de dondurulmuştur. Derin dondurucudan çıkarılan örnek tekrar havanda ezilerek homojen hale getirilmiştir. Son hacim 4 mL olacak şekilde distile su ilavesi yapıldıktan sonra 5000 rpm'de 20 dakika sentrifüj edilerek üst faz temiz polipropilen tüplere transfer edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler SDS'siz (Nativ) PAGE-Slab jellerinde separe edilmişlerdir (Walker ve ark., 1988; Aledo ve ark., 1993).

3.2.5. Acrylamide jellerinin hazırlanması

3.2.5.1. Homojen SDS-PAGE Slab jelinin hazırlanması (%10'luk).

Separating Jel Bileşimi

Acrylamide monomer (%39 T, %1 C)	2.43 mL
Tampon (1.5 M Tris-HCl, pH=8.8)	3.75 mL
SDS Solüsyonu (%10 w/v)	0.15 mL
Distile su	3.66 mL
Toplam hacim	10.00mL

Yukarıda verilen maddeler belirtilen miktarlarda küçük bir şişe içerisinde karıştırılır ve moleküler oksijenin uzaklaştırılması için vakum pompası yardımıyla 5 dakika degaz yapılır (Jeyaseelan ve ark., 1987). Bu işlemden sonra karışıma; 20µL AMPS (İnisiyator) ve 10 µL TEMED ilave edilerek önceden hazırlanmış cam plakalar arasına dökülmüştür. Jel yüzeyinin düzgün olması ve atmosferik oksijenin jele difüzyonunu engellemek için üst yüzey ince bir su tabakası ile kaplanır. Oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika bekletilerek jelin polimerize olması sağlanır. Separating jelin üzerinden su uzaklaştırılır, yaklaşık 2-3 cm yükseklikte stacking jel döküldükten sonra tarak yerleştirilir ve oda sıcaklığında 24 saat polimerizasyona bırakılır (Geribaldi ve ark., 1993). Polimerizasyonun jelin bütün bölgelerinde homojen bir şekilde gerçekleşmesi için bir gün bekletilmesi önerilmektedir (Gaal ve ark., 1980).

3.2.5.2. Stacking jel hazırlama: Stacking jeller genelde % 3.5-5 aralığında kullanılmaktadır (Rasmussen ve ark., 1991).

Akrilamid monomer	1.2 mL
Stacking jel tamponu (pH=6.8)	2.5 mL
SDS (%10 w/v)	0.1 mL
Distile su	6.1 mL

Yukarıdaki maddeler küçük bir şişe içerisinde karıştırılıp, vakumla 5 dakika degaz yapıldıktan sonra; 0.1 mL AMPS ve 10 µL TEMED ilave edilir karıştırılarak enjektör yardımıyla hava kabarcığı oluşturmadan separating jelin üzerine döküldükten sonra tarak yerleştirilir ve oda sıcaklığında 24 saat

polimerizasyona bırakılır ((Jeyaseelan ve ark., 1987; Wang ve Pan, 1991; Geribaldi ve ark., 1993).

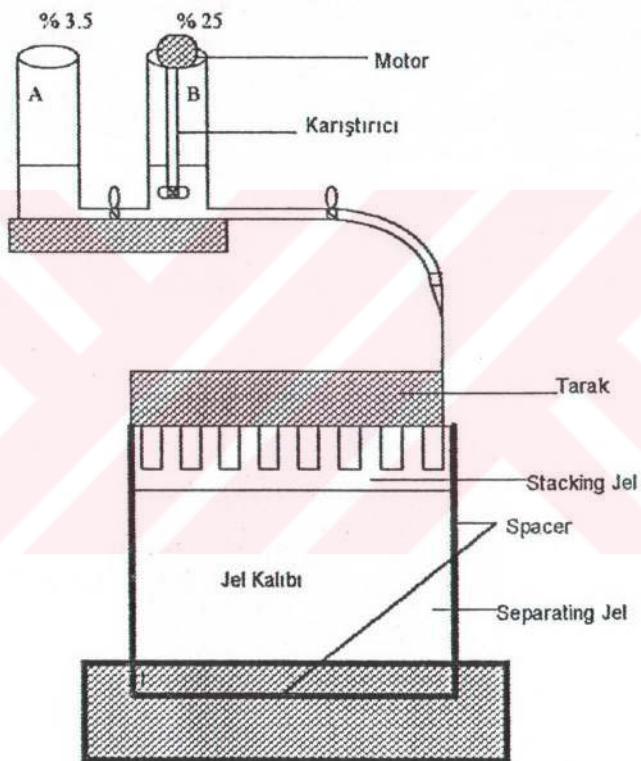
3.2.5.3. SDS-PAGE GRADİENT JELLERİN HAZIRLANMASI

Gradient jel hazırlamak için yoğunlukları farklı olan A ve B şeklinde iki ayrı karışım hazırlanır. Jel'de gradient oluşumunu gerçekleştirmek amacıyla yoğunluğu fazla olan (B) karışıma sucrose (% 20'lik) ilave edilir. A ve B şeklinde hazırlanan karışımlar SDS-PAGE jelleri için uygulanan işlemlerden geçirildikten sonra "gradient jel maker" kullanarak cam plakalar arasına dökülür ve polimerizasyon işlemi aynı şekilde gerçekleştirilir. A ve B şeklinde tanımlanan karışımların bileşimleri aşağıdaki şekildedir (Jeyaseelan ve ark., 1987). Yapılan araştırmalar sonunda % 4-28'lik gradient jellerde separasyonun oldukça başarılı olduğu bulunmuştur (Tyagi ve ark., 1993).

	A KARIŞIMI (%5)	B KARIŞIMI (%20)
Acrylamide monomer	1.8 mL	7.5 mL
Separating jel tamponu (pH=8.8)	3.75 "	3.75 "
SDS (%10)	0.15 "	0.15 "
Sucrose (%20)	0.00 "	2.25 "
Distile su	9.3 "	1.35 "

A ve B karışımları ayrı ayrı degaz edildikten sonra 60µL AMPS ve 5 µL TEMED ilave edilerek zaman kaybetmeden gradient jel maker'ın uygun gözlerine dökülür. İki göz arasındaki vana açılarak iki karışım arasında bağlantı sağlanır. B gözündeki karışım düşük bir hızda karıştırılarak jel iki cam plaka arasına dökülür. Jelin yüzeyi ince bir su tabakası ile kapatılır. Jel ile su tabakası arasında belirgin bir hat oluşması polimerizasyonun başladığını gösteren bir kriterdir. Polimerizasyon işleminin jelin üst bölgesinden başlaması konveksiyon akımlarının önlenmesi açısından önemlidir. Bu nedenle dökme işleminin sonuna doğru tekrar AMPS ilave edilir (Jeyaseelan, 1987). Diğer işlemler SDS-PAGE uygulamasında olduğu gibidir. Gradient jel hazırlama aleti şekil 6'da görülmektedir.

GRADIENT JEL MAKER



Şekil 6. Gradient SDS-PAGE Jel Dökme Aparatı

3.2.5.4. Native-PAGE-Slab jellerinin hazırlanması (%7.5)

Daha önce anlatılan SDS-PAGE-Slab jellerinin hazırlanmasında uygulanan prosedür "jel bileşimi ve Runnig tampon bileşiminden SDS çıkarılarak" takip edilmiştir (Walker ve ark., 1988). Nativ-PAGE jelleri daima alkali pH'larda gerçekleştirilir (Wang ve Pan, 1991).

3.2.5.5. Agaroz jellin hazırlanması:

İstenilen konsantrasyonda agaroz (%0.8) Barbitol tampon (pH=8.6) içerisinde eritilerek hazırlanmıştır. 45-50°C'ye soğutulduktan sonra önceden hazırlanmış cam plaka üzerine (2 mm kalınlıkta) dökülerek tarak yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında polimerize olduktan sonra oluşan gözle 10 µL örnek uygulanmıştır. Daha sonra horizontal pozisyonda elektroforez aletine yerleştirilerek 20 mA'de 50 V'ta separasyon gerçekleştirilmiştir (Axelsen ve ark., 1973). Separasyondan sonra jel 10 dakika pikrik asit içerisinde bekletilerek proteinlerin presipitasyonu sağlanmış, 10 dakika %96'lık etanol muamelesi ile pikrik asit uzaklaştırılmıştır. Daha sonra jel filtre kağıtları arasında preslenmiş ve saç kurutma makinası ile kurutulup ve Coomassie Blue R 250 ile boyanmıştır (Axelsen ve ark., 1973).

3.2.6. Elektroforez deneyleri:

3.2.6.1. Protein Örneklerinin Jele Uygulanması:

Fritz'in örnek tamponu içerisinde hazırlanan protein karışımları ve "marker protein" 1:5 oranında %20'lik sükröz çözeltisi ile seyreltilerek (10 µL sükröz, 50 µL örnek). Hazırlanan bu protein karışımlarından 30 µL, jelde oluşturan gözle mikropipet yardımı ile konulmuştur. Gözlerin birine separasyona uğratılacak örneklerin moleküler ağırlıklarını karşılaştırmak için 10 µL Marker protein (MW ND 500 SIGMA veya Bovine serum albumine) konulmuş ve elektroforez süresince moleküllerin jel içerisindeki hareketlerini gözleyebilmek amacıyla örneklerden biri bromophenol blue boyası ile işaretlenmiştir (Himber, 1993; Gaal ve ark., 1980).

3.2.6.2. Separasyon:

Örneklerin yüklenmesinden sonra jel elektroforez aletine dikey pozisyonda yerleştirilerek 10-15 mA'de 12-15 saat süreyle 45-80 Volt akım uygulanıp (Anderson ve ark., 1991) buzdolabında (4°C'de) veya oda sıcaklığında separasyon gerçekleştirilmiştir. Anot ve katot bölgesindeki tamponlar elektrolizinin sebep olacağı pH değişikliklerini engellemek ve iyonik yükün dengede kalmasını sağlamak amacıyla sürekli karıştırılmıştır. Elektroforez işlemi bromophenol boyası jelin tabanına yaklaştığında (0.5 cm) sonlandırılmıştır (Granzier ve Wang, 1993).



Şekil 7. Akrilamid jellerin vertikal olarak uygulandığı elektroforez ekipmanı.

3.2.6.3. Kağıt elektroforezi ile serum proteinlerinin separasyonu

Cellulose asetat membran önceden barbitol tampon içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra, elektroforez aletine horizontal pozisyonda gergin bir şekilde yerleştirilmiştir. 2 mA'de 10 dakika pre-elektroforez yapıldıktan sonra aplikatör yardımıyla serum örnekleri (katod bölgesine) uygulanmıştır. Separasyon 150 V'ta 1/2 saat oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Race, 1973; Axelsen ve ark., 1973).

3.2.7. Poliakrilamid Jellerin Boyanması

3.2.7.1. Coomassie Brilliant Blue ile boyanması

Elektroforez işleminden sonra jel cam plakalar arasından çıkartılarak boyama solusyonuna konulmuştur. Ortalama 12 saat karıştırarak boyama yapıldıktan sonra jeldeki boyanın geri alınması işlemleri uygulanmıştır (Rasmussen ve ark., 1991; Anderson ve ark., 1991; Miller ve Gemenier, 1993). Jel, boyama süresinin bitiminde destaining çözeltisine konularak 4 saat jeldeki boyanın çıkarılması sağlanmış ve protein bandlarının daha net görünmeleri için %2 lik gliserin çözeltisinde 24 saat bekletilmiştir. Ayrıca; jeller, bandların daha belirgin duruma gelmeleri ve fotoğraf çekme sırasında net görüntü elde etmek için kurutma aletinde (Model SE 1160 Slab-Gel Dryer) de 2,5 saat süreyle kurutulmuşlardır. Bu işlemin sonunda jellerin fotoğrafları çekilerek, marker proteinin ve denenen protein örneklerinin jeldeki göç etme mesafeleri karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

3.2.8. Cellulose Acetate Membranların Boyanması:

Elektroforez işleminden sonra membranlar **Ponceau S** boya çözeltisinde 5 dakika boyandıktan sonra asetik asitte boyadan kurtarma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra sadece protein bandlarının bulunduğu bölgeler boyanmış (kırmızı renkli) görülmektedirler (Gaal ve ark., 1980; Race, 1973). Daha sonra membranlar 90°C'de 5 dakika fırında kurutulmuş, 3

dakika madenli yağda şeffaflaştırılmıştır. Son aşamada oluşan protein bantları kantitatif olarak densitometrede değerlendirilip sonuçlar grafiklerle gösterilmişlerdir. (Densitometrik değerlendirmeler Ç.Ü. Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarında yapılmıştır).

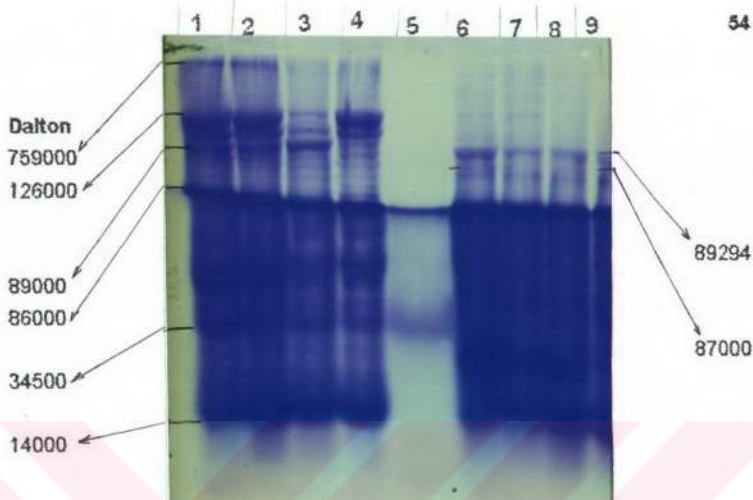
3.2.9. Protein bantlarının moleküler ağırlıklarının hesaplanması

Poliakrilamid jeller kullanarak yapılan separasyonlardan sonra, ortaya çıkan protein bantları tesbit edilmiş ve standart (marker) proteinler ile doğal proteinlerin jel içerisinde göç ettikleri mesafe karşılaştırılarak moleküler ağırlıklar yaklaşık olarak hesaplanmıştır (Tyagi ve ark., 1993; Himber, 1993; Rhyum ve ark., 1994).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada çeşitli bakteri antijenleri ile immünize edilen ve kontrol olarak seçilen *Mus musculus* var. *albinus* farelerine ait **karaciğer (KC)**, **kalp (K)**, **böbrek (B)**, **dalak (D)** ve **kan serum proteinleri** çeşitli elektroforez yöntemleri kullanılarak analiz edilmişlerdir. **Organlardan ekstrakte edilen protein karışımları**; homojen SDS-PAGE (%7.5, %10), gradient SDS-PAGE (%3.5-10, %6-12, %7-25), homojen Nativ-PAGE (%7.5) poliakrilamid jellerinde analiz edilmişlerdir. **Kan serum proteinleri**; gradient SDS-PAGE (%3.5-10), agarose (%0.8) jel ve cellulose polyacetate kağıt elektroforez metodları ile analiz edilmişlerdir.

Elektroforez sonucunda ortaya çıkan birçok protein bandı arasında, yoğunluk bakımından fark gösteren ve kontrolde mevcut olmadığı halde deney gruplarında ilk kez görülen fragmentler değerlendirmede önemlidir. Bahsedilen bu özellikleri gösteren protein bantları marker proteinlere göre değerlendirilip, moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak saptanmıştır. Marker protein olarak bazı separasyonlarda MW ND 500 (mw=14200-545000 dalton), bazılarında ise Bovine serum albumin (mw=66000 dalton) kullanılmıştır. Çeşitli elektroforez uygulamalarından elde edilen sonuçlar şekillerle ve grafiklerle gösterilmektedir.



Şekil 8. % 7.5'lik homojen SDS-PAGE jelinde karaciğer ve kalp örneklerinin separasyonu.

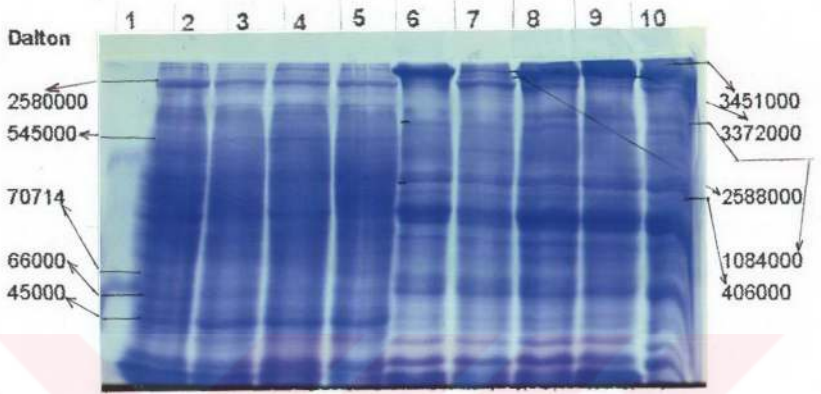
Karaciğer (KC) ve kalp (K) örnekleri %7.5'lik homojen SDS-PAGE Slab jelinde, 10 mA'de 12 saat süreyle separasyona sokulmuşlardır.

Şekildeki örneklerin yerleşimi;

1-Kontrol (KC), 2-*P.aeruginosa* (KC), 3-*Klebsiella* sp-1 (KC), 4-*S.albus* (KC), 5-Marker Protein(MP), 6-Kontrol (K), 7-*P.aeruginosa* (K), 8-*Klebsiella* sp-1 (K), 9-*S.albus* (K) şeklindedir. Örnekler 30 μ L, MP 20 μ L miktarlarda uygulanmıştır.

Şekilde yer alan 1,2,3 ve 4 numaralı karaciğere ait sütunlar incelendiğinde 759000, 126000, 89000, 86000 34500 ve 14000 dalton moleküler ağırlıkta ve bunların arasında çeşitli protein bantları saptanmıştır.

6, 7, 8 ve 9 numaralı kalbe ait sütunlar incelendiğinde; 89294 ve 87000 dalton moleküler ağırlıkta ve bunların arasında çeşitli protein bantları saptanmıştır.



Şekil 9. %10'luk homojen SDS-PAGE jelinde karaciğer ve kalp örneklerinin separasyonu.

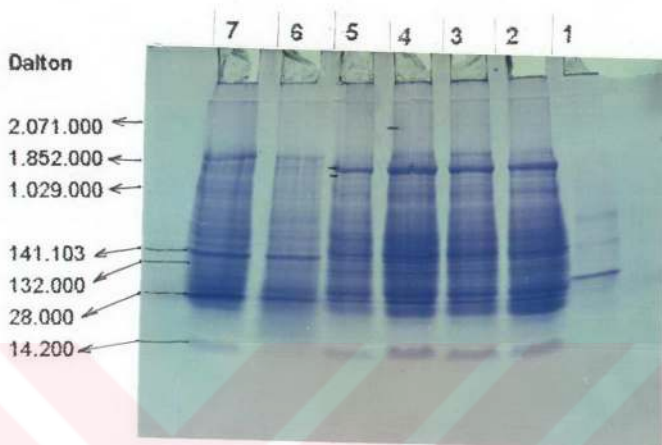
%10'luk homojen SDS-PAGE jel şeklinde hazırlanmış ve separasyon 15 mA'de (60 V), oda sıcaklığında 12 saatte gerçekleştirilmiştir. **Karaciğer (KC)** ve **kalp (K)** örnekleri aynı jelde yürütülmüşlerdir.

Şekildeki örneklerin yerleşimi;

1-Marker Protein *MP* (MW ND 500, 14000-545000), 2-Kontrol (KC), 3-*P.aeruginosa* (KC), 4-*Klebsiella* sp-1 (KC), 5-*S.albus* (KC), 6-Kontrol (K), 7-*P.aeruginosa* (K), 8-*Klebsiella* sp-1 (K), 9-*Klebsiella* sp-2 (K), 10-*S.albus* (K) şeklindedir. MP 20 µL, diğer örnekler 30 µL miktarlarda uygulanmıştır.

Şekilde 2, 3, 4 ve 5 nolu sütunlar karaciğere ait olup, 2580000, 545000, 70714, 66000 ve 45000 daltonluk ve farklı bandlar saptanmıştır.

6, 7, 8, 9 ve 10 numaralı sütunlar kalp örneklerine ait olup 3451000, 3372080, 2588000, 1084000 ve 406500 dalton moleküler ağırlıkta ve bunların arasında moleküler ağırlık ve yoğunluk bakımından birbirinden çok farklı fragmentler farkedilebilmektedir.



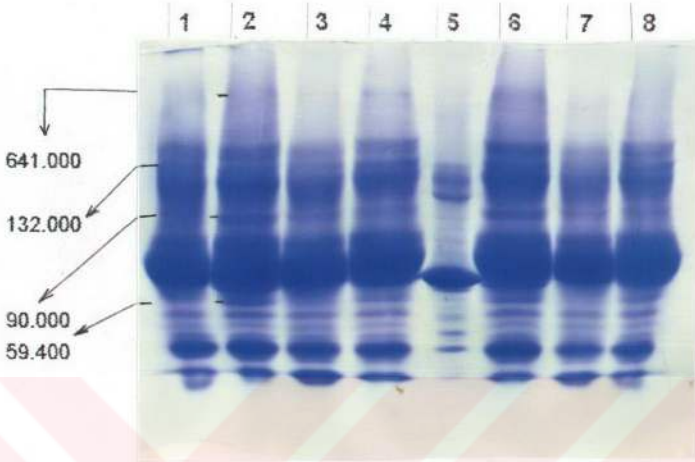
Şekil 10. %3.5-10'luk gradient SDS-PAGE jelinde böbrekten ekstrakte edilen proteinlerin separasyonu.

%3.5-10'luk gradient SDS-PAGE jelde, 15 mA'de 12 saat süreyle böbrek (B) örnekleri elektroforeze sokulmuşlardır.

Şekildeki örneklerin yerleşimi;

1-Marker Protein, 2-Kontrol (B), 3-Kontrol (B), 4-*Klebsiella* sp-1 (B), 5-*Klebsiella* sp-2 (B), 6-*P.aeruginosa* (B), 7-*S.albus* (B) şeklindedir. Örnekler 30 µL, MP 20 µL miktarlarda uygulanmıştır.

Oluşan bandlar marker proteine göre değerlendirildiği zaman sırasıyla, 2071000, 1852000, 1029000, 132000, 141103, 28000 ve 14200 daltonluk ve bunların arasında birbirinden farklı çok sayıda protein fragmenti görülmektedir.



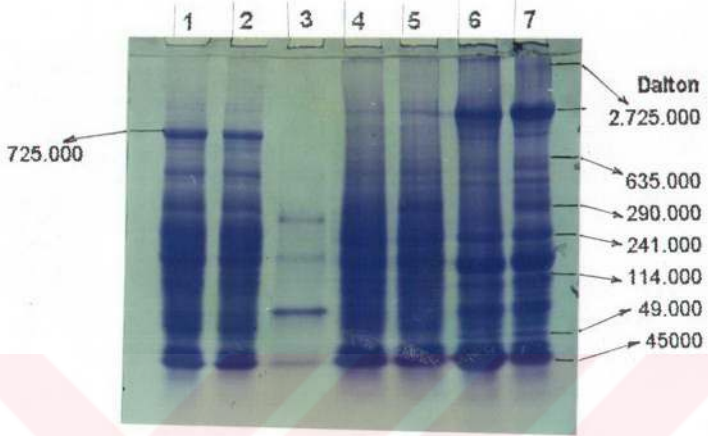
Şekil 11. % 3.5-10'luk Gradient SDS-PAGE jelinde (Adjuvant uygulanmasından sonra) Kan Serumlarının Separasyonu.

Örnekler 10 mA'de +4°C'de 10 saat süreyle separe edilmişlerdir.

Şekildeki örneklerin yerleşimi;

1-Kontrol, 2-*Klebsiella* sp-2, 3-*P.aeruginosa*, 4-*S.aureus*, 5-Marker Protein (BSA), 6-*Klebsiella* sp-2, 7-*P.aeruginosa*, 8-*S.aureus* şeklindedir.

Şekilde görülen protein bantları Bovine serum albumin'e göre değerlendirildiğinde, sırasıyla 641000, 132000, 90000 ve 59400 dalton moleküler ağırlıkta ve bunlardan farklı birçok fragment saptanmıştır.



Şekil 12. %6-12'lik gradient SDS-PAGE jelinde *Staphylococcus albus* antijeni uygulanmış **karaciğer, böbrek ve kalp** örneklerinin separasyonu.

Karaciğer (KC), böbrek (B) ve kalp (K) örnekleri %6-12'lik gradient SDS-PAGE jelinde 10 mA'de 9 saat süreyle oda sıcaklığında separe edilmişlerdir.

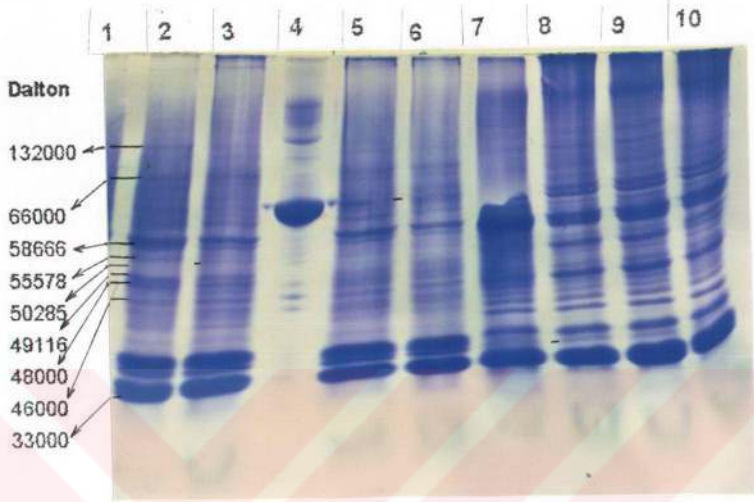
Şekildeki örneklerin yerleşimi;

1-Kontrol (KC), 2-*S.albus* (KC), 3-Marker protein (MW ND 500), 4-Kontrol (B), 5-*S.albus* (B), 6-Kontrol (K), 7-*S.albus* (K) şeklindedir.

Karaciğer örnekleri incelendiğinde; 49000 dalton,

Böbrek örneklerinde, 725000 dalton,

Kalp örneklerinde; sırasıyla 2725000, 725000, 635000, 290000, 241000, 114000 ve 45000 dalton moleküler ağırlıkta ve bu fragmentler arasında birbirinden farklı birçok fragment görülmektedir.



Şekil 13. %7-25'lik gradient SDS-PAGE jelinde dalak ve kalp örneklerinin separasyonu (Adjuvant uygulamasından sonra).

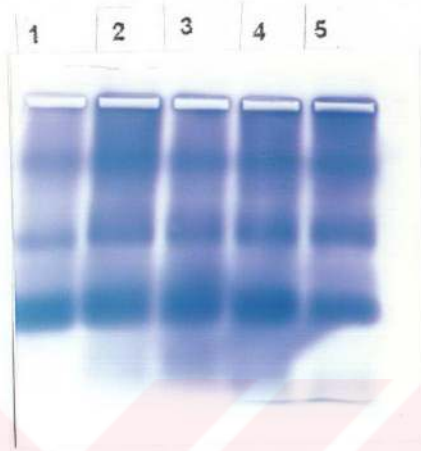
%7-25'lik gradient SDS-PAGEjelinde dalak (D) ve kalp (K) örnekleri +4° C'de, 10 mA'de 12 ssat süreyle separe edilmişlerdir.

Şekildeki örneklerin yerleşimi;

1-Kontrol (D), 2-Kontrol (D), 3-*S.aureus* (D), 4-Marker Protein (BSA), 5-*Klebsiella* sp-2 (D), 6-*P.eruginosa* (D), 7-Kontrol (K), 8-*S.aureus* (K), 9-*Klebsiella* sp-2 (K), 10-*P.aeruginosa* (K) şeklindedir.

Dalak örneklerinde, 66000, 58666, 49116, 46000 dalton,

Kalp örneklerinde, 132000, 55578, 50285, 48000 ve 33000 dalton moleküler ağırlıkta ve bunlar arasında birbirinden farklı pek çok protein bandı görülmektedir.



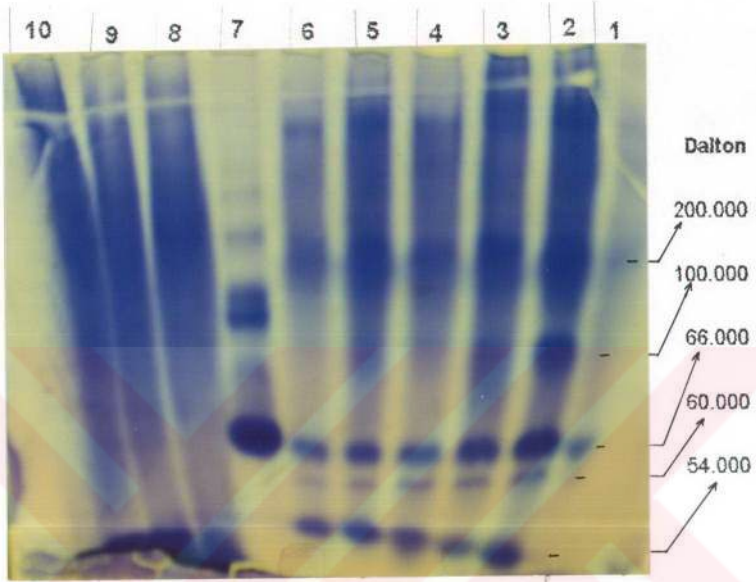
Şekil 14. %0.8'lik agarose jelinde kan serum proteinlerinin separasyonu.

%0.8'lik agarose jelinde serum proteinleri 55 V'ta, 20 mA'de, 4 saat süreyle oda sıcaklığında separe edilmişlerdir.

Şekildeki örneklerin yerleşimi;

1-Kontrol, 2-*Streptococcus*, 3-*S.albus*, 4-*P.aeruginosa*, 5-*Klebsiella* sp-2 şeklindedir.

Kontrolde ve diğer örneklerde yoğunlukları birbirinden farklı 4 protein fragmenti saptanmıştır.



Şekil 15. %7.5'lik homojen Native-PAGE jelinde **denatüre edilmiş ve denatüre edilmemiş karaciğer** örneklerinin separasyonu.

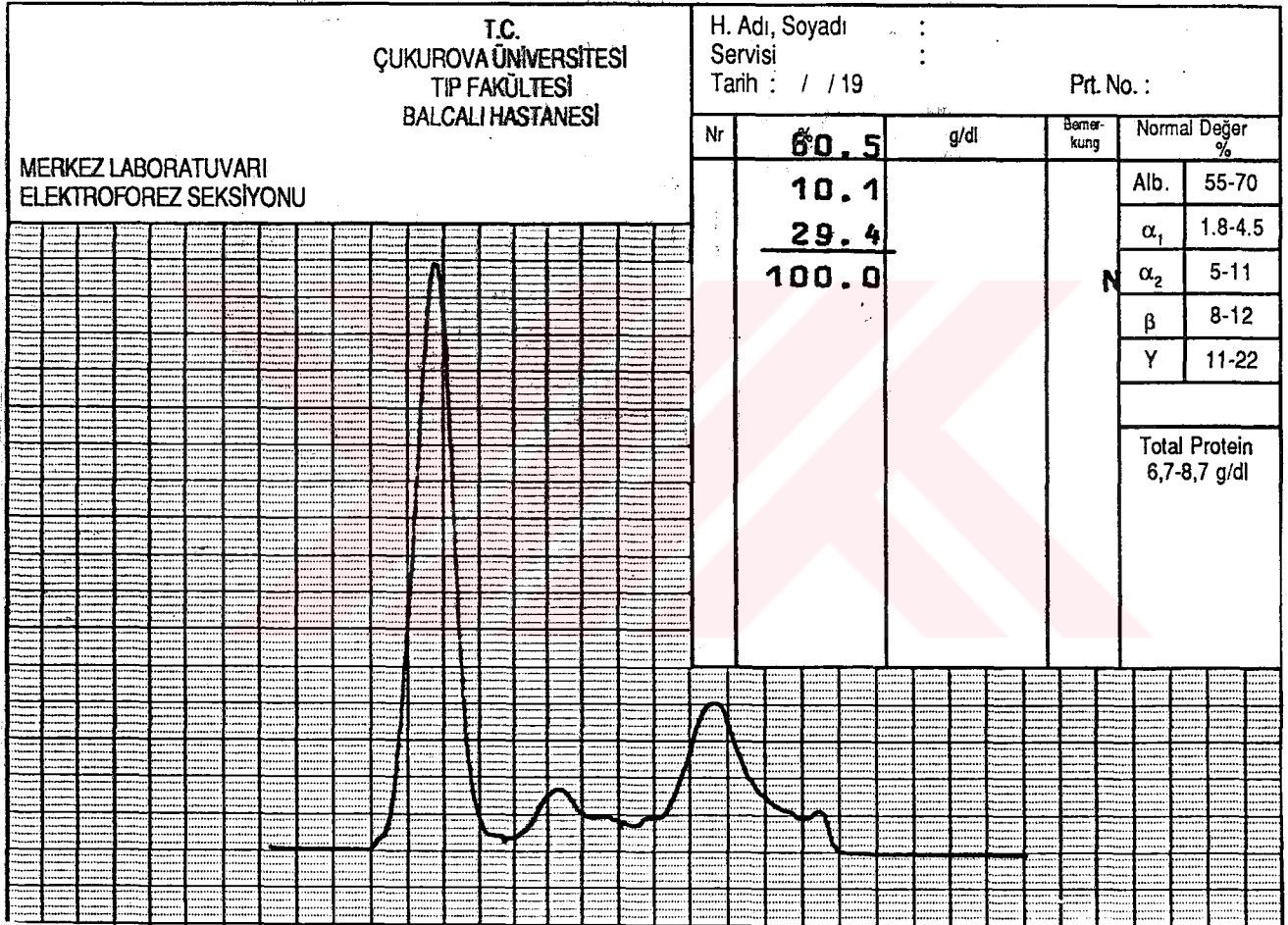
%7.5'lik SDS'siz homojen nativ-PAGE jelinde Denatüre edilmiş (D) ve Denatüre edilmemiş (ND) karaciğer örnekleri, oda sıcaklığında, 10 mA'de, 12 saat süreyle separe edilmişlerdir.

Şekildeki örneklerin yerleşimi; 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 nolu sütunlar denatüre edilmiş, 8, 9, ve 10 nolu sütunlar ise denatüre edilmemiş karaciğer örneklerine aittir.

1-Kontrol (KC), 2-*P.aeruginosa* (KC), 3-*Klebsiella* sp-2 (KC), 4-*Klebsiella* sp-1 (KC), 5-*S.albus* (KC), 6-*Streptococcus* (KC), 7-Marker Protein (BSA), 8-Kontrol (KC), 9-*P.aeruginosa* (KC), 10-*S.albus* (KC) şeklindedir. Örnekler 30µL Marker 20 µL miktarlarda uygulanmıştır.

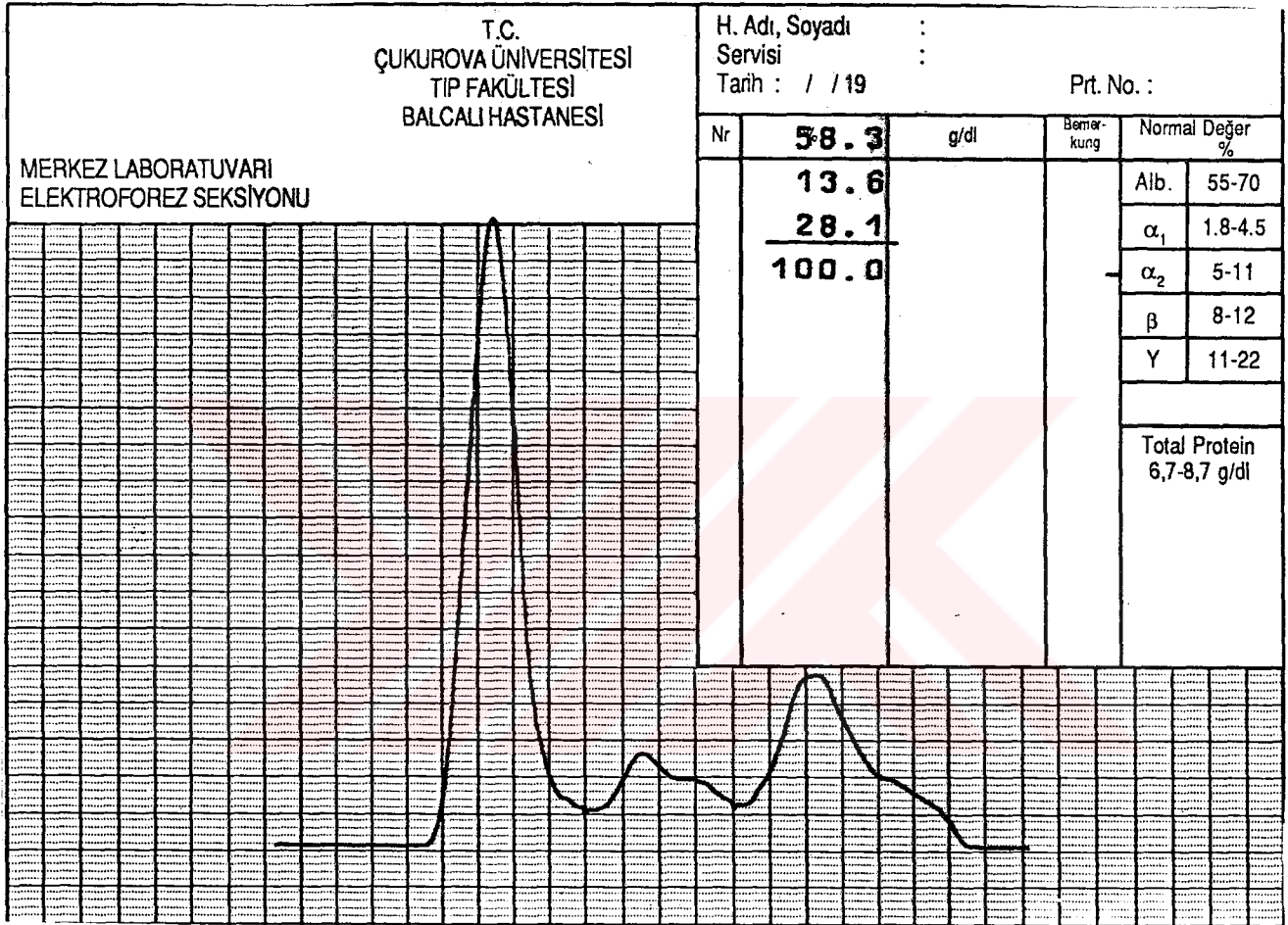
Denatüre edilmiş örneklerde sırasıyla; 200000, 100000, 66000, 60000, 54300 dalton moleküler ağırlıkta protein fragmentleri saptanırken denatüre edilmemiş örneklere ait sütunlarda herhangi bir bandlaşma görülmemektedir.

Kan serum örnekleri kağıt elektroforez (cellulose polyacetate) yöntemiyle analiz edilmiştir. Elektroforez 150 V'ta oda sıcaklığında 1/2 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforezin bütün aşamalarından sonra selüloz membranlar üzerinde oluşan protein bantları dansitometre'de kantitatif (%) olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar grafiklerde görüldüğü gibidir.



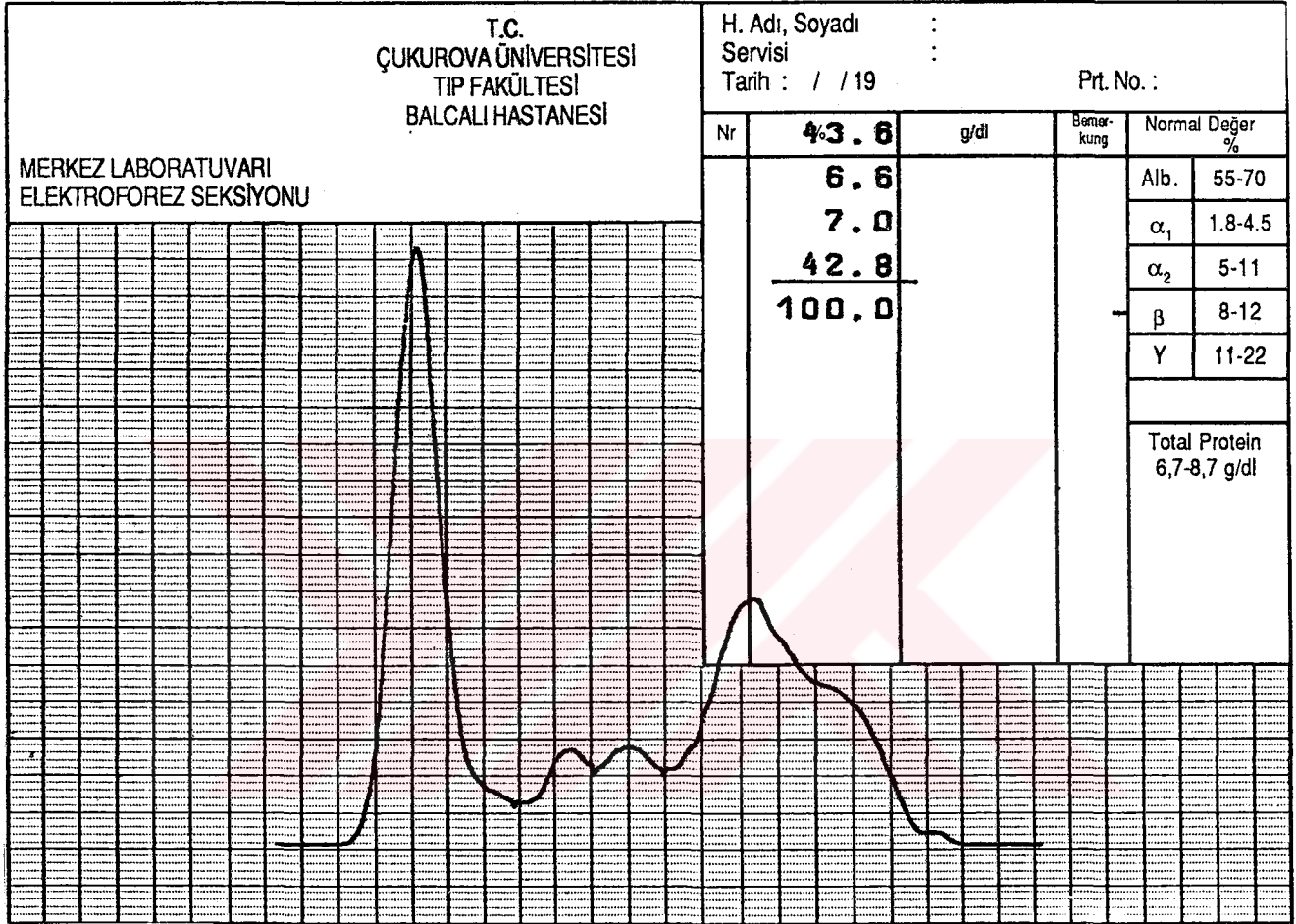
Şekil 16. Kontrol kan serumu'na ait kağıt elektroforez grafik sonuçları.

Kontrol kan serum örneğinde; albumin % 60.5, α_1 % 10.1, α_2 % 29.4 ve β % 0.0



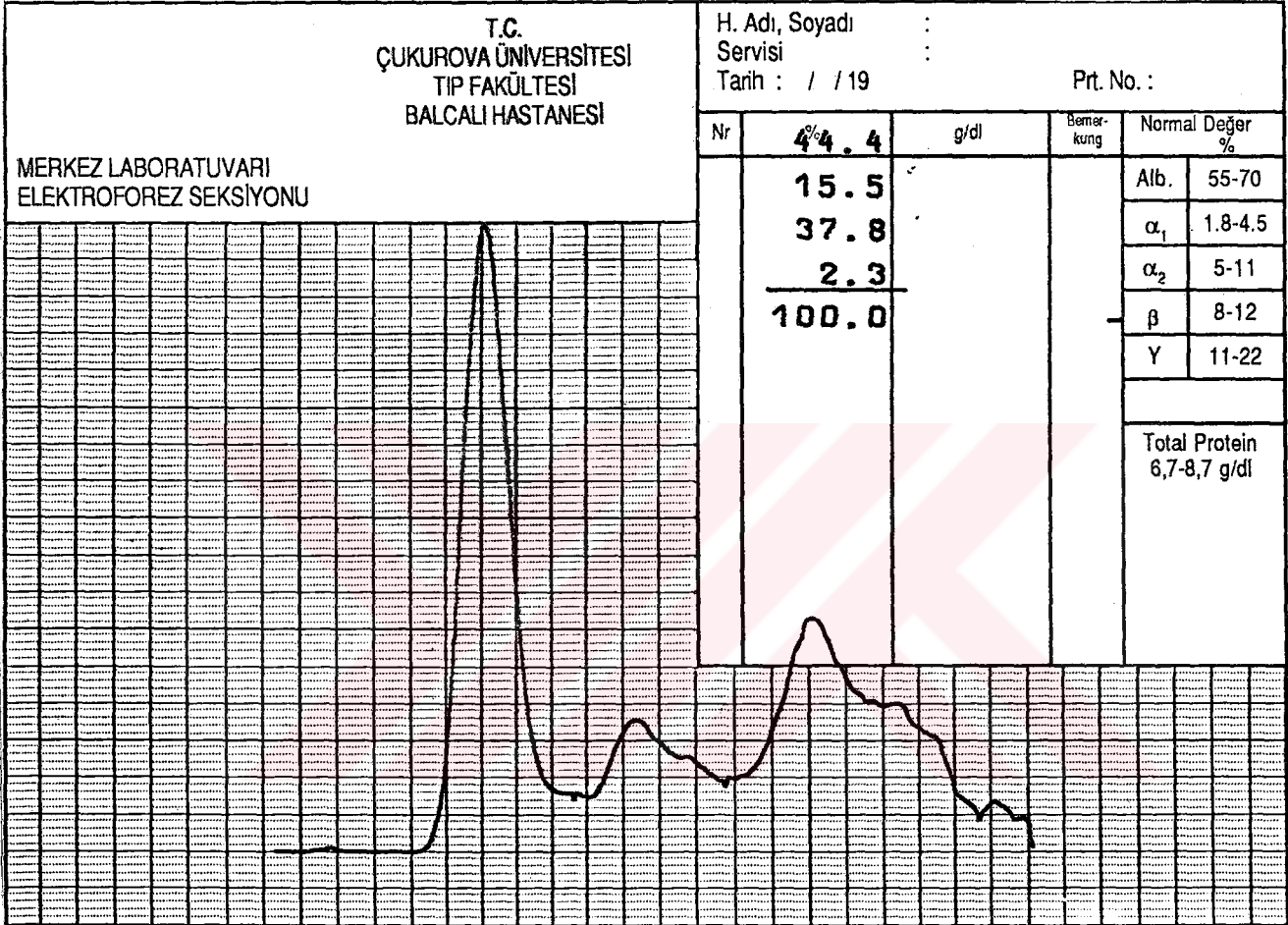
Şekil 17. *Staphylococcus* antijeni ile aşılanmış fare serumunun kağıt elektroforez sonuçları.

S.aureus antijeni ile aşılanmış farelere ait serum örneğinde; albumin % 58.3, α_1 % 13.6, α_2 % 28.1 ve β % 0.0,



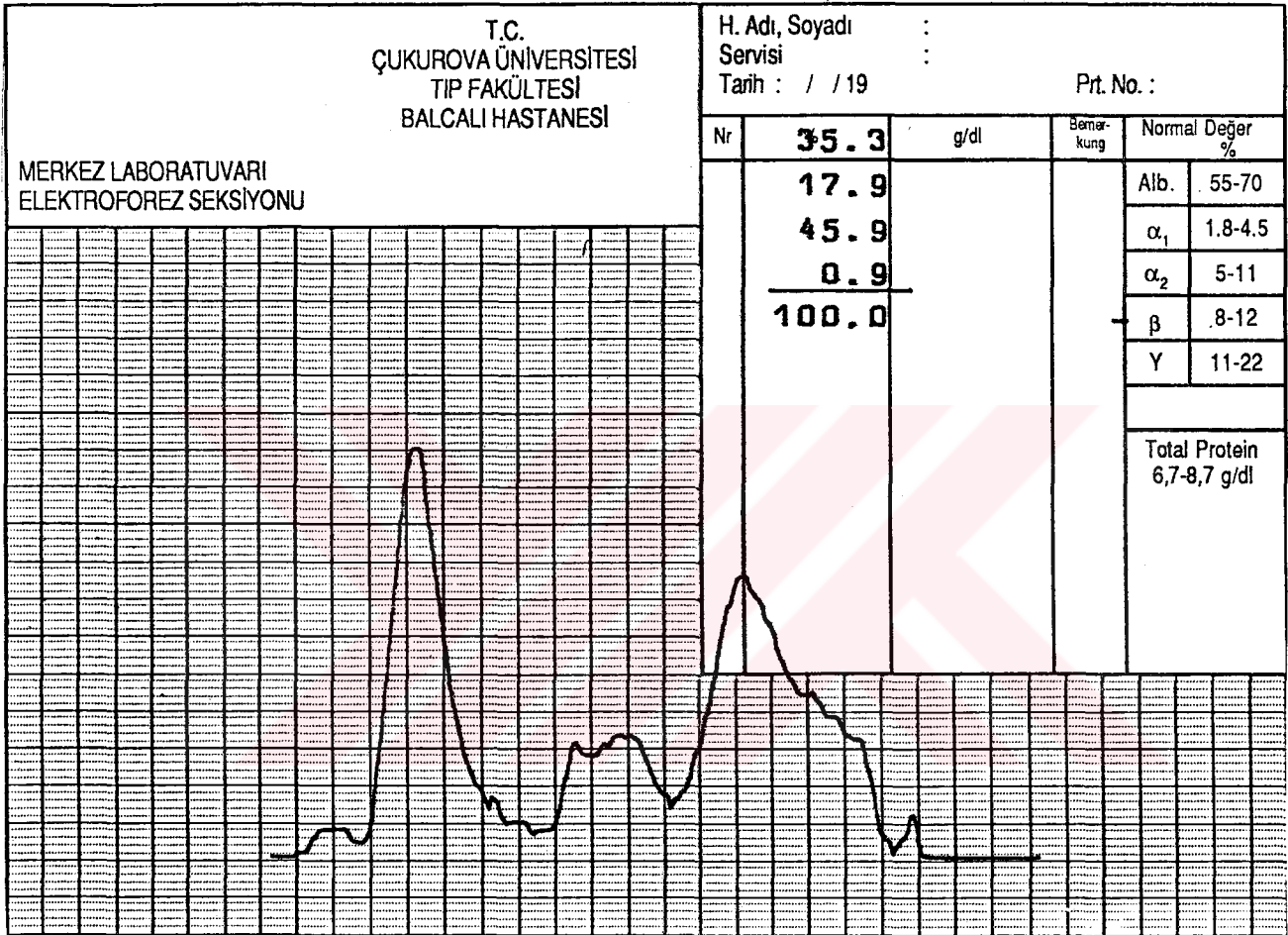
Şekil 18. *Streptococcus* antijeni ile aşılanmış fare serumunun kağıt elektroforez sonuçları.

Streptococcus antijeni ile aşılanmış farelere ait serum örneğinde; albumin % 43.6, α_1 % 6.6, α_2 % 7.0 ve β % 42.8,



Şekil 19. *Klebsiella* sp-2 antijeni ile aşılanmış fare serumunun kağıt elektroforez sonuçları.

Klebsiella sp-2 antijeni ile aşılanmış farelere ait serum örneğinde; albumin % 44.4, α_1 % 15.5, α_2 % 37.8 ve β % 2.3,



Şekil 20. *P.aeruginosa* antijeni ile aşılannmış fare serumunun kağıt elektroforez sonuçları.

P.aeruginosa antijeni ile aşılannmış farelere ait serum örneğinde; albumin % 35.3, α_1 % 17.9, α_2 % 45.9 ve β % 0.9, bulunmuştur.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Antijen özelliği gösteren çeşitli yapıların hayvansal organizmalarda antikor oluşumuna neden olduğu uzun yıllardan beri bilinen bir gerçektir. Antikor oluşumuna bağlı olarak canlıda ortaya çıkan savunma mekanizması ise bağışıklık olarak adlandırılır. Bağışıklık oluşumunun ortaya çıkartılması için antijen karakterindeki değişik maddelerin farklı hayvan gruplarına enjekte edilmelerine bağlı olarak dolaşım sisteminde bulunan antikorların çeşitli yöntemlerle saptanabileceği belirtilmiştir (Kwapinski ve ark. 1972). Bu alanda kullanılan yöntemler arasında elektroforez teknikleri önemli bir yer tutmaktadır. Bu sistemlerle, oluşan antikorların kantitatif ve kalitatif değerlendirilmesini yapmak mümkündür (Åxelsen ve ark. 1973; Gaal ve ark. 1980; Eisen 1990).

Mus musculus var. *albinus* (Bachmann ve ark. 1994) farelerinin çeşitli bakteri antijenleri ile aşılması sonucu immün cevabın gelişmesi sırasında oluşan antikor düzeyi ve tipini saptamak amacıyla çeşitli elektroforez teknikleri kullanılmıştır. Kan serum proteinleri kağıt elektroforez, gradient SDS-PAGE ve agaroz jel teknikleri ile, kan dokusuna ilaveten karaciğer, dalak, böbrek ve kalbe ait protein ekstraktları SDS-PAGE yöntemleri ile analiz edilmiştir. Akrilamid jel teknikleri, kağıt elektroforez (günümüzde kliniklerde yaygın olarak kullanılan) tekniklerine göre yüksek bir ayırma gücüne sahip olması nedeniyle çalışmamızda özellikle tercih edilmiştir.

Karaciğer ve kalp ekstraktlarına ait örneklerin (şekil 8) %7.5'lik homojen SDS-PAGE jelinde analiz edilmesi sonucu; 89000 daltonluk bir fragmentin kontrol karaciğerde, *P.aeruginosa* ve *Klebsiella* sp-1'de kantitatif olarak artış gösterdiği (sütun 1, 2, 3), *S.albus*'ta ise belirgin olarak azaldığı saptanmıştır (sütun 4). *S.albus*'ta görülen 86000 dalton moleküler ağırlıktaki fragment kontrol ve diğer örneklerde farkedilememektedir. Ayrıca 14000 daltonluk bir fragment kontrole göre *P.aeruginosa* ve *S.albus*'ta kantitatif bir artış göstermiştir (sütun 2, 4). 126000 dalton ağırlığındaki bir fragment *Klebsiella* sp-1 ile aşılanan örneklerde azalırken (sütun 3), *S.albus* ve *P.aeruginosa*'da artmıştır. 759000 daltonluk fragment ise, sadece kontrol ve *P.aeruginosa* örneğinde görülmektedir. Diğer örneklerde ise bu protein fragmenti saptanamamıştır. Bu sonuçlara göre *Klebsiella* ve *S.albus* antijenlerine karşı oluşan immün cevabın diğer antijenlere göre daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir.

Kalp örnekleri incelendiği zaman 89294 dalton moleküler ağırlıktaki protein fragmenti bütün örneklerde saptanmasına karşın, kontrole göre kantitatif olarak düşük düzeyde görülmektedir. 87000 (sütun 6) daltonluk fragment sadece kontrolde bulunmakta fakat bakteri antijenleri uygulanmış örneklerde görülmemektedir.

Kalp ve karaciğer örnekleri karşılaştırıldığında, immün cevap oluşumunda karaciğerin kalbe göre daha öncelikli olduğu görülmektedir. Bu konuda en önemli faktörlerin karaciğerde birçok biyokimyasal olayın gerçekleştirilmesi, çok farklı homeostatik fonksiyonlara sahip bir organ olması (Anderson ve ark., 1991) ve lenfositlerin antijenleri tanıyabilmesi için ön işleme tabi tutulan sistemlerden biri olmasından kaynaklandığı düşünülebilir (Muftuoğlu, 1993).

%10'luk homojen SDS-PAGE jelinde (şekil 9) karaciğer ve kalp örnekleri analiz edildiğinde; karaciğer örneklerinde 545000 (sütun 1) daltonluk fragment sadece kontrolde mevcut olup, *P.aeruginosa*, *Klebsiella* sp-1 ve *S.albus*'ta bulunmamaktadır. 70714 (sütun 5) daltonluk fragment *S.albus*'ta ortaya çıkarken diğer örneklerde ve kontrolde saptanamamıştır. 2580000 daltonluk fragment kontrolde yoğun, diğerlerinde ise kantitatif olarak daha düşüktür. 66000 (sütun 8) dalton moleküler ağırlığındaki protein fragmenti *Klebsiella* sp-1 örneği hariç bütün örneklerde saptanmıştır. 45000 daltonluk fragment ise kontrole göre deney gruplarının hepsinde bariz bir artış göstermiştir.

Kalp örnekleri incelendiğinde; 3451000 (sütun 7) daltonluk fragment *P.aeruginosa*'da kontrol ve diğerlerine göre son derece düşük düzeyde görülmektedir. 3372080 daltonluk fragment ise kontrolde bulunmazken, diğer örneklerin hepsinde mevcuttur. 2588000 (sütun 6) daltonluk fragment kontrol, *Klebsiella* sp-2 (sütun 9) ve *S.albus*'ta (sütun 10), *P.aeruginosa* (sütun 7) ve *Klebsiella* sp-1'e (sütun 8) göre oldukça düşük bir yoğunluğa sahiptir. 1084000 daltonluk fragmentin *Klebsiella* sp-1, *Klebsiella* sp-2 ve *S.albus*'ta kontrol ve *P.aeruginosa*'ya göre kantitatif olarak daha yoğun olduğu görülmektedir. 406500 daltonluk fragment sadece *Klebsiella* sp-1, *Klebsiella* sp-2 örneklerinde saptanırken kontrol ve diğer iki örnekte görülmemektedir.

Her iki organ dikkate alındığında *Klebsiella* ve *S.albus*'un immünitenin oluşmasında daha etkin bir rol oynadıkları söylenebilir. Aynı organlara ait protein örneklerinin separasyonunda % 10'luk jelin, % 7.5'luk jelden daha başarılı olduğu bulunmuştur. %7.5'luk jelde karaciğer ve kalpte toplam 7 farklı protein fragmenti saptanırken, %10'luk jelde 10 farklı fragment ortaya çıkmıştır.

% 3.5-10'luk gradient SDS-PAGE jel yöntemi kullanılarak (şekil 10) *Klebsiella* sp., *P.aeruginosa*, *S.albus* antijenleri ile aşılanmış farelere ait böbrek örnekleri analiz edildiğinde; kontrolde bulunmayan ve 2071000 (sütun 4) dalton ağırlığındaki bir fragment sadece *Klebsiella* sp-1'de görülmektedir. 1852000 (sütun 7) daltonluk bir fragment *S.albus*'ta artarken, *Klebsiella* sp-2'de (sütun 5) azalmıştır. 132000 dalton moleküler ağırlıktaki protein fragmenti bütün örneklerde görülmekle birlikte *P.aeruginosa* (sütun 6) ve *S.albus*'ta (sütun 7) oldukça yoğunlaşmıştır. 1029000 daltonluk fragment kontrol, *Klebsiella* sp-1 ve *Klebsiella* sp-2'de oldukça yoğun, fakat *P.aeruginosa* ve *S.albus*'ta son derece düşük düzeyde bulunmaktadır. 28000 dalton moleküler ağırlıktaki protein fragmenti sadece *Klebsiella* sp-2 ve *P.aeruginosa*'da azalmıştır. 14200 daltonluk fragment *P.aeruginosa*'da fark edilemezken, diğer bütün örneklerde mevcuttur. 141103 dalton moleküler ağırlıktaki protein fragmenti sadece *P.aeruginosa* örneğinde görülmektedir.

Elde edilen bulgulara göre, böbrekte immün cevap oluşumunda kullanılan bakteri antijenlerinin hepsinin etkili olduğu açıkça görülmektedir.

% 3.5-10'luk gradient SDS-PAGE jelinde (şekil 11) adjuvantla birlikte aşı uygulanmasından sonra farelerden alınan kan serum örnekleri analiz edildiğinde; 841000 daltonluk protein fragmenti kontrolde (sütun 1) ve *P.aeruginosa*'da (sütun 3) kantitatif olarak düşük düzeyde, *Klebsiella* sp-2 (sütun 6) ve *S.aureus*'ta (sütun 4) yüksek düzeyde bulunmuştur. 132000 daltonluk protein fragmenti en yoğun *S.aureus*'ta görülmektedir. 90000 daltonluk fragment ise kontrolde olmadığı halde, bakteri antijenleri uygulanmış örneklerin hepsinde saptanmıştır. Bu konuda çarpıcı başka bir bulgu ise, 59400 dalton moleküler ağırlıktaki protein fragmentinin *Klebsiella* sp-2 ve *S.aureus*'ta ortaya çıkmasıdır.

Bu bulgular, immünizasyondan sonra oluşan immünglobulinlerin kan serumunda uzun süre kaldığını göstermektedir. Ayrıca yeni ortaya çıkan protein fragmentlerine bakıldığında *S.aureus* ve *Klebsiella*'nın immün cevap oluşumunda diğerlerine göre daha etkili oldukları açıktır.

%6-12 lik gradient SDS-PAGE jelinde (şekil 12) *S.albus* antijeni ile aşılanmış farelere ait kalp, böbrek ve karaciğer ekstraktları separe edildiğinde; 49000 dalton ağırlıktaki protein fragmenti sadece antijen uygulanmış karaciğer örneğinde saptanmıştır (sütun 2). 725000 daltonluk protein fragmenti antijen uygulanmış böbrek örneğinde kantitatif olarak artmıştır (sütun 5). 2725000 dalton ağırlığındaki fragment sadece kontrol kalp örneğinde (sütun 6)

bulunmuştur. 725000 ve 635000 daltonluk fragmentler antijen uygulanmış kalp örneğinde (sütun 7) kantitatif olarak artmıştır. 290000 daltonluk fragment antijen uygulanmış kalp örneğinde (sütun 7) saptanmış fakat, kontrol kalp örneğinde (sütun 6) saptanamamıştır. 241000 daltonluk fragment antijen uygulanmış kalp örneğinde (sütun 7) artmış, 45000 daltonluk fragment azalmıştır. 114000 daltonluk fragment sadece antijen uygulanmış kalp örneğinde (sütun 7) bulunmuştur.

Elde edilen bulgulara göre immün cevap oluşumu en fazla kalp'te meydana gelmiştir. Bunun nedeni antikorların vücutta taşınması sırasında kalp'te uzun süre kalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *S.albus* antijeninin güçlü immünojenik yapıda olduğu açıkça görülmektedir.

%7-25'lik gradient SDS-PAGE jelinde (şekil 13) bakteri antijenlerinin adjuvantla birlikte uygulanmasından sonra farelere ait dalak ve kalp ekstraktlarının separasyon sonucu, 66000 daltonluk protein fragmenti kontrol dalak (sütun 2) örneğinde bulunmazken, *S.aureus* (sütun 3) ve *Klebsiella* sp-2'de (sütun 5) ortaya çıkmıştır. 58666 daltonluk fragment ise kontrol dalak örneğinde (sütun 2) bulunmadığı halde antijen uygulanmış örneklerin hepsinde bulunmuştur (sütun 3, 5, 6). Kalp örneğinde 132000 daltonluk fragment kontrolde bulunmazken (sütun 7) diğer örneklerin hepsinde (sütun 8, 9, 10) saptanmıştır. 55578, 50285 ve 48000 daltonluk fragmentler kontrol kalpte bulunmazken, diğer örneklerin hepsinde saptanmıştır. 33000 daltonluk fragment kontrol kalpte kantitatif olarak düşük, diğer örneklerde yüksek düzeyde bulunmuştur.

Kalp ve dalakta immün cevap oluşumu bariz olarak görülmektedir. Ayrıca *S.aures* ve *Klebsiella* diğer bakterilere göre daha fazla immünojenik etki göstermiştir.

%0.8'lik agaroz jel (şekil 14) kullanarak analiz edilen serum proteinlerinin separasyonu sonucunda ortaya çıkan bandların (sütun 1) deney gruplarında kontrole göre kantitatif olarak daha yoğun olduğu görülmektedir. Bununla birlikte sadece 4 band oluşması agaroz jellerin protein örneklerinin separasyonunda yetersiz olduğunun bir göstergesidir. Bu bulgu literatürlerle uygunluk içerisindedir (Gaal ve ark., 1980; Eisen 1990).

%7.5'lik Nativ-PAGE jelinde (şekil 15) denatüre edilmiş ve denatüre edilmemiş karaciğer örnekleri separe edilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi denatüre edilmemiş örneklerde protein fragmentlerinin ayrılmadığı ve bandlaşma gerçekleşmediği görülmektedir (sütun 8, 9, 10). Denatüre edilmiş örneklerde ise; 200000 daltonluk protein fragmenti kontrolde (sütun 1) kantitatif olarak

oldukça düşük düzeyde bulunmasına karşın, *P.aeruginosa*'da (sütun 2) yüksek düzeyde bulunmuştur. *Klebsiella* sp-1 (sütun 3), *Klebsiella* sp-2 (sütun 4), *S.albus* (sütun 5), ve *Streptococcus* (sütun 6) örneklerinde dikkate değer bir artış görülmektedir. Bu bulgu literatürde belirtilen *Streptococcus* enfeksiyonlarının immün sistemi stimüle ederek antikor oluşumunu arttırdığına ilişkin verilerle benzerlik içindedir (Bender ve ark., 1990). 100000 dalton moleküler ağırlıktaki protein fragmenti kontrolde (sütun 1) saptanamamıştır. Fakat *P.aeruginosa* (sütun 2)'da oldukça yüksek, *Klebsiella* sp-1 (sütun 2) ve *S.albus*'ta (sütun 5) daha düşük düzeyde bulunmuştur. 66000 daltonluk fragment kontrolde düşük düzeyde bulunmasına karşılık *P.aeruginosa* başta olmak üzere bütün örneklerde artmıştır. Elde edilen bulgular dikkate alındığında separasyonun sadece denatüre edilen örneklerde görülmesi nativ-jellerin kullanım alanını sınırlamakta ve denatürasyonun gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürlerde de belirtildiği gibi protein örneklerinin denatürasyonu için SDS, Üre, NP-40 ve β -Mercaptoethanol gibi çeşitli parçalayıcı ajanlar kullanılmaktadır. Özellikle büyük moleküler ağırlığa sahip proteinleri denatüre etmeden elektroforetik olarak birbirinden ayırabilmek oldukça zordur. Bu konuda yapılan çalışmalarda kas proteinlerinden 15 KDa ile 3 MDa arasındaki moleküler ağırlığa sahip yapıların denatüre edilerek separe edilebildikleri gösterilmiştir. (Granzier ve Wang, 1993).

Karaciğere ait büyük proteinlerin pollakrilamid jellerde separasyonu ancak Üre ve NP-40 ile denatürasyondan sonra gerçekleştirilebilmiştir (Anderson ve ark., 1991). Denatüre edilmiş ve edilmemiş karaciğer örneklerinin separasyonları karşılaştırıldığı zaman sonuçların literatür bulguları ile uygunluk içinde olduğu görülmektedir.

Sonuçlara göre en fazla immün cevap oluşumu *P.aeruginosa*'ya karşı gelişmiş ve bunu *S.albus* takip etmiştir. Ayrıca denatüre edilmemiş ve edilmiş örnekler karşılaştırıldığı zaman, denatüre olmuş protein örneklerinin intakt olanlara göre strüktürel değişikliğe uğramış ve daha küçük birimlere ayrılmış olmaları sebebiyle iyi bir separasyon gözlenmiştir. Çünkü intakt proteinlerin birbirlerinden ayrıldığı jel çatkısı bunların separe edilmesi için elverişli olmayacak düzeyde büyük meşlidir.

İmmünize edilmiş farelere ait kan serum örnekleri kağıt elektroforez yöntemiyle separe edildikten sonra oluşan bandlar densitometre'de kantitatif olarak değerlendirilmiştir (şekil 16, 17, 18, 19, 20). Kan serumu farklı proteinlerin karışımından meydana gelmiş kompleks bir yapıdır ve "Moving

Boundry" elektroforez tekniği ile separe edilen kan örneklerinde 5-6 fragment saptanabilmektedir (Gaal ve ark., 1980).

Kontrolde (şekil 16) ve *S.aureus* (şekil 17) örneğinde 3 protein fragmenti saptanmıştır. Bunlar albumin, α_1 ve α_2 fraksiyonlarına ait protein profilleridir.

Bunlara karşılık, *Streptococcus*, *Klebsiella* sp-2 ve *P.aeruginosa* örneklerinde 4 fragment saptanmış olup dördüncü fragment β fraksiyonudur.

Elde edilen sonuçlarda kontrolde % 60.5 oranında bulunan albumin değeri diğer bütün örneklerde azalma göstermiştir. Sırasıyla albumin fraksiyonları *S.aureus*'ta % 58.3, *Klebsiella* sp-2'de % 44.4, *Streptococcus*'ta % 43.6 ve *P.aeruginosa*'da % 35.3 düzeyinde bulunmuştur.

Serum albumin düzeyindeki azalma onkotik basıncın değışimi ile bağlantılı olarak değışmektedir (örn: hipokalsemi). Çalışmamızdan elde edilen veriler incelendiğinde deney gruplarında görülen serum albumin miktarındaki azalmanın çeşitli bakteri antijenlerinin etkisinde kalan hayvanlarda onkotik basınç değışimine neden olan (hipokalsemi örneğinde olduğu gibi) patolojik duruma bağılı olarak oluştuğu ileri sürülebilir. Bu değerlerdeki azalma en çarpıcı olarak *P.aeruginosa* antijeni ile aşıl原因 hayvanlarda görülmektedir. Ayrıca hypoalbuminemi, düzeyi en fazla serum protein anormalliklerinde değışkenlik göstermektedir. Bunlar;

1-Böbreklerden albumin kaybının önlenememesi (örn: Nefrotik sendrom), mide-barsak sistemi (gastro enteropati nedeniyle protein kaybı), deri (örn: egzematik lezyonlar ve yanık sonucu oluşan yaralar) veya seroz boşluklardaki kayıplar (örn: ascites sızıntısı).

2-Karaciğerde albumin sentezinin azalması (örn: çeşitli karaciğer hastalıkları veya konjenital eksiklikler nedeniyle),

3-Albumin katabolizmasının hızlanması,

4-Sayılan bu etkilerin hepsinin bir arada görülmesi sonucu olabilmektedir (Race, 1973).

Aşıl原因 hayvanlarda görülen albumin azalmasının, sayılan bu sebeplere bağılı olarak ortaya çıkan bir sonuç olabileceğı ileri sürülebilir. İnsanlarda stres, hormon dengelerinin değışmesi, beslenme ve karaciğer hastalıkları gibi önemli hastalıklar serum albumin seviyesini etkilemektedir (Miller ve Gemenier, 1993). Farelerle insanlardaki IgG'nin katabolizmasının regülasyonu arasında bir benzerlik olduğu da belirtilmiştir (Wawrzynczak ve ark., 1992).

α_1 fraksiyonuna ait protein profilleri incelendiğı zaman değışik iki durum görülmektedir. Kontrol grubu hayvanlarda bu değeri % 10.1 bulunmuşken,

Staphylococcus antijeni uygulanan hayvanda % 6.6 gibi düşük bir değer görülmektedir.

α_1 fraksiyonu kistlerde ve konjenital α_1 -antitripsine eksikliğinde önemli derece de artmaktadır. Ayrıca α_1 -globulin fraksiyonunun azalması ile nadir de olsa hipo- α -lipoproteinemi gelişebilmektedir. Literatürde de belirtildiği gibi bu fraksiyondaki azalma *Staphylococcus* antijenlerinin hipo- α lipoproteinemiye neden olduğunun bir göstergesidir (Race, 1973).

Buna karşılık α_1 -fraksiyonu *S.aureus*'ta % 13.6, *Klebsiella* sp-2'de % 15.5, *P.aeruginosa*'da % 17.9 olarak saptanmış ve kontrole göre artmıştır.

α_1 -fraksiyonundaki artış önemli bir bulgu gibi görülmemektedir (Race, 1973).

α_2 fraksiyonununa ait protein profilleri incelendiğinde de değişik sonuçların varlığı gözlenmektedir. Kontrolde % 29.4 olan bu değer, *S.aureus*'ta % 28.1, *Streptococcus*'ta % 7.0 olarak bulunmuş ve azalma göstermiştir. Fakat *Klebsiella* sp-2'de %37.8, *P.aeruginosa*'da % 45.9 bulunan değerler kontrole göre artış göstermiştir.

α_2 -globulin fraksiyonu, açlık, yaralanma v.b. durumlarda artabilmektedir. α_2 -globulin düzeyi nefrotik sendromlu hastalarda artış gösterir. α_2 -globulin seviyesindeki önemli artış, albumindeki azalma ve bazı hipogammaglobulinemi düzeyleri nefrotik sendromlu hastalarda karakterizedir (Race, 1973). Bulgularımızda *Klebsiella* sp-2'de ve *P.aeruginosa*'da albuminin azalması ve α_2 düzeyinin önemli derecede artmasının literatürde belirtilen nedenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

β -fraksiyonuna ait değerler incelendiğinde, kontrolde ve *S.aureus*'ta bu fraksiyona rastlanmamıştır. Fakat *Streptococcus*'ta % 42.8, *Klebsiella* sp-2'de % 2.3, *P.aeruginosa*'da % 0.9 olarak bulunmuştur.

β -globulin fraksiyonu karaciğer, safra kanalı ve lipid metabolizması düzensizliklerinde, şiddetli demir eksikliği ve diğer birtakım hastalıklarda artabilir. Serum  rneklerinin kağıt ekeltroforezi ile analizi sonucunda gammaglobulin fraksiyonu saptanamamıştır.

Serum albuminleri homojen ve gradient SDS-PAGE yöntemleri ile analiz edildiğinde farklı canlılarda farklı moleküler ağırlıklarda bulunmuştur (Miller ve Gemenier, 1993).

Elektroforezden sonra serum albumin bandlarındaki genişleme, molekülün yüksek düzeydeki heterojenitesi ve yağ asidi taşıyan moleküllerin farklılığı ile açıklanmaktadır (Miller ve Gemenier, 1993). Albumin bandlarındaki genişleme

bulgularımızda açıkça görülmektedir (şekil 11 ve 15). Albumin canlı türlerine göre farklılıklar göstermekle birlikte yaklaşık 67000 dalton ağırlığında olan önemli bir plazma proteindir ve serum konsantrasyonu ~ 50 g/L civarındadır (Lapin ve Feigl, 1991).

Sonuçlar dikkate alındığında kontrole göre deney gruplarında kantitatif olarak artış gösteren fragmentler ve kontrol gruplarında bulunmadığı halde deney gruplarında yeni ortaya çıkan ve çeşitli moleküler ağırlığa sahip protein fragmentleri aşılınmış hayvanlardaki bağışıklık oluşumunun göstergesidir. Bazı protein fragmentlerinin kontrol gruplarında yoğunluğu fazla olduğu halde deney gruplarında daha düşük konsantrasyonda görülmesi bu proteinlerin yeni sentezlenen antikorlarda yapı taşı olarak kullanıldığı düşünülmektedir. Ayrıca denatürasyon sırasında protein moleküllerinin daha küçük fragmentlere ayrılmış olması da bu sonuçların ortaya çıkmasında etken olmuştur.

İmmün cevabın gelişmesi esnasında ortaya çıkan spesifik antikorların prodüksiyonunu saptamak için kullanılan çeşitli ayırma ortamlarını karşılaştırdığımızda;

1-Homojen SDS-PAGE, nativ-PAGE jellere göre çeşitli organ ve serum proteinlerinin separasyonunda oldukça başarılıdır. Şekil 15'te görüldüğü gibi nativ-Page elektroforez tekniği ile kaba bir separasyon gerçekleştirilmiş ve sadece 6 protein fragmenti saptanmıştır. Fakat homojen SDS-PAGE jelleri ile yapılan separasyonlarda 17-20 arasında değişen fragment elde edilmiştir. Yine nativ-page jelinde denatüre edilmemiş karaciğer örneklerinde hiç fragment elde edilememesi bu jelin çok özel araştırmalar (özellikle enzim çalışmaları) dışında fazla kullanışlı olmadığını göstermektedir (Walker ve ark., 1988).

2-Homojen SDS-PAGE jellerle gradient SDS-PAGE jeller karşılaştırıldığında gradient jellerin daha başarılı olduğu görülmektedir. Gradient jellerle yapılan analizlerle genellikle 20-27 farklı protein fragmentinin ortaya çıktığı görülmüştür. Ayrıca gradient jel tekniği kullanıldığında, moleküler ağırlıkları birbirine çok yakın olan protein fragmentlerinin separasyonları mümkün olmuştur. Proteinlerin separasyonu için polyacrylamide gradient jel elektroforez tekniği ilk kez Slater (1968) tarafından kullanılmış ve bu teknikle rat serum proteinlerinin analizi sonucu 28 fragment elde edilmiştir. Aynı örnekler homojen jellerle separe edildiklerinde sadece 21 fragment saptanabilmiştir. Ayrıca gradient jellerle yapılan separasyonlar sonucu oluşan bandlar daha keskin ve daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır (Gaal ve ark, 1980). Bulgularımız

ve literatür verileri karşılaştırıldığında sonuçlar arasında büyük bir benzerlik görülmektedir.

3-Agaroz jellerle uygulanan separasyonlarda ise son derece kaba bir ayırışma gözlenmiş ve sadece 4 protein fragmenti elde edilebilmiştir. Bunun nedeni agaroz'un oldukça büyük meşli olmasıdır. Bu nedenle moleküler ağırlığı küçük ve birbirine yakın olan bir çok farklı protein fragmenti tek bir bandda toplanmaktadır. Agaroz jellerle yapılan analiz sonucunda sadece 4 protein fragmentinin elde edilmesi literatür bulguları ile uygunluk göstermektedir (Eisen, 1990).

4-Kağıt elektroforezi ile yapılan separasyonlarda ise 3-4 fragment saptanabilmiş ve bunlar albumin, α_1 , α_2 ve β fraksiyonlarına ait proteinler şeklinde adlandırılmışlardır. Bu yöntemle elde edilen fragmentler kantitatif olarak densitometrede değerlendirilmiştir. Bununla birlikte diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, az sayıda band oluşması nedeniyle akrilamid jel tekniklerine göre daha başarısız olmakla birlikte ucuz olması ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle rutin çalışmalarda daha fazla tercih edilmektedir.

Bu sonuçlara göre farklı moleküler ağırlığa sahip protein fragmentlerinin separasyonu için en uygun yöntemin gradient SDS-PAGE tekniği, immün cevap oluşumunda öncelikli sistemlerin karaciğer ve kalb immünizasyonda ise sırasıyla *S. aureus*, *S. albus* ve *Klebsiella* sp. antijenlerinin daha etkili oldukları görülmüştür. Buna paralel olarak başarılı bir separasyon için örneklerin mutlaka çeşitli denatüre edici ajanlarla muamele edildikten sonra analiz edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın çeşitli bilimsel araştırma merkezlerinde, özellikle spesifik hastalıkların teşhisinde (bakteriyel, viral, paraziter ve çeşitli kanser tipleri) önem taşıyan ve düşük konsantrasyonlardaki biyomoleküllerin saptanmasında, canlıların filogenetik bakımdan yakınlık veya uzaklıklarının ortaya çıkarılmasında, çeşitli adli tıp olaylarının çözümünde ve rekombinant proteinlerin izolasyonu ve tiplendirilmesi için çok çeşitli alanlarda yararlı olacağı kanısındayız.

6. ÖZET

Bu çalışmada çeşitli bakteri antijenleri ile aşılanmış *Mus musculus* var. *albinus* farelerinde immün cevap oluşumunun saptanmasında çeşitli elektroforez tekniklerinin başarı düzeyi araştırılmıştır. Aşılama için *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *S. albus*, *S. aureus* ve *Streptococcus* bakterileri kullanılmıştır. Değişik periyotlarda ve konsantrasyonlarda subkutan antijen uygulamasından sonra dalak, kalp, böbrek, karaciğer ve serum örnekleri çeşitli elektroforez teknikleri kullanılarak analiz edilmişlerdir.

Ayırma ortamı olarak homojen SDS-PAGE, Gradient SDS-PAGE, Nativ-PAGE, Agarose ve sellüloz asetat teknikleri kullanılmıştır. Homojen jeller % 7.5-10 konsantrasyonlarda kullanılırken, gradient jeller % 3.5-25 arasında değişen konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Agarose jeller % 0.8, nativ jel ise % 7.5 konsantrasyonda tatbik edilmiştir.

Analizler sonucunda kalp ve karaciğer (toplam 10 farklı protein fragmenti ortaya çıkmıştır) dokularının immün cevabın gelişmesinde diğer sistemlere göre daha iyi sonuç verdikleri bulunmuştur. Kullanılan bakteri antijenlerinin immünojenik etkisi en fazla *S. albus* antijeninde görülmüş ve bunu sırasıyla *Klebsiella* sp., ve *S. aureus* antijenleri izlemiştir.

Elektroforez teknikleri arasında en başarılı separasyon gradient jellerle gerçekleştirilmiştir (toplam 29 protein fragmenti). En başarısız separasyon agarose ve sellüloz asetat tekniklerinde görülmüş ve toplam 4 protein fragmenti saptanabilmiştir. Denatüre edilen örneklerde iyi bir separasyon sağlanmasına karşın, denatüre edilmemiş örneklerde birbirinden ayrılmış protein fragmenti saptanamamıştır. Sellüloz asetat yöntemi ile separe edilen protein fragmentleri densitometrik olarak değerlendirilmiş ve antijen uygulanmış bütün örneklerde, albumin düzeyinde azalma olduğu görülmüştür.

7. SUMMARY

In this study, the success level of different electrophoretic techniques were investigated that occurring of immune response in *Mus musculus* var. *albinus* mice which were vaccinated with various bacteria antigens.

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus albus*, *S. aureus*, and *Streptococcus* sp. were used for vaccination. Spleen, hearth, kidney, liver, and sera samples were analysed after application antigens to mice at the different time and concentration using various electrophoretic techniques.

Following separations techniques were used, homogen SDS-PAGE, gradient SDS-PAGE, native-PAGE, agarose gel, and cellulose acetate. Homogen SDS-PAGE 7.5%, gradient SDS-PAGE 3.5-25%, native-PAGE 7.5%, and agarose gel 0.8% concentration were prepared.

Hearth and liver tissues were given more good results than others. The most immunogenic effect was observed with *S. albus*, *Klebsiella* sp., and *S. aureus* antigens respectively.

Among electrophoretic techniques the best separation was performed with gradient gels techniques (total 29 protein fragments), the worst separation was cellulose acetate and agarose techniques (only 4 protein fragments).

The most successful separation was observed with denaturated samples in contrast to, any protein fragment wasn't determined with nondenaturated samples.

The protein fragments which separated by cellulose acetate, were evaluated as densitometric and albumin level of mice sera which obtained after the vaccination, decreased in all samples when compared with control.

8. KAYNAKLAR

- ALEDO, J. C., BIEDMA, S. G., SEGURA, J. A., MOLINA, M., CASTRO, I. N. and MARQUEZ, J., 1993. Native-polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins: Glutaminase detection after *in situ* specific activity staining. *Electrophoresis*. 14: 88-93.
- ANDERSON, N. L., BLASKO, R. E., HOFMANN, J. P., and ANDERSON, N. G., 1991. A two-dimensional gel database of
- ANONYMOUS, 1978. *Mikrobiyologisches Handbuch*, E. Merck, Darmstadt.
- ATASSI, M. Z., 1979. *Immunochemistry of Proteins*. Plenum Press NEW YORK and LONDON Vol.3.
- AXELSEN, N. H., KROLL, J., and WEEKE, B., 1973. Quantitative Immun Electrophoresis. UNIVERSITETSFORLAGET. OSLO-BERGEN-TROMSO.
- BACHMANN, M. F., KUNDIG, T. M., FREER, G., LI, Y., KANG, C. Y., BISHOP, D. H., HENGARDNER, H. and ZINKERNAGEL, R. M., 1994. Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. *Eur. J. Immunol.* 24: 2228-2236.
- BENDER, A. and KABELITZ, D., 1990. Phenotypic analysis of T cells activated by various bacteria. *J. Exp. Med.* 171: 667.
- BIRKE, G., LILJEDAHN, S. O., and ROTSCHILD, M., 1979. *Plasma proteins*. John Wiley, Chichester. pp: 54-71.
- BILGEHAN, H., 1981. Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayın No:84.
- BLANCO, F. V., and POWNALL, H. J., 1991. Disulfide linked dimers of apolipoprotein D in urine. *Electrophoresis*. 14: 1086-1087.
- BOCK, E., MELLERUP, E. T., and RAFAELSEN, O. J., 1971. Antigen-antibody crossed electrophoresis of water soluble rat brain antigens. *J. Neurochem.*, 18: 2435.
- BOMFORD, R., 1980. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell mediated immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 39:426-435.
- CASH, P., 1991. The application of the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to medical microbiology: Molecular epidemiology of viruses and bacteria. *Electrophoresis*. 12: 592-604.
- COOPER, E. L., 1982. *General Immunology*. Pergamon Press. OXFORD.

- CORRADIN, G., ETLINGER, A. M., and CHILLER, J. M., 1977. Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of the antigen-induced in vitro T cell dependent proliferative response with lymph node cells from primed mice. *J. Immunol.*, 119: 1048-1053.
- CRAIG, W. Y., POULIN, S. E., LEDUE, T. B. and KAMBOH, M. I., 1993. Apolipoprotein (a): A comparison of isoforms identified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis or by sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 14: 1038-1041.
- ÇETİN, E.T., 1968. *Pratik Mikrobiyoloji, İstanbul Üniversitesi, 2. Baskı, Menteş Matb. ISTANBUL.*
- ÇOLAK, Ö., ve ARIKAN, B., 1990. Laktoz Pozitif Enterobacteriaceae Üyelerinin Teşhisi İçin Geliştirilmiş Yeni Bir Selektif Agar Besi Yeri, *KÜKEM Dergisi*, 13: No 12, 15-21.
- EISEN, H. N., 1990. *General Immunology. J. B. LIPPINCOTT COMPANY. Philadelphia.*
- EHARA, A., and NISHI, S., 1991. Structural basis of electrophoretic variants of rat α -fetoprotein. *Electrophoresis*. 12: 315-316.
- ENGERS, H. D., and FITCH, F. W., 1977. An estimated of the minimal frequency of cytolytic T lymphocyte effector cells generated in allogenic reactions. *J. Immunol. Methods.*, 25: 13-20.
- FISHER, M. P., and DINGMAN, C. W., 1971. Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agarose-acrylamide composite gels. *Biochem.* 10: 895.
- FREDERICK, W. A., BLACKWELL, T. K., and YANCOPOULUS, G. D., 1985. Immunoglobulin genes in transgenic mice. *Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.* 231-236.
- FREEMAN, B. A., 1979. *Textbook of microbiology. Twenty-first edition. W. B. Saunders Company. Philadelphia. U.S.A.*
- GAAL, Ö., MEDGYESI, G. A., and VERECZKEY, L., 1980. *Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. A Wiley-Interscience Publication. NEW YORK-BARISBANE-TORONTO.*
- GERIBALDI, M. S., HOURI, A., and SUDAKA, P., 1993. Lane distortions in gel electrophoresis patterns. *Electrophoresis*. 14: 773-781.
- GLASEBROOK, A. L., and FITCH, F. W., 1980. Alloreactive cloned T cell lines. I. Interactions between cloned amolifier and cytolytic T cell line. *J. Ex. Med.*, 151: 876-895.

- GRANZIER, H. L. M. and WANG, K., 1993. Gel electrophoresis of giant proteins: Solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis*, 14: 56-64.
- GROSCHUP, M.H., BOSCHWITZ, J., TIMONEY, J. F., 1991. A convenient gel holder for preparative electrophoretic separation of aggregated bacterial proteins. *Electrophoresis*, 12: 90-93.
- HEATLEY, R. V., STARK, J. M., HORSEWOOD, P., BANDOUVAS, E., COLE, F., and BIENENSTOCK, J., 1981. The effects of surgical removal of peyer's patches in the rat on systemic antibody responses to intestinal antigen. *Immunology*. 44: 543.
- HELLMAN, L., 1994. Profound reduction in allergen sensitivity following treatment with a novel allergy vaccine. *Eur. J. Immunol.* 24:415-420.
- HIMBER, J., 1993. Horizontal semi-dry electroblotting for the detection of the low density lipoprotein receptor in solubilized liver membranes. *Electrophoresis*. 14: 794-797.
- HUDSON, L., and HAY, F. C., 1980. *Practical Immunology*. Second Edition. Blackwell Scientific Publications. OXFORD-LONDON-ENGLAND.
- HUSBAND, A. J., and GOWANS, J. L., 1978. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J. Exp. Med.*, 148: 1146.
- JEYASEELAN, K., CHUNG, M. C. M., and KON, O. L., 1987. *Genes and Proteins*. First Edition. U. S. A.
- JOHNSON, P. H., and GROSSMAN, L. I., 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and single-stranded DNAs. *Biochem.* 16: 4217.
- JUNGBLUT, P., BAUMEISTER, H. and KLOSE, J., 1993. Classification of mouse liver proteins by immobilized metal affinity chromatography and two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 14: 638-643.
- KABELITZ, D., BENDER, A., SCHONDELMAIER, S., SCHOELE, B., and KAUFMANN, S. H. E., 1990. A large fraction of human peripheral blood TCR $\gamma\delta$ -positive T cells is activated by *M. tuberculosis* but not by its 65 kD heat shock protein. *J. Exp. Med.*, 171: 667.
- KNIPPERS, R., 1985. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart. NEW YORK.

- KUHRÖBER, A., SCHIRMBECK, R. and REIMANN, J., 1994. Vaccination with T cell receptor peptides primes anti-receptor cytotoxic T lymphocytes (CTL) and anergizes T cells specifically recognized by these CTL. *Eur. J. Immunol.* 24: 1172-1180.
- KÜNTZER, H. M., REICHERT, A., SCHNEIDER, K. H., and GIFFHORN, F., 1994. Isolation and characterization of a L-glucitol dehydrogenase from the newly isolated bacterium *Pseudomonas* sp. *Ac.J. Biotechnol.*, 36: 157-164.
- KWAPINSKI, J. B. G., 1972. Research in immunochemistry and immunobiology. University Park Press. Baltimore U.S.A.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- LAPIN, A., and FEIGL, W., 1991. A practicable two-dimensional electrophoresis of urinary proteins as a useful tool in medical diagnosis. *Electrophoresis.* 12: 472-478.
- LAURELL, C. B., 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.* 10: 358.
- MADDY, A. H., 1976. Biochemical Analysis of Membranes. LONDON.
- MALETTTO, B., GRUPPI, A and PALENCIA, M. C. P., 1994. Aging: The cellular immune response against autologous and foreign antigens is affected before the humoral response. *Immunol. Letters.* 40: 243-250.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., and SAMBROOK, J., 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. NEW YORK.
- MARSHALL, T., WILLIAMS, K. M., EKSTRÖM, J., TOBIN, G., BAYARD, C. and WESTERBERG, O., 1993. Electrophoretic analysis of stimulated cat parotid saliva. *Electrophoresis.* 14: 1328-1332.
- MARUYAMA, A., NISHI, T., and OZAKI, A., 1986. Construction of a plasmid for high level expression of XMP aminase in *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.*, 50(7): 1879-1884.
- MATTHEW, M., HARRIS, A. M., MARSHALL, M. J., and ROSSE, G. W., 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J. Gen. Microbiol.*, 88: 169-178.
- McDEWITT, H. O., and BENACERRAF, B., 1969. Genetic control of specific immune responses. *Adv. Immunol.* 11: 31-74.
- MILLER, I. and GEMEINER, M., 1993. Peculiarities in electrophoretic behavior of different serum albumins. *Electrophoresis.* 14: 1312-1317.

- MÜFTÜOĞLU, A., 1978. Temel Ümmünoloji. Güven Kitabevi Yayınları. ANKARA.
- MÜFTÜOĞLU, E., BOLAMAN, Z., BİLGİR, O., ve ERTOP, Ş., 1993. İmmünoloji. Saray Medikal Yayıncılık. Bornova-İZMİR.
- NAKAMURA, K., MIMURA, Y. and TAKEO, K., 1993. Immune response to a hapten of fluorescein isothiocyanate in a single mouse analyzed by two-dimensional affinity electrophoresis. *Electrophoresis*. 14: 81-87.
- NAKAMURA, K., MIMURA, Y., TANAKA, T., FUJIKURA, Y. and TAKEO, K., 1993. Affinity maturation of anti-hapten antibodies in a single mouse analyzed by two-dimensional affinity electrophoresis. *Electrophoresis*. 14: 1338-1340.
- NEUMANN, D. A., LANE, J. R., WALKER, A. L., ALLEN, G. S., WULFF, S. M., HERSKOWITZ, W. A., and ROSE, N. R., 1991. Heart specific autoantibodies can be eluted from the hearts of *Coxsackievirus* B3 infected mice. *Electrophoresis*. 86. 405-412.
- NOYAN, A., 1988. Fizyoloji. Beşinci Baskı. Meteksan.
- O'FARRELL, P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007.
- PERBAL, B., 1984. A practical guide to molecular cloning. A Wiley-Interscience Publication. U.S.A.
- PODULSO, J. F., 1980. Molecular weight estimating using SDS-pore gradient electrophoresis. *Anal Biochem.*, 101: 394-406.
- RACE, G. J., 1973. Laboratory Medicine. Volume.1. Harper and Row. Publishers. NEW YORK.
- RASMUSSEN, H. H., DAMME, J. V., PUYPE, M., GESSER, B., CELIS, J. E., and VANDEKERCKHOVE, J., 1991. Microsequencing of proteins recorded in human two-dimensional gel protein databases. *Electrophoresis*. 12: 873-882.
- RHYUM, S. B., JIN, B. R., PARK, H. R. and HONG, H. J., 1994. High level expression of hepatitis B virus preS1 peptide in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*. 36: 221-230.
- RIGHETTI, P. G., and DRYSD, J. W., 1976. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 5, Part. 2. AMSTERDAM.
- RIGHETTI, P. G., 1983. Isoelectric focusing: Theori, methods and applications. Elsevier Biomedical Press.

- SANDERS, C. C., SANDERS, W. E., and MOLAND, E. S., 1986. Characterization of β -lactamases *in situ* on polyacrylamide gels. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 30: 951-952.
- SELA, M., 1970. Structure and specificity of synthetic polypeptide antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 169: 23-35.
- SHARP, P. A., SUGDEN, B., and SAMBROOK, J., 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose. *Biochem.* 12: 3055.
- SOESATYO, M., BIEWENGA, J., JEURISSEN, S. and SMINIA, T., 1990. The Effects of Peyer's Patches Inactivation in the Rat on the Development of Antibody-Forming Cells to Intestinal Antigen. *Immunobiol.* 181: 97-107.
- STRYER, L., 1988. *Biochemistry*. Third Edition. Stanford University. W. H., Freeman and Company/NEW YORK.
- THORNE, H. V., 1967. Electrophoretic characterization and fractionation of *polyoma* virus DNA. *J. Mol. Biol.* 24: 203.
- TISSOT, J. D., SCHNEIDER, P., HOHLFELD, P., SPERTINI, F., HOCHSTRASSER, D. F. and DUCHOSAL, M.A., 1993. Two-dimensional electrophoresis as an aid in the analysis of the clonality of immunoglobulins. *Electrophoresis.* 14: 1366-1371.
- TSVETKOVA, M. N., KOVALYOV, L. I., LAPTEV, A. V., and SHISHKIN, S. S., 1991. Production of high purity proteins by elution of individual fractions from two-dimensional gels. *Electrophoresis.* 12: 576-578.
- TYAGI, R. K., BABU, B. R. and DATTA, K., 1993. Simultaneous determination of native and subunit molecular weights of proteins by pore limit electrophoresis and restricted use of sodium dodecyl sulfate. *Electrophoresis.* 14: 826-828.
- UDHAYAKUMAR, V., and MUTHUKKARUPPAN, V., 1989. Protective of immunity by porin against *Salmonella* infection in mice. *Indian J. Med. Res.* 89: 121-127.
- VESTERBERG, O., 1993. A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis.* 14: 1243-1249.
- WALKER, J., WINDER, J., and STARKEY, M., 1988. *Introductory Workshops on Techniques in Molecular Biology*. Hatfield Polytechnic. Hatfield, Herts.

- WANG, F., and PAN, Y. C. E., 1991. Structural analyses of proteins electroblotted from native polyacrylamide gels onto polyvinylidene difluoride membranes: A method for determining the stoichiometry of protein-protein interaction in solution. *Anal. Biochem.* 198: 285-291.
- WAWRZYNCZAK, J. E., CUMBER, A. J., PARNELL, G. D., JONES, P. T., and WINTER, G., 1992. Blood Clearance in the Rat of a Recombinant Mouse Monoclonal Antibody Lacking the N-Linked Oligosaccharide Side Chains of the C_H2 Domains. *Molecular Immunology*. 29: 213-220.
- WAWRZYNCZAK, J. E., DENHAM, S., PARNELL, G. D., CUMBER, A. J., JONES, P. T. and WINTER, G., 1992. Recombinant Mouse Monoclonal Antibodies With Single Amino Acid Substitutions Affecting C1q and High Affinity Fc Receptor Binding Have Identical Serum Half-Lives in the BALB/c Mouse. *Molecular Immunology*. 29: 221-227.
- WEBER, K., and OSBORN, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406.
- WEBER, K., 1972. Measurements of molecular weight by electrophoresis on SDS acrylamide gel. *Methods in Enzymology*. 26: 3-27.
- WEISS, W., POSTEL, W., and GÖRG, A., 1991. Barley cultivar discrimination: I. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and glycoprotein blotting. *Electrophoresis*. 12: 323-330.
- WENISCH, E., BESI, P., and RIGHETTI, P. G., 1993. Conventional isoelectric focusing and immobilized pH gradients in 'macroporus' polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 14: 583-590.
- WIEDERKEHR, F., BUELER, M. R. and VONDERSCHMITT, D. J., 1991. Analysis of circulating immune complexes isolated from plasma, cerebrospinal fluid and urine. *Electrophoresis*. 12: 478-486.
- WRIGLEY, C. W., GORE, P. J., and MANUSU, H. P., 1991. Rapid (< 10 min) electrophoresis for identification of wheat varieties. *Electrophoresis*. 12: 384-5.
- YOSHIDA, M., ITOH, M., IMAI, T., TANIMOTO, Y., SAKURABAYASHI, I., and FURUYA, S., 1991. Analysis of two-dimensional electrophoretic patterns of proteins obtained from the sera of normal and tumor bearing nude rats. *Electrophoresis*. 12: 80-83.

9. TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, her zaman ilgi ve sevgisini gördüğüm, öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ömer ÇOLAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın her aşamasında yardımını ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Burhan ARIKAN'a teşekkür ederim. Yine her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Sadık DİNÇER'e özellikle teşekkür ederim. Ayrıca Mikrobiyoloji Laboratuvarının kıymetli elemanları Arş. Gör. Nursel Dostbıl, Arş. Gör. Özlem Eren ve Arş. Gör. Gökhan Coral'a teşekkür ederim.

Maneviyatını her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Biyolog Akif Güvenmez'e, Korkmaz, Gür ve Güvenmez ailesi mensuplarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Kağıt elektroforez sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında laboratuvar imkanlarını esirgemeyen Ç.Ü. Tıp Fak. Merkez laboratuvarı İmmünoloji Birimi teknisyenlerinden Şenol Karaduman'a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımızı maddi olarak destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Sivas'ın Gürün ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Gürün'de tamamladım. 1981 yılında Sağlık Bakanlığının yapmış olduğu sınav sonucu Adana Laboratuvar Sağlık Meslek Lisesine kaydoldum. 1985 yılında mezun olup, Adana Devlet Hastahanesinde laboratuvar teknisyeni olarak göreve başladım. 1986 yılında Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. Eğitimim sırasında hafta sonu ve gece nöbetleri şeklinde hastahanedeki görevimi sürdürdüm. Lisans öğrenimim sırasında TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu tarafından düzenlenen Araştırma projesi yarışmasında Biyoloji grubunda, Mikrobiyoloji konusunda yaptığımız çalışma ile birinci oldum. 1991 yılında bölüm ikincisi olarak lisans eğitimimi tamamladım. 1991 Ekim ayında Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji anabilim dalında yüksek lisans eğitime başladım. 1993 Eylül ayında Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olarak göreve başladım ve halen bu görevimi sürdürmekteyim.