

## 6

### Amaçlarımız

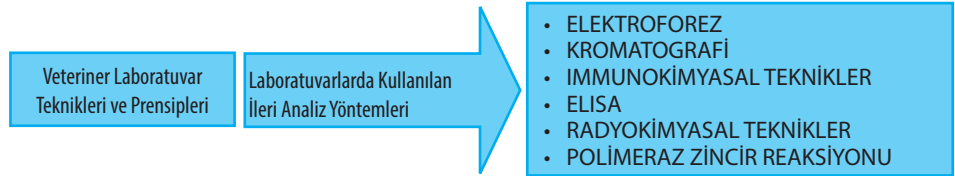
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- Elektroforezi ve elektroforez teorisini açıklayabilecek,
- Kromatografi, sabit faz ve hareketli faz terimlerini açıklayabilecek,
- Immunokimyasal tekniklerde kullanılan antijen, antikor, haptan, monoklonal ve poliklonal gibi terimleri tanımlayabilecek,
- Immunoassaylerin temel prensiplerini açıklayabileceksiniz.

### Anahtar Kavramlar

- Elektrik akımı
- Elektroforez destek ortamları
- Elektroforez tampon çözeltileri
- Dansitometri
- Kromatografi
- Sabit Faz
- Hareketli Faz
- Antijen-Antikor kompleksi
- Konjugat
- Yarışmalı immün tayin

### İçindekiler



# Laboratuvarlarda Kullanılan İleri Analiz Yöntemleri

## ELEKTROFOREZ

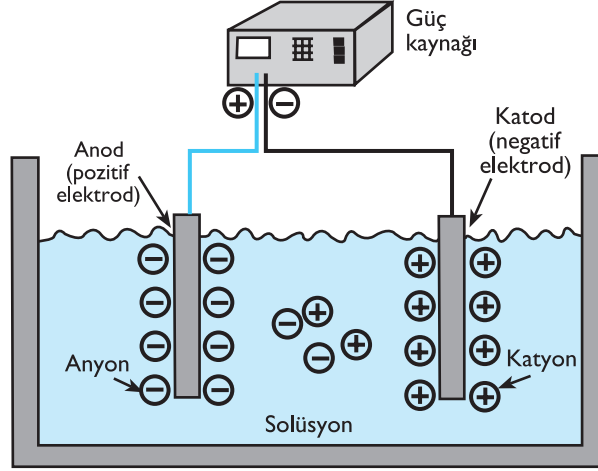
Elektroforez, çeşitlilik arz eden ve iyonize olabilen analitlerin ayırımına yönelik çok yönlü ve güçlü analitik tekniktir. Yük taşıyan çözünmüş maddeler veya parçacıkların sıvı ortamda elektriksel alanın etkisiyle göç etmesi elektroforez tekniğinin kapsamını oluşturur. İyonoforez benzer bir terim olup sadece küçük iyonların göç etmesini tarif eder. Zon elektroforez kapsamında ise daha çok klinik uygulamalar yer almaktadır. Bu teknikte tamponla karışım halinde olan örnekler agaroz jel katman gibi gözenekli bir ortama uygulandıktan sonra yük taşıyan moleküller farklı alanlar şeklinde hareket eder. Elektroforegram denilen ve destek materyali üzerinde komşularından kesin sınır ile ayrılan protein bölgeleri meydana getirir. Destek materyali proteine özgü boyalar ile muamele edildiğinde protein bölgeleri görünür hale gelir. Destek ortamı kurutulduktan sonra alanlarda yer alan proteinlerin miktarı dansitometre ile belirlenebilir. Elde edilen sonuçlar destek ortamının tamamen kurutulmasıyla kalıcı olarak saklanabilir.

## Elektroforezin Prensibi

İyonize olarak yüklenen kimyasal moleküller; taşıdıkları yüke göre elektroforez sisteminde ya anoda (artı elektrod) ya da katoda (eksi elektrod) göç ederler. Artı iyonlar (katyon) katoda, negatif iyonlar ise (anyon) anoda göç ederler. Artı ya da eksi yük taşıyabilen moleküller amfolit olarak anılır ve kendi izoelektrik noktalarından (pI) daha asidik ortamda bulunanlar artı yük alarak (proton bağlayarak) katoda göç ederler. Daha alkali ortamda ise eksi yüklenerek (proton vererek) anoda göç ederler (Şekil 6.1). Proteinler iyonize olabilen amino ( $\text{NH}_2$ ) ve karboksil ( $\text{COOH}$ ) gibi grupları fazla sayıda taşıdıklarından çözeltilerde amfolit gibi davranırlar.

Şekil 6.1

Elektroforezde anyon ve katyonların hareketinin şematik olarak gösterilmesi



Göç etme hızı; molekülün net yükü, molekülün büyüklüğü ve şekli, elektriksel alan şiddeti, destek materyalinin özelliği ve çalışma ısı gibi faktörlerden etkilenir. Elektroforetik hareket ( $\mu$ ) her bir birim alan şiddeti (volt/cm) başına göç hızı (cm/s) olarak tanımlanır.

$$\mu = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

Denklem iki ayrı formülden türetilen elektroforetik hareketi tanımlamaktadır. Formülün bir tanesi elektriksel alanın iyon üzerindeki itici kuvvetini tanımlarken diğeri ortam tarafından oluşturulan sürtünme direncinin oluşturduğu zıt kuvveti tanımlar.

Denklemden

$\mu = \text{cm}^2/(\text{V})(\text{s})$  de elektroforetik hareketi

$Q$  = iyonun net yükünü

$r$  = çözünenin iyonik yarıçapını

$\eta$  = göçün meydana geldiği tampon çözeltinin akışkanlığını

belirtir.

Bu nedenle elektroforetik hareketlilik net yükü doğru, molekül büyüklük ve akışkanlık ile ters orantılıdır.

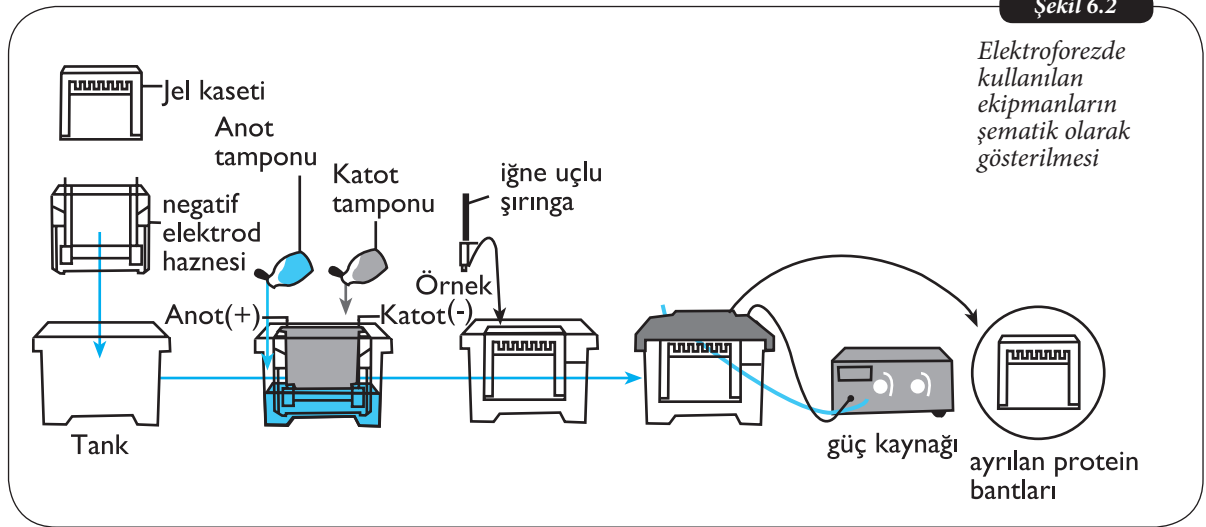
SIRA SİZDE



**Plazma veya serumdaki en yoğun protein albumin olup aynı zamanda molekül ağırlığı en düşük olanıdır. Bunun yanında izoelektrik noktası en düşük proteinlerden biridir. Serum veya plazma, alkali tampon çözelti içerisindeki jelle katot tarafından uygulandığında, albuminin göç etme hızını diğer plazma proteinlerine oranla nasıl olmasını beklersiniz?**

## Elektroforez Cihazı

Konvansiyonel elektroforez sistemi Şekil 6.2'de gösterilmiştir. İşlemden önce kullanılan tamponu içeren alanda platin veya karbondan imal edilmiş elektrot bulunur. Pozitif veya negatif kutbun yükü, güç kaynağına bağlanma şekline göre belirlenir. Ayırımın gerçekleştiği ortam olan elektroforez desteği ya tampon ile doğrudan ya da fitiller ile dolaylı olarak temas eder. Cihaz, güç kaynağına doğrudan bağlı olduğu için personel ve sistemin korunması ve yüzeyden buharlaşmanın en aza indirilmesi amacıyla, uygun kapaklar kullanılarak kapatılır.



## Güç Kaynağı

Elektroforetik işlemden önce güç kaynağının görevi elektriksel gücü sağlamaktır. Ticari güç kaynakları sabit akım, voltaj ve güç gibi farklı şartlarda çalışmayı mümkün kılmaktadır. Ortamdan geçen akım Joule ısısının üretimi ile ilişkili olan elektriksel direnci meydana getirir.

$$I_{\text{ısı}} = (E)(I)(t)$$

Denklemden

E = volt cinsinden EMF

I = amper cinsinden akımı

t = saniye cinsinden zamanı ifade eder.

Elektroforez esnasında oluşan ısı iletkenliği artırır (direnci düşürür). Güç kaynağı sabit voltaj sağladığında çözünmüş iyonların ısıyla uyarılması neticesinde akımda meydana gelen artış proteinlerin göç hızında artışa ve destek ortamından suyun buharlaşmasına neden olur. Su kaybı iyon konsantrasyonunda artışa ve direncin daha da düşmesine (R) neden olur. Bu faktörlerin göç hızı üzerine etkisini asgari düzeyde tutmak için voltaj yerine akım sabit tutulmalıdır.

Ohm kanuna göre

$$E = (I)(R)$$

Bu nedenle R azalırsa EMF aynı zamanda azalır (akım sabit kalırsa). Bu da ısı etkisini azaltarak göçün göreceli olarak sabit kalmasını sağlar.

### Tampon Çözeltiler

Elektroforetik işlemde tampon çözeltilerin birden fazla görevi bulunmaktadır. Bunlar; akımı iletmek, elektroforezin gerçekleştirildiği pH yı oluşturmak, çözünen analitin yükünü belirlemek olarak sıralanabilir.

Tamponun iyonik kuvveti, destek ortamın iletkenliği üzerine etkilidir. Yüklü molekülün etrafını saran iyonik bulutun (tampon ve tampon dışı iyonlar) hacmi, göç etme hızını ve elektroforetik alanların keskinliğini etkiler. Tampon konsantrasyonunun artmasıyla iyonik bulutun boyutu genişler. Bu olay sonucu molekülün rahatça hareketi baskılanır. Yüksek iyonik kuvvetli tampon sistemler, daha keskin hatlı bantların oluşumuna neden olur. Fakat, aynı zamanda artan akım nedeni ile daha yüksek Joule ısısı oluşur. Bu durum da ısıya duyarlı proteinlerin denatürasyonu ile sonuçlanabilir.

$$\mu = 0.5 \sum c_i z_i^2$$

$c_i$  = mol/L cinsinden iyon derişimi

$z_i$  = iyon yükünü ifade eder.

Tek valanslı iyon tarafından oluşturulan tamponun iyonik kuvveti molariteye (mol/L) eşittir. Herbiri bir mol/L olan tek valanslı ve çift valanslı iyonları içeren elektrolit çözeltisinin iyonik kuvveti 3 mol/L iken iki farklı çift valanslı iyonları içeren çözeltinin iyonik kuvveti 4 mol/L dir.

### Endozmoz ve Elektroendozmotik Akış

Elektroforezde kullanılan destek ortamlarının bazıları suyla temas ettiğinde hidroksil iyonlarını adsorbe ederek negatif yüklenir. İyonlar yüzeye bağlanarak hareketsiz kalır. Çözeltide var olan pozitif iyonlar bu eksi yüklü sabit bölgeler etrafında kümelenerek bulut meydana getirirler. Bulutla ilişki halinde bulunan negatif iyon miktarı sabitlenmiş halde bulunan negatif iyonlardan uzaklaştıkça artar ve sonunda her iki iyon konsantrasyonu eşitlenerek dengeye ulaşır. Sisteme akım uygulandığında destek ortamına bağlı olan iyonlar sabit kalır fakat diğerleri kendilerinin aksi kutbuna serbestçe hareket etmeye başlarlar. İyonlar yüksek oranda hidratize olduğundan kendilerinin hareketi içinde yer aldıkları çözücünde hareket etmesine neden olur. Bu fenomen endozmoz olarak tanımlanır ve bu olay sonucunda su tek yönde hareket eder. Yeterince yüklü olmayan ve suyun akış yönüne ters hareket eden çözeltideki makromoleküller, ya hareketsiz kalacak ya da aksi kutup tarafından geri süpürülecektir. Yüzey yüklerinin en az olduğu elektroforetik ortamlarda (nişasta jel, saflaştırılmış agaroz ya da poliakrilamid jelde) endozmoz minimumdur.

### Destek Materyallerine Göre Elektroforez Tipleri

#### Kağıt Elektroforezi

Geçmişte serum proteinlerini ayırmada destek ortamı olarak yoğun olarak kullanılmıştır. Günümüzde bu destek materyalinin yerini selüloz asetat veya agaroz jel almıştır. Kağıt elektroforezde ayırım süresi uzundur (14-16 saat) ve oldukça fazla artalan etkileşimi görülür. Bu olumsuz faktörlere rağmen, geçmişte yoğun kullanılmasının nedeni, destek ortamı olarak kolay elde edilebilirliği ve gerilme direncinin yüksek oluşudur.

### Nişasta Jel ve Selüloz Asetat Elektroforez

Nişasta jel, elektroforezde kullanılan ilk destek materyallerinden biridir. Geçmişte molekülleri hem büyüklük, hem de yüzeylerinde oluşan yükler açısından ayırmakta kullanılmıştır. Nişasta jeli, tekrarlanabilir şekilde elde etmek zor olduğundan rutin analizlerde kullanımı fazla kabul görmemiştir.

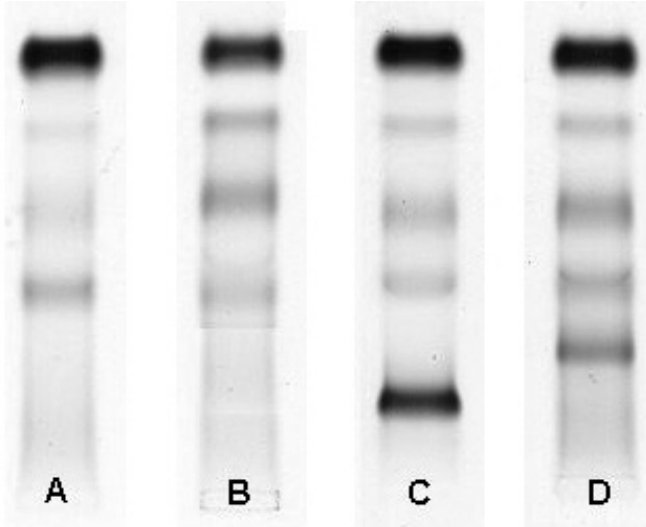
Selüloz asetat membranlar kuru, opak, kırılğan katmanlar olup, selülozun asetik anhidrit ile muamelesinden oluşmuştur. Kullanmadan önce tamponla ıslatılması gerekmesi ve dansitometrik miktar tayininden önce berraklaştırılması gerektiğinden, rutinde kullanımı nadirdir. Günümüzde agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezi yaygın olarak kullanılmaktadır.

### Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi özellikle serum proteinlerinin, hemoglobin alt gruplarının, laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin, lipoprotein fraksiyonlarının ve diğer maddelerin analizinde kullanılır (Resim 6.1). Agaroz jel, rutin analizlerde kullanılabilirlik ve çok yönlülük yönünden selüloz asetata eşdeğer kabul edilmektedir. Agaroz gözenek büyüklüğünün fazla oluşu ve proteinlerin buralardan sekteye uğramaksızın geçmesi ayırımı tamamen yükün kütleye oranına dayandırmaktadır. Agaroz jelin en önemli avantajı, proteinlere karşı affinitesinin düşük olması ve kuruduktan sonra gösterdiği doğal berraklığıdır. İyonize olan gruplardan temel olarak yoksundur ve hafif endozmotik karakter gösterir.

**Resim 6.1**

1 Agaroz jelde serum protein elektroforezi  
a) Normal serum  
b) Akut faz cevabı  
c) Paraproteinemi  
d) Normal plazma

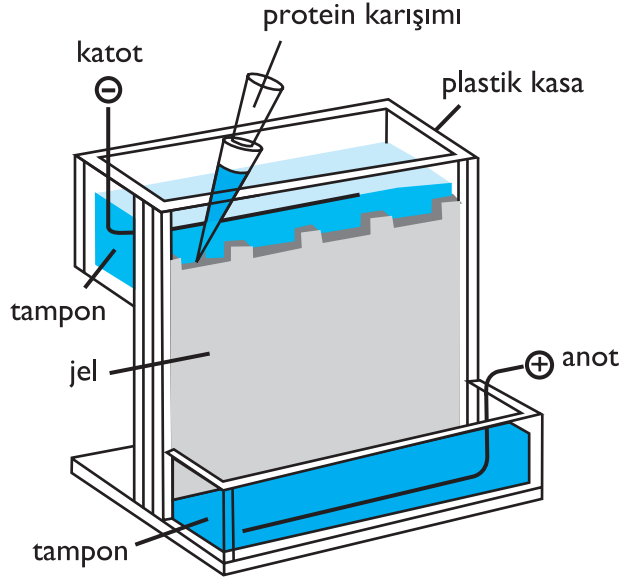


### Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid, akrilamidin ve çeşitli katalizörlerin ortamda bulunması durumunda ısı yardımıyla meydana getirilen polimer çeşididir. Poliakrilamid jel ısıya dayanıklı, şeffaf, sağlam ve kimyasal yönden göreceli olarak inerttir. Bunlardan başka jel yük taşımadığından endozmoza neden olmaz ve farklı gözenek büyüklüğüne sahip jeller hazırlanabilir. Poliakrilamid jelde proteinler hem yük kütle oranına hem de moleküler büyüklüğe göre ayrılır ve bu fenomen moleküler eleme olarak adlandırılır. Poliakrilamid jel elektroforez cihazının yapısı Şekil 6.3'de gösterilmiştir.

Şekil 6.3

Poliakrilamid jel elektroforez cihazı



## DİKKAT



**Poliakrilamid potansiyel olarak nörotoksik ve karsinojeniktir. Bu nedenle çalışırken çok dikkat edilmeli ve laboratuvar güvenlik kurallarına uyulmalıdır. Kitabınızın “Ünite 10 - Laboratuvar Güvenliği ve Temizliği” bölümüne bakınız.**

### Genel Uygulama

Konvansiyel elektroforez; ayırım, boyama, tespit ve miktar tayini başlıklarından oluşur. Bunlara ilave olarak elektroforeze dayanan farklı blotlama teknikleri geliştirilmiştir.

Elektroforetik ayırımı gerçekleştirmek üzere, ya önceden ticari olarak hazırlanmış agaroz veya poliakrilamid jeller kullanılır ya da uygun ekipmanlar ile elektroforez öncesi laboratuvarında hazırlanır. Her ikisinde de jelde hava kabarcığı olmamasına ve sıvı içeriğinin fazla olmamasına dikkat edilmelidir. Daha sonra örnek, destek materyaline uygulanır ve destek materyali daha önceden doldurulmuş tampon hazneleri ile temas ettirilir. Elektroforez sabit akım ya da voltajda belirli bir süre ile uygulanır.

Elektroforez tamamlandıktan sonra, destek ortamı elektroforezin yapıldığı bölmeden alınır ve tamponu uzaklaştırılarak, birbirinden ayrılan komponentlerin diffüzyonunu önlemek amacıyla tespit çözeltisine aktarılır. Bu aşamadan sonra boyanarak bireysel protein alanlarının görüntülenmesi sağlanır. Fazla boya materyali yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra destek ortamı kurutulur.

Elektroforetik ayırım ve boyamanın ardından oluşan gözle görünür protein alanlarını direk dansitometri ile yüzde olarak ya da örneğin toplam protein miktarı bilindiği takdirde, mutlak değer olarak belirtmek mümkün olabilmektedir. Dansitometrede jel veya diğer destek ortamı ölçüm yapan optik sistem tarafından taranır. Her pike ait absorban, uygun araçlar ile ya kağıt çizelgeye aktarılır ya da elektronik olarak gösterilir. Miktar belirlemenin güvenilirliği; uygun dalga boyunun seçilmesine, cihazın verdiği doğrusal cevaba ve jel ya da strip artalanın şeffaflığına bağlıdır.

**Yukarıda açıklandığı üzere hassasiyeti arttırmak için bazı örnekleri konsatre etmek (derişik hale getirme) gerekmektedir. Örnekle beraber ortamda bulunan diğer iyonların sonuç üzerine nasıl bir etkisi olabilir ?**

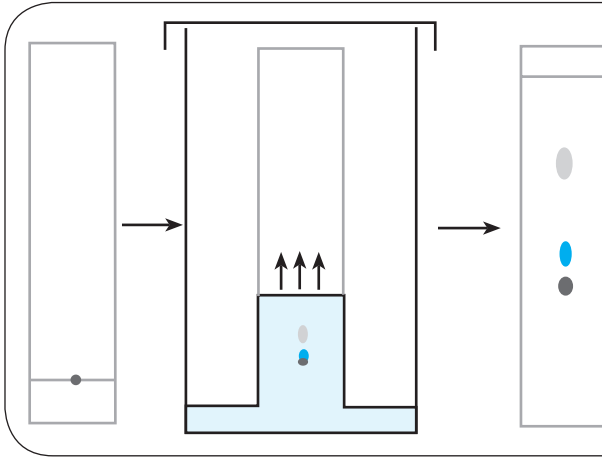


SIRA SİZDE

## KROMATOGRAFI

Kromatografi, birbiri ile yakın benzerliği ve ilişkileri olan analitlerin, ayrımı ve miktarlarının belirlenmesine yönelik kullanılmaktadır. Çözünmüş haldeki maddelerin, hareketli faz ve sabit faz arasında farklılık gösteren dağılımlarına göre ayrılmasını kromatografik sistemler sağlar. Bu işlem sırasında hareketli faz aracılığıyla örnek, sabit fazı barındıran katman veya kolondan geçer. Mobil faz sabit faz üzerinden ilerledikçe, çözünen maddeler ya sabit faza tutunur ve hareket etmeyebilir veya sabit faza hiç tutunmadan mobil fazla beraber hareket edebilir. Diğer bir seçenekte ise örnek her iki faz ile birden etkileşir ve iki faz arasında dağılım gösterir. Sabit faza ilgisi daha çok olan analitler daha yavaş göç ederken, az olanlar daha hızlı hareket ederler. Analitlerin mobil faza ilgisi arttıkça göç etme hızı artar. Kuvvetli bağlanan analitler, sabit fazdan ancak mobil fazın kimyasal özelliği değiştirilerek ayrılabilirler.

Düzlemsel ve kolon kromatografi kromatografinin iki temel formudur. Düzlemsel kromatografide sabit faz bir kağıt yaprağa (kağıt kromatografi) veya katı yüzeye tutturulur (ince tabaka kromatografi). **Kağıt kromatografide** sabit faz suyun veya polar bir çözücünün kağıdın liflerine tutturulması sonucu oluşturulur (Şekil 6.4). **İnce tabaka kromatografide** silika jel gibi partiküllerin ince tabaka halinde cam levha, plastik ya da alüminyum katmanlar üzerine düzgünce yayılarak kaplanması ile oluşturulur. İnce tabaka küçük çaplı partiküllerden şekillendiği durumlarda tekniğe yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi denilmektedir.



Şekil 6.4

*İnce tabaka kromatografinin şematik olarak gösterilmesi*

Kolon kromatografide, sabit faz saf silika veya polimer olabilir. Destek ortamına ya kaplanmakta ya da kimyasal şekilde bağlanmaktadır. Sabit faz tüp içine doldurulabilir veya tüp iç yüzeyine kaplanabilir. Hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına göre kolon kromatografi **gaz** veya **sıvı kromatografi** olarak adlandırılır.

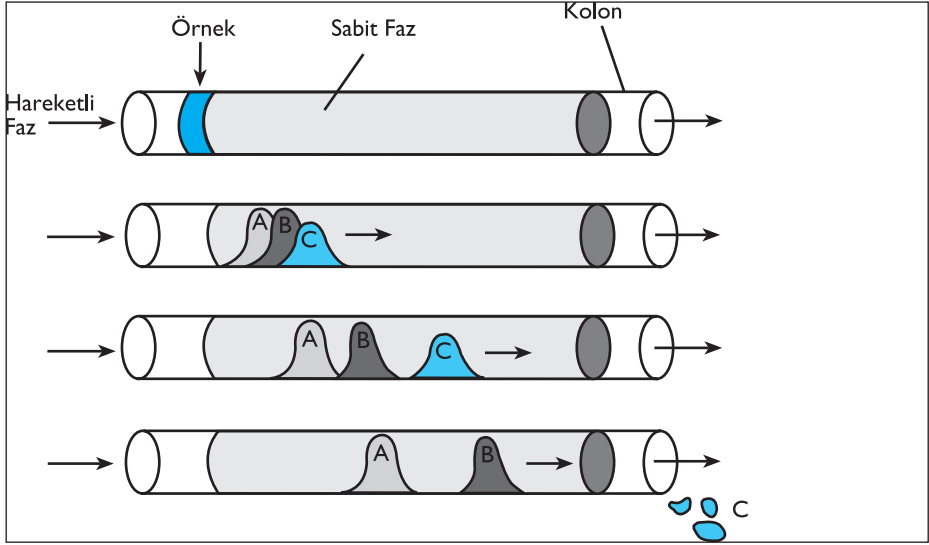


Her iki teknik kütle spektrometresi ile beraber kullanılırsa buna birleştirilmiş teknikler denir ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi veya sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi tanımlarından bahsedilir.

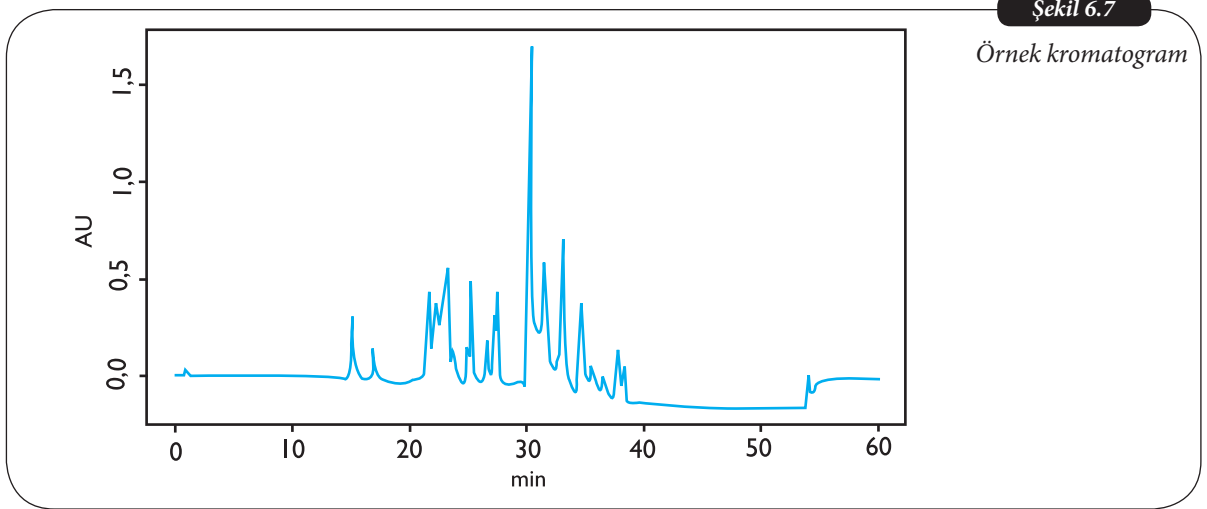
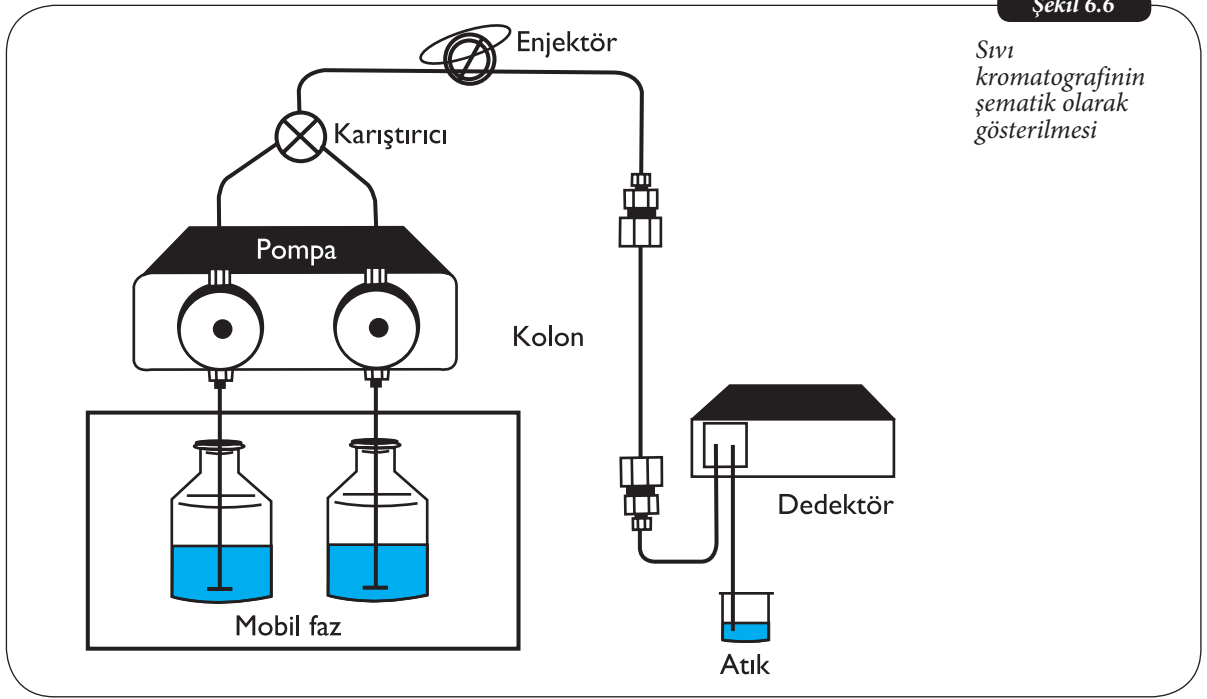
Hareketli faz, sabit faz içerisinde geçer. Bu sırada analitin kolondaki sabit fazla etkileşimleri sonucu, molekül özelliklerine göre bir sıralanma oluşur (Şekil 6.5).

**Şekil 6.5**

*Kolonda moleküllerin ayrımının şematik olarak gösterilmesi*



Analitik gaz kromatografisi veya sıvı kromatografide (Şekil 6.6), hareketli faz kolondan çıkar ve dedektörden geçerek; zamanın, mesafenin veya hacmin fonksiyonunda elektronik sinyal oluşturur (Şekil 6.7). Elde edilen grafik kromatogram olarak adlandırılır. Tutulma zamanı veya hacmi ise, analitin enjekte edildiği andan başlayıp kolondan geçerek dedektörü terk etmesi için gereken süre veya hareketli faz miktarıdır. Kromatogram tarafından sağlanan veri, analitlerin tanımlanmasını ve miktarca belirlenmesini sağlar. Kolondan ayrılan (elüe olan) çözünmüş maddeler grafikte pikler halinde görülür. Bu nedenle bunlara kromatografik pik denilmektedir. Düzlemsel kromatografide ayrılan alanlar ya kendine özgü renkler aracılığı ile ya da kimyasal değişiklik sonucu elde edilmiş renkli odaklar veya bantlar halinde görüntülenir. Bu sayede analitlerin niteliksel olarak identifikasyonu yapılabildiği gibi miktar analizi de yapılabilir.



### Kromatografik Ayırımın Sınıflandırılması

Kromatografik ayırımın sınıflandırılması, çözünen maddelerin fiziksel veya kimyasal özelliklerine göre yapılmaktadır. Bunlar iyon değişim, bölümlleme (partisyon), soğurma (adsorbsiyon), boyut dışlama (jel filtrasyon) ve affinite kromatografileridir. Klinik laboratuvar uygulamalarında en çok iyon değişim ve partisyon kromatografi teknikleri kullanılmaktadır.

### İyon Değişim Kromatografi

İyon değişim kromatografi, yüklü yüzey moleküllerine sahip sabit faz ile bunun zıt yüküne sahip hareketli faz arasında iyonların yer değişimi esasına dayanır. Şartlara bağlı olarak çözünmüş maddeler ya katyon (artı yüklü) ya da anyon (eksi yüklü) olarak bulunurlar. Ayırım, taşınan yüklerin fark ve miktarına dayanır. İşlemsel olarak sabit faz olarak görev yapan silika parçacıkları veya reçinenin yüzeylerine, anyonik veya katyonik yükleri sağlayan fonksiyonel gruplar bağlanır. Elektrokimyasal nötrlüğü sağlamak için ters iyon (counter ion) olarak tanımlanan takas iyonu, sabit yüklere çok yakın konumda bulunur ve hareketli fazda yer alan çözünmüş iyonlar ters iyonlar ile yer değiştirirler.

Katyon değişim partikülleri, negatif yüklü fonksiyonel grupları barındırır ve katyonik karakterdeki çözünen maddeleri ayırmak için kullanılır. Sülfonat iyonları, kuvvetli asit gruplara örnek olarak verilebilirken, karboksilat iyonları veya karboksimetil, fosfat, sülfometil veya sülfopropil grupları zayıf asidik gruplara örnek verilebilir.

Anyon değişim dolgu materyalleri anyonik karakterdeki çözünmüş maddelerin ayırımında kullanılır. Pozitif yük taşıyan ve kuvvetli bazik kuarternler aminleri bulunduranlara örnek olarak trietilaminoetil grupları verilebilirken; zayıf bazik olanlara ise aminoetil, diaminoetil, guanidoetil veya epiklorohidrin-trietanolamin grupları verilebilir.

İyon değişim kromatografisi çok sayıda uygulama alanı bulmuştur. Aminoasitlerin, peptitlerin, proteinlerin ve nükleotidlerin, oligonükleotidlerin ve nükleik asitlerin ayırımında yoğun olarak kullanılmaktadır. İyon değişim kromatografinin diğer bir uygulama alanı ise sıvı çözeltilerden inorganik iyonların uzaklaştırılmasıdır. Örneğin anyon ve katyon değişim reçinelerini birlikte barındıran kompozit dolgu materyalleri ile deiyonize su hazırlanabilmektedir.

### Partisyon Kromatografi

Çözünen maddelerin birbirine karışmayan iki sıvı arasında dağılımı partisyon kromatografinin temelini oluşturur. İşlemsel olarak sıvılardan bir tanesi sabit fazı oluşturur. Bu fazın oluşturulması için ince tabaka sıvı destek materyali üzerine veya kapiller kolonun iç yüzüne adsorbe edilir. Ayırım çözünen maddelerin sabit ve hareketli faz arasında göreceli çözünme yeteneğine bağlı olarak şekillenir.

Partisyon kromatografi sıvı-sıvı kromatografi ve gaz-sıvı kromatografi şeklinde sınıflandırılabilir. Sıvı-sıvı kromatografi ise normal faz kromatografi ve ters faz kromatografi olarak ikiye ayrılır. Normal faz kromatografide sabit faz olarak polar sıvı kullanılırken göreceli olarak apolar çözücü veya çözücü karışımı hareketli faz olarak kullanılır. Ters faz kromatografide, sabit faz apolar olup hareketli faz göreceli olarak polardır.

SIRA SİZDE



3

**Elinizde iki farklı maddeyi ters faz kromatografi tekniği ile ayırmak istiyorsunuz. Bunlardan bir tanesi daha polar olup kolonu önce terk etme eğilimindedir fakat ayırımın iyi olmadığını gördüğünüzde ilk hareket noktanız ne olabilir?**

İyon baskılama ve iyon-çifti kromatografisi, iyonik maddelerin ayırımında kullanılan iki farklı tür ters faz kromatografidir. İyon baskılama kromatografisinde, iyonik karakterli zayıf asit veya baz olan mobil fazın pH'sı değiştirilerek nötralize edilir. İyonik grubun nötralize olmasıyla analit daha az polar hale gelir

ve apolar sabit faz ile daha iyi etkileşir. İyon çifti kromatografisinde ise ters iyon yani analite zıt kutuplu iyon mobil faza ilave edilir ve analit ile iyonik çift meydana getirerek nötrale eder. Daha sonra bu çiftler ters faz kromatografi ile birbirilerinden ayrılır. İyon çifti kromatografisi terapötik ilaç ve metabolitlerin ayırımına önemli katkılar sağlar.

### Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografinin esasını, çözünmüş maddelerin katı yüzeyde soğurulma (adsorpsiyon) ve salınma olayları arasındaki fark oluşturur. Elektrostatik hidrojen bağları ve dağılımsal etkileşimler bu tip kromatografiyi kontrol altında tutan faktörlerdir. Bu çalışma şekli ile gaz kromatografi kullanılarak düşük molekül ağırlıklı ve oda ısısında gaz formunda olan moleküller birbirinden ayrılabilir.

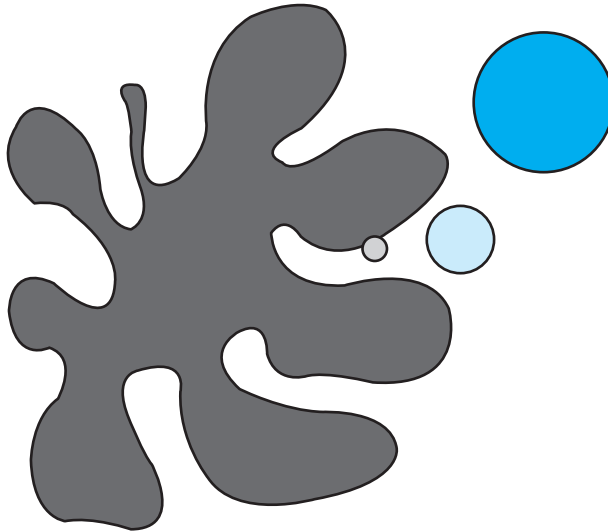
### Boyut Dışlama Kromatografisi (Jel Filtrasyon)

Bu kromatografi çeşidi aynı zamanda jel filtrasyon, moleküler eleme, sterik eleme ve jel nüfuz kromatografisi olarak da bilinmekte olup moleküllerin büyüklüklerine göre ayırımını sağlar. Molekülün şekli ve hidratize formda bulunması işlemin sonuçlarını etkilemektedir.

Sabit faz olarak çok çeşitli materyaller kullanılabilir. Bunlar çapraz bağlı dekstran, poliakrilamid, agaroz, polystrene-divinilbenzen gözenekli cam veya bunların farklı kombinasyonlarıdır (Şekil 6.8). Bu materyallerin tanecikleri gözeneklidir ve küçük moleküller gözeneklerde geçici olarak yakalanır. Gözeneklere giremeyecek kadar büyük olan moleküller ise tutulmadan mobil faz ile beraber kolonu terk eder. Orta boydaki moleküller gözeneklerin bir kısmında geçici süre ile tutulurlar ve kolonu büyüklerden sonra, fakat küçük moleküllerden önce terkederler. Bu tip kromatografi analitik olmaktan çok örnek hazırlamaya yöneliktir.

Şekil 6.8

Boyut dışlama (Jel Filtrasyon) kromatografisi prensibinin şematik olarak gösterilmesi



**Yapacağınız çalışmada molekül ağırlığı oldukça düşük bir protein ile ilgileniyor ve etkileşime neden olduğunu bildiğiniz yüksek molekül ağırlıklı gama globulin fonksiyonunu uzaklaştırmak istiyorsunuz. Nasıl bir yol izlersiniz?**



SIRA SİZDE

4

### Affinite Kromatografi

Affinite kromatografide analit ve bağlayıcı molekülün birbiri ile eşsiz bir biçimde bağlanması yöntemin esasını oluşturur. Enzim-substrat, hormon-reseptör veya antijen antikor etkileşimleri bu teknikte kullanılmaktadır (Şekil 6.9).

Affinite kromatografinin gücü tekniğin seçiciliğinde yatmaktadır. Klinik laboratuvarlarda glike hemoglobini, düşük yoğunluklu ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinleri birbirinden ayırmakta kullanılmıştır. Bu teknik aynı zamanda çok miktarda protein veya antikor hazırlanması çalışmalarında da kullanılmıştır.

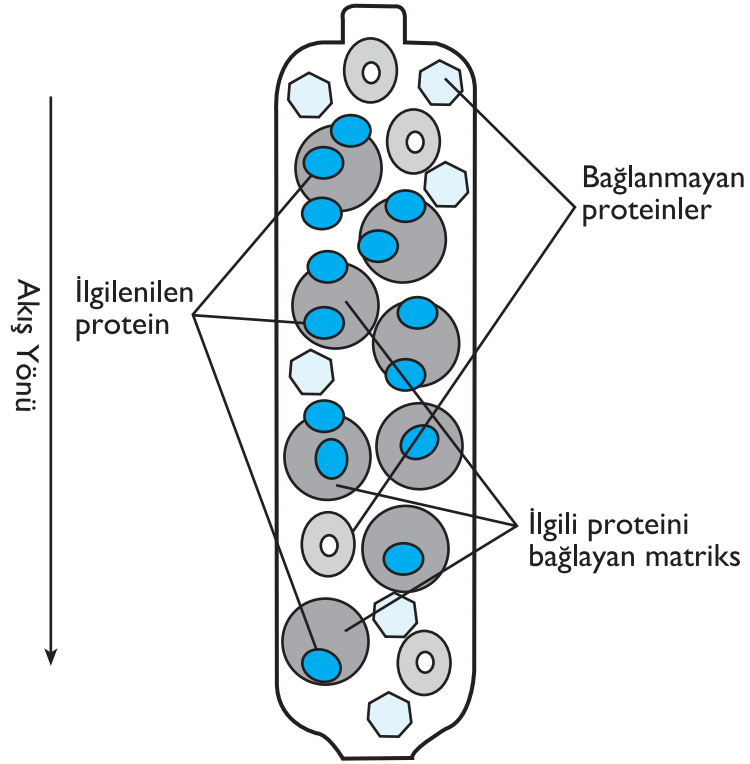
DİKKAT



**Affinite kromatografide hem etkileşim yönünden hem de saflaştırılması planlanan biyomolekülün biyolojik aktivitesi yönünden çalışma sırasında uygulanan pH ya çok dikkat edilmelidir.**

Şekil 6.9

Proteinlerin affinite kromatografi tekniği ile saflaştırılması



### IMMUNOKİMYASAL TEKNİKLER

İmmunokimyasal reaksiyonlar, immunoassay olarak bilinen hassas ve özgül testlerin esasını oluşturmaktadır. Tipik bir immunoassayda analiti yani antijeni tanımak üzere, antikorlar ayıraç olarak kullanılmaktadır. Spesifik antijenlere karşı hazırlanmış yüksek özgüllük ve affiniteye sahip antikorların varlığı ve antikorların eşsiz bir biçimde antijenleri çapraz bağlama yeteneklerinin oluşu spesifik maddelerin identifikasyonunu ve miktarlarının belirlenmesini sağlamıştır.

## Antikor ve Antijen

Organizmada antijenle uyarı sonrası plazma hücreleri tarafından üretilen ve yapısı sayesinde onlar ile özgün olarak reaksiyona girme kapasitesine sahip proteinlere antikor adı verilmektedir. Organizmada 5 ana protein sınıfı immüoglobulinler olarak bilinir ve her grubun farklı kimyasal yapısı ve özel bir biyolojik rolü vardır. Immüoglobulin G (IgG) en sık kullanılan immunokimyasal reaktif olup molekül ağırlığı 158000 Da olan bir glikoproteindir ve iki dupleks zincirden oluşmaktadır. Her set ağır ve hafif zincirlerden oluşur ve zincir disulfid bağları ile bağlanır. Zincirler arasındaki disulfid bağlar dupleks zincirleri birarada tutarken, aynı zamanda molekülün simetrik olmasını sağlar. Belirli bir antikoru amino terminal ucundaki değişken amino asit zinciri antijenik spesifiteyi belirler. Her amino asit dizisi tek bir plazma hücre kolonisi tarafından meydana getirilir ve her plazma hücre hattı tek özgülükte antikorlar üretir. Kompleks bir antijen; farklı plazma hücrelerinden köken alan farklı özgülükte antikorlar meydana getirir. Bu tür antikorlar poliklonal olarak adlandırılır ve immünojene karşı farklı reaktivite gösteren geniş bir spesifite ortaya koyar. Moleküler antijenin eşsiz biçimde tamamlayıcı antikor tarafından bağlandığı bölgeye epitop (antijenik determinant) denmektedir.

Immünojen, protein veya genellikle protein yapısındaki taşıyıcıya bağlanmış bir maddedir. Immünojen yabancı konağa girdiğinde antikor oluşumunu uyarır. Hapten yabancı konakta kendi başına immün yanıtı neden olmaz iken immünojenik bir taşıyıcıya bağlandığı takdirde, konjuge olan molekül haptene özgü antikor yanıtına neden olur. Immünojenite için gerekli özellikler aşağıda sıralanmıştır.

1. Molekül içinde kararlı yapıların var olması
2. Yapının rastlantısallığı
3. Molekül ağırlığının en az 4000-5000 Da olması
4. Metabolize olabilme yeteneği
5. Immünojenik konfigürasyonun antikor oluşturan mekanizmalara erişebilirliği
6. Yapısal olarak yabancılığı

Antikor ve antijen arasındaki etkileşime neden olan güç veya enerji iki şekilde ifade edilir. Affinite antikoru bağlandığı tek bölge ile buna karşılık gelen antijendeki epitopun aralarında meydana getirdiği etkileşim enerjisini gösteren termodinamik miktardır. Avidite ise antikora ait tüm bireysel bağlanma bölgelerinin toplamını içine alan genel bağlanma gücüdür. Bu nedenle affinite bağlanan maddenin (antijen) özelliğini verirken avidite ise bağlayanın (antikor) özelliğini verir.

Poliklonal antiserum, konak hayvana immünojen verilmesi ile elde edilir. Poliklonal antikorlar immunizasyon sonucu farklı plazma hücreleri tarafından elde edilmiş heterojen antikor karışımı olup, bunun aksine monoklonal antikorlar tek koloni veya plazma hücresi hattından elde edilen üründür. Monoklonal antikorlar immünoassaylerde sıklıkla kullanılan reaktiflerdir. Monoklonal antikor üretimi için en kabul gören yöntem, immunize farelerden elde edilen uyarılmış lenfositlerin fare myeloma hücreleri (ölümsüz B hücre hattı) ile füzyonudur. Kullanılan fare myeloma hücreleri hipksantin guanine fosforibozil transferaz HGPRT enziminden yoksundur. Bu nedenle aminopiterin varlığında timidin ve hipoksantinden purin bazlarını sentezleyemez. Füzyon sonrası hücreler hipoksantin, aminopterinin ve timidinin içeren (HAT vasatı) seçici ortama alınır. Füzyona uğrayan hücreler HGPRT sentezi için gerekli genetik materyale sahip olduklarından canlı kalır. Füzyona uğrayan hücrelerden köken alan koloniler ilgili antikor üretimi açısından taranır. Tarama sonucu istenen özgülüğe sahip antikoru üreten kolonilerin alt kültürü yapılır. Böylece tek antijenik epitopa ve bağlanma enerjisi veya affinitesine sahip antikor üreten hücre hattı izole edilmiş olur.

Monoklonal antikorlar, tek bir deneyde aynı anda iki farklı antikorun kullanılmasına imkan sağlar. Örneğin katı faz antikoruna ve eşsiz bir epitopa özgü olan ve bundan farklı epitopa özgü olan iki farklı monoklonal antikor tek bir inkubasyon aşamasında kullanılabilir. Bu kombinasyonla, antijen ve işaretli antikorun katı faza iki basamak halinde ilave edilmesine gerek kalmamaktadır. Böylece birer adet inkubasyon ve yıkama basamağı azaltılmış olmaktadır. Monoklonal antikorlar tek epitopa özgü olduklarından antijenik molekülleri çapraz bağlama yetenekleri yoktur. Bu nedenle çöktürme reaksiyonlarında kullanılamazlar.

SIRA SİZDE

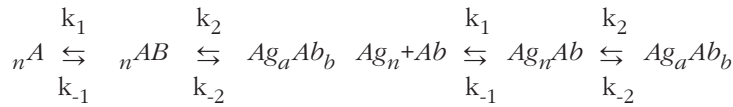


**Kanda myoglobin miktarını belirlemek üzere antikor temin etmeniz gerekiyor. Bu kapsamda antikor seçerken nelere dikkat etmeniz gerekebilir ?**

### Antijen-Antikor Bağlanma Reaksiyonları

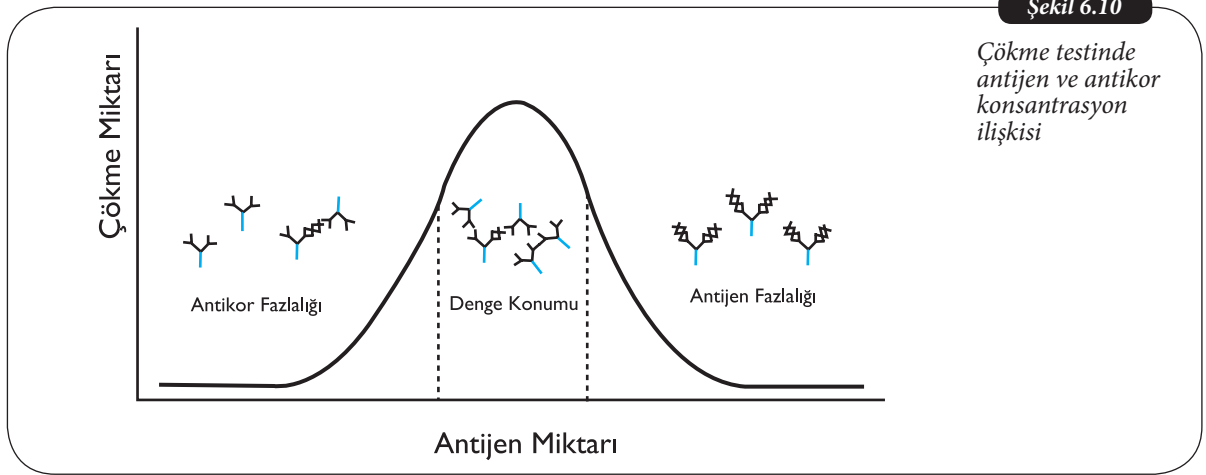
Antijen-antikor bağlanması için birkaç farklı kuvvet birlikte hareket eder. Bu olaya katkıda bulunan bağlanma kuvvetleri; elektrostatik van der Waals-London dipol dipol etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler ve iyonik kolombik bağlanmadır. İyonik bağlanma birincil olarak antijen ve antikorun  $\text{COO}^-$  ve  $\text{NH}_4^+$  grupları arasında olur.

Antijen ve antikorun birbirine bağlanması statik olmayıp üç fazda devam eden denge reaksiyonudur. İlk faz multivalan antijen ( $\text{Ag}_n$ ) ile bivalan antikor ( $\text{Ab}$ ) arasında çok hızlı şekillenir. İkinci fazda oluşan kompleksin büyümesi görülür ve aşağıdaki denklem ile ifade edilir.



Bu denklemde  $k_1 \gg k_2$  dir ve n epitop başına molekül sayısını gösterirken a ve b kompleks başına antijen ve antikor molekül sayılarını verir. Üçüncü fazda kompleks kritik boyuta ulaştıktan sonra çöker. Reaksiyonun hızı elektrolit konsantrasyonu, pH ve ısı yanında antijen ve antikor türleri ile antikorun bağlanma affinitesine bağlıdır.

Antikorun birleşme bölgeleri [Ab] antijen bağlayan bölgelerinden [Ag] önemli miktarda fazla ise antijen bağlayan bölgeleri çapraz bağlanma şekillenmeden hızla doymun duruma gelir. Bunun sonucunda küçük AgAb kompleksleri meydana gelir. Eğer antikor antijenden hafifçe yüksek ise antijenlerin antikorlar tarafından çapraz bağlanma ihtimali daha yüksek olur ve büyük komplekslerin oluşmasına daha uygun bir ortam oluşur. Antijen antikor miktarından belirgin olarak yüksek ise büyük komplekslerin oluşma ihtimali çok düşüktür ve teorik olarak oluşan komplekslerin minimum büyüklüğü  $\text{Ag}_2\text{Ab}$  şeklinde ifade edilir (Şekil 6.10).



Antijen/Antikor bağlanmasını etkileyen kimyasal faktörler sırasıyla iyonik türler, iyonik kuvvet ve polimerik moleküllerdir. İyonik türler ve iyonik kuvvet etkileri sonucunda, katyonik tuzlar katyonik haptentlerin antikorlar ile bağlanmasını baskılayıcı etki gösterir. Farklı katyonlar tarafından ortaya konan baskılayıcı etki sırasıyla  $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$  şeklindedir. Sıralama iyonik çapın azalması ve hidrasyon çapının artmasına karşılık gelmektedir. Anyonik haptentler ve anyonik tuzlar için sıralama  $\text{CNS}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$  şeklinde olup sıralama önceki durumla aynı olup iyonik çapın azalması ve hidrasyon çapının artmasını ifade etmektedir.

Özellikle düşük aviditeli antikorların varlığında, antijen ve antikor karışımına doğrusal polimerlerin ilavesi immun kompleks oluşum hızını önemli derecede artırır ve çökmesini çoğaltır. Dextran (D-glukozun yüksek molekül ağırlıklı polimeri), Polivinil alkol ve Polietilen glikol 6000 gibi moleküller örnek olarak verilebilir.

Polimerlerin istenen özellikleri; yüksek molekül ağırlığına sahip olması, doğrusallığının yüksek olması (dallanmanın en az olması), suda çözünürlüğün çok iyi olmasıdır. Polietilen glikol 6000 buna en iyi örnektir ve immunokimyasal yöntemlerde 3-5 g/dl civarında olması istenir.

## Kalitatif Yöntemler

Kalitatif amaçlı kullanılan başlıca immunokimyasal yöntemler pasif jel difüzyon, immunelektroforez ve Western blottur.

### Pasif Jel Difüzyon

Jel difüzyon testlerinde antijen antikor çökme reaksiyonları sıvı yerine jel ortamda şekillenir. Jelin farklı noktalarında kuyucuklar açılarak, bu noktalara antijen ve antikorlar ilave edilir. Osmoz ile jel boyunca ilerlerken açılan kuyucuk etrafında kendi seri sulandırılmalarını halkalar halinde oluştururlar. Agar içeren ortamda şekillenen difüzyon sırasında antijen ve antikoru miktarca eşit olduğu noktada çökme halkaları şekillenir. Jel difüzyon teknikleri aslında hem niteliksel hem de niceliksel olarak kullanılabilir. Oudin ve Ouchterlony tekniklerinde çoklu antijen ve antikor sistemleri niteliksel olarak tanımlanabilir. Radial Immunodifüzyon tekniğinde ise tek antijen ve antikor sistemi kullanılmakta ve niceliksel analiz mümkün olmaktadır.



### Oudin Jel Difüzyonu

Oudin Jel difüzyon sisteminde tek difüzyon-tek boyut sistemi kullanılmaktadır. Reaksiyona giren maddelerden biri (ör. antijen) agaroz jele dahil edilir. Jel sıvı halde iken şeffaf bir deney tüpüne aktarılır ve donması sağlanır. Bu işlemten sonra antikor solüsyonu (serum) jelin üst kısmına tatbik edilir. Antikor jelde diffüzyona uğrar ve ilerlerken konsantrasyonu azalır. Antikor ve antijenin konsantrasyonunun eşit olduğu noktada çökme görülür.

Bu teknikte jelin başlangıcı (üst kısmı) ve çökmenin olduğu nokta arasındaki mesafe alınarak ölçümler yapılabilir. Bilinmeyen örneğin değeri farklı düzeylerde hazırlanmış standartlar ile karşılaştırılarak niceliksel ölçümler yapılabilir.

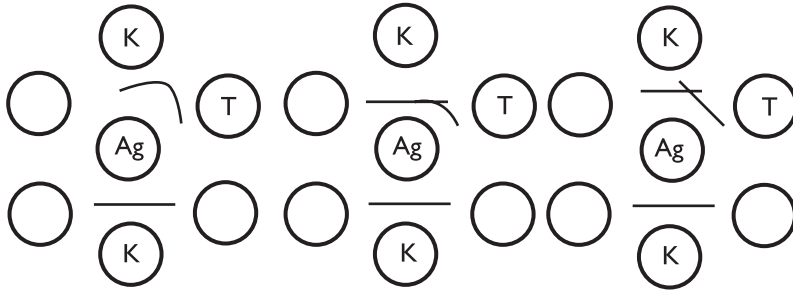
### Ouchterlony Tekniği

Çift difüzyon-çift boyut sistemi 1960 yılında Organ Ouchterlony tarafından geliştirilmiştir. Agaroz petride hazırlandıktan sonra petride önceki metodlarda olduğu gibi kuyucuklar açılır. Açılan kuyucuklar ya antijen ya da antikor çözeltisi ile doldurulur. Antijen ve antikorlar molekül büyüklüklerine oranla her yöne dağılmaya başlarlar. Karşılaştıkları optimum noktada çökme meydana gelir. Çökme çizgilerinin dikkatli incelenmesi çözeltide bulunan bireysel komponentlerin identifikasyonunu ve bir antijenin diğerleri ile ilişkisini ortaya koyabilir.

Çizgilerin yorumlanması çoklu antijen-antikor ilişkilerini ortaya koyabileceği gibi, oluşan mesafelerden antijen ve antikorun göreceli konsantrasyonunu belirlenebilir. Bunun yanında antijen-antikor arası oluşan reaksiyon özdeşlik, kısmi özdeşlik veya özdeş olmama hakkında bilgi sağlayabilir.

Şekil 6.11

İmmunodifüzyon reaksiyon tipleri



Özdeşlik

Kısmi Özdeşlik

Özdeş olmama

K=Kontrol

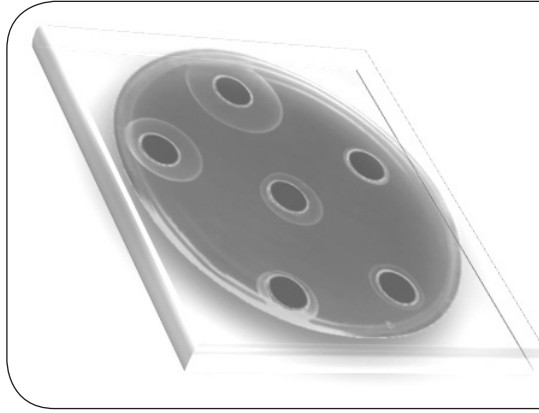
T=Test

Ag=Antijen

### Radial İmmunodifüzyon

Radial immuno-difüzyon tekniği tek difüzyon-çift boyut sistemidir. Reaksiyona giren maddelerden biri agarozda dahil edilir (ör: antikor) ve agarozun petri kabında donması sağlanır. Agarozda kuyucuklar açıldıktan sonra bu noktalara antijen tatbik edilir. Antijenin radial difüzyonu sonucu antijen ve antikor konsantrasyonunun eşitlendiği noktada çökme görülür. Dairenin çapı antijen konsantrasyonu

ile doğru orantılıdır. Örnekteki antijen miktarını belirlemek için, referans antijenin bir seri sulandırması yapılır ve bundan elde edilen zon çapları ile standart eğri elde edilir. Standart eğri için referans antijenin konsantrasyonlarına denk gelen çaplar yarı logaritmik kağıda aktarılır. Standart eğri örnek ile karşılaştırılarak örneğin miktarı elde edilmiş olur (Şekil 6.12).



**Şekil 6.12**

*Radial  
Immunodifüzyon  
testinin görünümü*

### Immunelektroforez

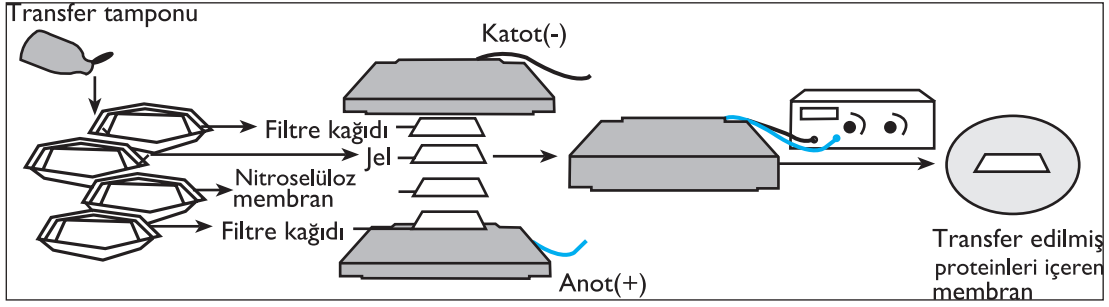
Proteinlerin elektroforez tekniği ile ayırımını takiben antikorlar ile reaksiyona girmesine dayanan biyokimyasal yöntemlere genel olarak immunelektroforez denilmektedir. Immunelektroforezin tüm çeşitleri immunglobulinlere yani antikorlara gereksinim duyar. Immunelektroforez tekniğinin geliştirilmesi 20. yüzyılın ikinci yarısına rastlamaktadır.

Immunelektroforez tekniklerin günümüzde kullanımını, iki önemli neden sınırlamıştır. İlk neden yoğun işgücüne ve ileri düzey el pratiğine gereksinimi olmasıdır. İkinci önemli neden ise yüksek miktarda poliklonal antikor kullanımına gereksinim göstermesidir. Günümüzde jel elektroforezi takiben immunofiksasyon testi (Western blot) kolaylığı, hassasiyetinin yüksek oluşu ve az miktarda antikora gereksinim duyulması gibi nedenler ile daha çok tercih edilmeye başlanmıştır.

### Immunofiksasyon Testi (Western Blot)

Klinik uygulamalarda immunofiksasyon testi belirli anijene karşı antikorun varlığını göstermede kullanılmaktadır. Bu teknik aynı zamanda apolipoprotein E (apoE) gibi spesifik proteinlerin tespitinde de kullanılmaktadır.

Metot üç aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada uygun destek ortamında (Ör: agaroz, poliakrilamid) antijen karışımının elektroforezi gerçekleştirilir. Önceden tarif edildiği gibi elektroforezdeki ayırım yük-kütle oranına dayanmaktadır. Elektroforez tamamlandıktan sonra destek ortamı nitrosellüloz veya PVDF tabanlı membran ile temas haline getirilir. İkinci elektroforez işlemi ile proteinler destek ortamından alınarak membrana aktarılır. Bu özel filtreler proteinleri geri dönüşümsüz olarak bağlar. Daha sonra membran protein çözeltisi ile muamele edilerek serbest olan tüm bölgelerin proteinle kaplanması sağlanır. Bloklama adı verilen bu aşamanın önemi bir sonraki basamakta ilave edilecek olan antikorun özgül olmayan şekilde bağlanmasını engellemektir. İlgilenilen proteine özgü antikor çözeltisi veya hasta serumu ilave edildikten sonra belirli bir süre inkübasyona tabii tutulan membran yıkanır. Yıkama aşamasında bağlı olmayan antikorlar uzaklaştırılmış olur. Bu aşamadan sonra ilk antikora karşı spesifiteye sahip işaretli antikor ilave edilir. İlave edilen ikinci antikor önceden oluşan antijen-antikor kompleksini göstermekte kullanılmaktadır. Kullanılan ikinci antikor enzim işaretleli ise uygun substrat ilave edilerek antijen-antikor kompleksi gösterilmiş olmaktadır (Şekil 6.13).

**Şekil 6.13***Western blot tekniğinin şematik olarak gösterilmesi*

## ELISA

Enzimle işaretli antijen ya da antikorun serbest antijen ya da antikor ile reaksiyona girmesi ve oluşan antijen antikor kompleksinin enzim aktivitesinin enzime spesifik substrat varlığında ortaya konması esasına dayanan ölçüm tekniğidir.

Test polistren mikrotitrasyon plakalarında gerçekleştirilir. Plakalarda yer alan kuyucukları kaplamada antijen veya antikor çözeltileri kullanılır. İncelenen örnekler bu kuyucuklarda inkübe edilerek antijen-antikor kompleksi şekillenmesi sağlanır. Yıkama işleminin ardından enzimle işaretli antijen veya antikor ilave edilir. İşaretlemede kullanılan enzime özgü substratın ilavesi sonucu reaksiyon şekillenmesiyle elde edilen renkli ürünlerin absorpsansı ölçülerek aranan antijen veya antikorun miktarı belirlenmiştir olur.

ELISA çeşitleri iki grupta incelenebilmektedir.

1. Yarışmalı teknikler
  - a) Antijen-enzim konjugatını kullanan teknik
  - b) Antikor-enzim konjugatını kullanan teknik
2. Yarışmalı olmayan teknikler
  - a) Çift antikor sandviç tekniği
  - b) Modifiye çift antikor sandviç tekniği
  - c) İndirekt teknik

## Yarışmalı ELISA Teknikleri

### Antijen-Enzim Konjugatını Kullanan Teknik

Bu teknik enzimle işaretli antijen ile standart ya da örnek antijeninin katı faza kaplı sınırlı sayıda antikora bağlanmak üzere yarışmaya girmesi esasına dayanan bir tekniktir. Enzimle işaretli antijenin antikora bağlanması serbest antijen tarafından engellenir. Oluşan rengin şiddeti örnekte aranan antijen miktarı ile ters orantılıdır.

### Antikor-Enzim Konjugatı Kullanan Teknik

Teknik enzimle işaretli antikor ile standart ya da örnek antikorunun katı faza kaplı sınırlı sayıda antijene bağlanmak üzere yarışmaya girmesi esasına dayanır. İşaretli antikorun antijene bağlanması standart ya da test antikoru tarafından yarışmalı olarak engellenir. Oluşan rengin şiddeti test antikorunun konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

## Yarışmalı Olmayan ELISA Teknikleri

### Çift Antikor Sandviç Tekniği

Teknikte iki antikor kullanılmaktadır ve ikinci antikor enzimle işaretlenmiştir. İlk antikor ile katı faz kaplanmaktadır. Örnek ilavesinden sonra antijen antikor kompleksi oluşması sağlanır ve ardından işaretli antikor ilave edilir. En son substrat ilave edilerek renk oluşumu gerçekleştirilir. Oluşan rengin şiddeti test antijeninin konsantrasyonu ile orantılıdır.

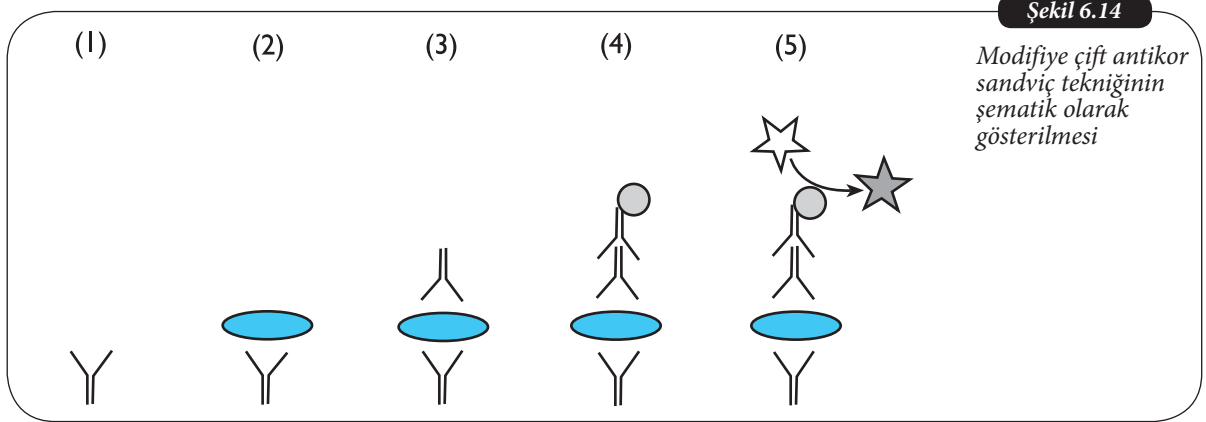
### Modifiye Çift Antikor Sandviç Tekniği

Bu teknikte kullanılan ikinci antikor enzimle işaretli değildir. Buna karşı elde edilmiş üçüncü bir antikor kullanılmaktadır. Katı fazı kaplamada kullanılan antikor ile ikinci antikor farklı türden hayvanlardan elde edilmiş enzimle işaretli üçüncü antikorun katı fazdaki antikora bağlanması bu şekilde önlenmiş olur. Oluşan renkli ürünlerin şiddeti doğrudan test antijeninin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Çift antikor sandviç tekniğinin diğer yarışmalı antijen-enzim konjugatı kullanan tekniğe avantajı ne olabilir?



SIRA SİZDE



### İndirekt Teknik

Antikor düzeyinin belirlenmesine yönelik bir tekniktir. Teknikte katı faza kaplanmış antijen ve test edilecek antikora karşı elde edilmiş ikinci bir antikor kullanılır. Oluşan rengin şiddeti test antikorunun konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Her test gibi tüm aşamaları titizlikle sürdürülmesi gerekli bir test olan ELISA'da sonuçların hassasiyeti üzerine en etkili basamak yıkama aşamasıdır. Ortamda serbest olarak bulunmasına rağmen yetersiz yıkama sonucu uzaklaştırılmayan konjugat hatalı yüksek veya pozitif sonuçlara neden olacaktır.



DİKKAT

## RADYOKİMYASAL TEKNİKLER

Radyoimmunoassay (RIA) ile 50 çeşitten fazla analitin ölçümü yapılmaktadır. RIA terimi, izotopların kullanıldığı her analiz için yanlış olarak kullanılmaktadır. Aslında bunlar radyoligand yöntem adı altında toplanmaktadır. Radyoligand yöntemlere örnek vermek gerekirse;

1. Radyoimmun yöntem (RIA)
2. Immunoradimetrik yöntem (IRMA)
3. Yarışmalı (kompetitif) protein bağlama (CPB) yöntemi
4. Radyoreseptör analizi
5. Radyoenzimatik yöntem

başlıcalarıdır.

RIA, bir izotopla işaretli antijenin, işaretlenmemiş antijenle yarışmaya girerek antikorla bağlanmasına dayanır. IRMA yönteminde ise işaretli antijen yerine, saf-laştırılmış ve işaretlenmiş antikör kullanılmaktadır. CPB, belirli bir antikör yeri-ne belirli bir hormon veya hormon sınıfına özgül affinitesi olan doğal plazma pro-teinleri (genellikle immunglobulin haricindeki globulinler tercih edilir) kullanılır.

Hormonlar, en fazla analizin yapıldığı alandır. Peptid ve steroid hormonlar hem konsantrasyon hem de büyüklük yönünden RIA için en uygun analitlerdir. Bunların yanında proteinler, ilaçlar, vitaminler ve diğer çeşitli maddelerin ölçü-münde de kullanılmaktadır.

RIA ile bir maddenin ölçülebilmesi için o madde immunojenik, saflaştırılabil-ir ve radyoaktif izotopla işaretlenebilir olmalıdır. Radyoaktivitenin ölçümünde çeşitli cihazlardan faydalanılır. Ölçümün temeli radyasyon enerjisinin elektrik sinyaline dönüştürülmesidir.

Radyasyon dedektörlerinden gaz iyonizasyon dedektörleri, yüklü parçacıkların ucuz olarak ölçümüne uygun olup g ve x ışınlarının tutulması için elverişsizdir. Sintilasyon dedektörleri, b ve g radyasyon ölçümü için uygundur. Katı hal dedek-törler ise x ve g radyasyon ölçümü için kullanılmaktadır. Beta ışınlarının ölçül-mesi için sıvı organik sintilatörler kullanılırken, gama ışınlarının ölçülmesi için kristal inorganik sintilatörler tercih edilmektedir.

### Likit Sintilasyon Cihazı

Likit sintilasyon cihazı beta ışınlarını yayan izotopları ölçmek için kullanılmak-tadır. b-ışınması yapan ve sık kullanılan izotoplara örnek olarak  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  ve  $^{22}\text{P}$  verilebilir.

Likit sintilasyon örneği, uygun çözücü ile karışım halinde bulunan aktif mad-de ve sintilasyon kokteylinin içeriğinde bulunan sintilatörden meydana gelmiştir. Okzalo türevleri, toluen ve naftalin gibi organik bileşikler örneğe ilave edilir. Bu çözeltiye sintilasyon kokteyli denir. Çözeltide b tanecikleri ancak kısa mesafele-re gidebilirler ve enerjilerinin bir kısmını sintilasyon kokteylindeki moleküllere taşırlar. Uyarılan sintilatör moleküller aktarılan bu enerjiyi ışık enerjisi şeklinde tekrar yayarlar. Bu ışık enerjisi farklı aşamalardan geçerek elektriksel impuls-lara dönüştürülür.

### Gama Sayaçları

Gama sayaçlarının temel çalışma prensibi sıvı sintilasyon cihazlarına benzer. Gamma ışınlarının görülebilir ışın-lara dönüştürülmesi amacıyla talyum içeren NaI kristalleri kullanılır. Kristal tarafından soğurulan g ışınları talyumla aktive edilmiş NaI tarafından fotonlara dönüştürülür. Bu fotonlar sezium elementinden

üretilmiş katottaki ışığa duyarlı yüzey tarafından alınır ve absorbe edilen ışık fotonlarının sayısıyla orantılı olarak akım üretilir.

## POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Moleküler biyoloji ile uğraşan kişilerin polimeraz zincir reaksiyonunun prensibini öğrendiklerinde tepkileri “Aslında ne kadar basit! Daha önce neden düşünülmemiş?” olmuştur. Aslında PCR tekniğinde kullanılan ayıraçların ağırlıklı kısmını gündelik kullanılan moleküler biyoloji ayıraçları oluşturur. Bu teknik sayesinde DNA molekülünün belirlenen bir bölümü çok fazla sayıda kopyalanır. Reaksiyon başlangıcında kalıp DNA molekülü çok düşük konsantrasyonda iken reaksiyonun ilerleyen aşamalarında dramatik olarak artar. Bir önceki siklusta ürün olarak meydana gelen DNA parçası bir sonraki aşamada kalıp görevi yapar. Reaksiyon esnasında kullanılan primer ve dNTP gibi moleküllerin derişimi fazla değişim göstermez iken DNA polimeraz sınırlayıcı faktör olarak karşımıza çıkar. Isı ve pH da çok önemli değişiklikler şekillendiğinden moleküler etkileşim açısından dramatik dalgalanmalar oluşabilmektedir. Bu nedenle, polimeraz zincir reaksiyonu kompleks işlem olmasına rağmen DNA manipölasyonu ve analizi için azımsanmayacak katkı ve çok yönlülük sağlar.

PCR tekniğinin keşfinin ardından, geçen çok kısa süre içerisinde moleküler biyoloji alanında, devrim şeklinde nitelendirilebilecek değişimler görölmüştür. PCR sayesinde biyolojik ve medikal alanda genlerin ve genomun incelenmesinde hızlı değişimler elde edilmiştir. PCR sayesinde herhangi bir organizmaya ait ilgilenilen gen izole edilebilir. Bu teknik genom dizisi çalışmalarının temel taşı oluşturarak, hem DNA dizisinin belirlenmesinde hem de gen ve gen ürünlerinin yüksek verimlilikle incelenmesini sağlamaktadır.

PCR tekniği DNA molekülünü deney tüpünde kopyalarken doğal DNA sentezine ve çoğaltma işlemine ait elemanları kullanır. Canlı hücrede tüm genomun kopyalanması, farklı birçok proteini kapsayan karmaşık sistem tarafından yürütülür. Basit olarak ifade edilmek istenirse DNA'nın her iki iplikçiği birbirinden ayrılır ve her iki ana iplikçik kopyalama için şablon vazifesi görür. Kopyalama, Watson ve Crick tarafından ortaya konan baz eşleşmesi kuralına dayanmaktadır. Bu kurala göre Adenin (A) her zaman Timin (T) ile Guanin (G) ise Sitozin (C) eşleşir. Bu nedenle şablon iplikçik tamamlayıcı DNA iplikçiğinin baz dizisini tanımlar. DNA polimeraz tarafından DNA sentezlenmesi için kullanılan yol göstericiye **primer** denilir ve bu ortalama 20 bazdan oluşan sentetik DNA dizisidir. DNA polimeraz enzimi primerin serbest kalan 3-OH ucuna baz eşleşme kuralına uygun olarak nükleotidleri ilave eder.

## Özet



*Elektroforezi tanımlamak ve elektroforez teorisini açıklamak.*

Destekleyici ortamda; iyonların veya makromoleküllerin, elektromotif güç (EMF) altında göç etmesi olayı elektroforez olarak tanımlanmaktadır. Agaroz ve poliakrilamid en sık kullanılan destek ortamlarıdır. Makromoleküller, matrikste büyüklük, yük dağılımı ve yapı özelliklerine göre ayrılır. Proteinler matriksten büyüklük, yapı ve yük dağılımı özelliklerine göre ayrılır. Genel olarak nükleik asitler, jelde büyüklüklerine göre ayrılır. Nükleik asitlerin baz kompozisyonu ve diziliminin ayırım üzerine etkisi pek yoktur. Eğer ayrılan moleküllerin kütle/yük (m/z) oranı sabit ise ayırım büyük oranda kütle faktörüne dayanır. Buna örnek olarak proteinlerin SDS-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile ayırımı verilebilir. Elektroforez sırasında voltaj veya akım sabit tutulur. Buharlaşmanın artması ve direncin düşmesi gibi olayları en aza indirmek için voltaj yerine akım sabit tutulmalıdır.



*Kromatografi hakkında bilgi vermek, sabit faz ve hareketli faz terimlerini açıklayabilmek.*

Maddelerin, hareketli bir faz yani çözücü madde yardımıyla sabit bir faz üzerinden değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Bu teknik sayesinde birbirinden ayrılmaları zor olan maddeleri saf olarak elde etmek dahi mümkündür. Kromatografi cam, metal veya buna benzer silindirik hacimler içinde gerçekleştirilir. Hacim ince veya gözenekli bir katı ile boşluk kalmayacak şekilde doldurulur. Dolgu maddesi sabit faz olarak adlandırılır ve sabit faz üzerine bağlanmış fonksiyonel gruplar yer alır. Sistem ya bu haliyle kullanılır ya da bu katı faza sıvı emdirilir. Eğer sıvı faz sabit sıvı faz emdirilirse bu sıvı da sabit faz gibi kullanılır. Yukarıda adı geçen gözenekli sabit fazın yerini özel olarak yapılmış kalın süzgeç kağıtları veya cam levha üzerine sabitlenmiş silika gibi toz halinde maddelerden meydana gelmiş ince bir tabakada alabilir. Bu tekniğe ince tabaka kromatografisi adı verilir.



*Immunokimyasal tekniklerde kullanılan antijen, antikor, haptan, monoklonal ve poliklonal gibi terimleri tanımlamak.*

Konak için yabancı olup; girdiğinde antikor cevabı oluşturan, antikor ile invitro ve invivo koşullarda reaksiyona giren kimyasal maddelere antijen denir. Bir antijene karşı üretilen ve onunla bağlanma yeteneğine sahip glikoprotein ise antikor adını alır. Kendisi antikor oluşturmayan ama mevcut antikorlar ile özgül olarak birleşen saf polisakkarit veya lipid moleküller ise haptendir. Taşıyıcı proteinler ile birleştiklerinde antijenik özellik kazanırlar. Monoklonal antikorlar, tek tip plazma hücresi tarafından üretilen ve ilgili antijenin sadece bir tek antijenik bölgesine (epitop) bağlanma yeteneğine sahip glikoproteinlerdir. Antijenin konağa verilmesi sonucu aynı antijenin farklı epitoplarına karşı farklı plazma hücreleri tarafından sentezlenen heterojen antikor karışımına poliklonal antikor denilmektedir.



*Immunoassayların temel prensiplerini açıklamak.*

Immunotayin (immunoassay), kompleks karışım içinde bulunan bir analitin varlığı veya miktarını belirlemeye yarayan testtir. Serum veya idrar gibi biyolojik sıvılarda yer alan analitlerin ölçümü için immunotayin yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu testlerde, sadece bir veya çok sınırlı kapsamda yer alan moleküle karşı bağlanma yeteneğine sahip antikorlar kullanılmaktadır. Antikora bağlanan molekül ise antijen olarak tanımlanmaktadır. Immunotayin yöntemleri ya antijen (Ör. Hepatit B virusu antijeni) ya da antikor (Hepatit B virusuna karşı şekillenen atikor) düzeylerini belirlemeye yönelik olarak hazırlanabilir. Her iki durumda da; testin özgüllüğü, ilgilenilen moleküle karşı kullanılan bağlayıcı molekülün eşine bağlanırken diğer arzu edilmeyen molekülleri ne derece ayırt edebildiğine bağlıdır. Özgüllüğün yanında doğru ölçüm için affinitesi ve aviditesi yüksek moleküller kullanılmalıdır.



## Kendimizi Sınavalım

1. I. Molekül büyüklüğü  
II. Molekülün çapı  
III. Kullanılan tamponun akışkanlığı  
IV. Molekülün net yükü  
V. Destek materyalinin gözenek çapı

Yukarıdaki faktörlerden hangilerinin elektroforetik hareket üzerine etkisi doğru orantılıdır?

- a. Yalnız I
- b. Yalnız II
- c. Yalnız III
- d. I ve III
- e. IV ve V

2. Aşağıdakilerden hangisi elektroforezde destek materyali olarak **kullanılmaz**?

- a. Nişasta Jel
- b. Selüloz Asetat
- c. Kağıt
- d. Agaroz
- e. Seramik levha

3. Aşağıdaki kromatografi tekniklerinden hangisi analitleri moleküler büyüklük yönünden ayırmakta kullanılır?

- a. Affinite
- b. İyon değişim
- c. Jel Filtrasyon
- d. Soğurma
- e. Partisyon

4. Aşağıdaki ilişkilerden hangisi, analitin, affinite kromatografi tekniği ile analizini mümkün **kılmaz**?

- a. Enzim-Substrat
- b. Asit-Baz
- c. Antijen-Antikor
- d. Protein-Karbonhidrat
- e. Hormon-Reseptör

5. Aşağıdaki hücrelerden hangisinin lenfositler ile füzyonu sonucu ölümsüz hücre hattı elde edilerek monoklonal antikorlar üretmek mümkün olmaktadır?

- a. Myeloma hücreleri
- b. Hepatositler
- c. Eritrositler
- d. Schwann hücreleri
- e. Monositler

6. I. Selüloz Asetat  
II. Nitrosellüloz  
III. Kağıt  
IV. PVDF

Yukarıdakilerden hangisi Western-Blot tekniğinde membran (protein transfer ortamı) olarak kullanılabilir?

- a. Yalnız I
- b. Yalnız II
- c. Yalnız III
- d. Yalnız IV
- e. II ve IV

7. Aşağıdakilerden maddelerden hangisine ELISA testinde gereksinim **duyulmaz**?

- a. Antijen
- b. Antikor
- c. Enzim
- d. Radyoaktif Antikor
- e. Substrat

8. Polimeraz zincir reaksiyonunda **ana** hedef nedir?

- a. Belirli bir DNA bölgesinin kopyalanıp çoğaltılması
- b. Belirli bir DNA bölgesinin çöktürülerek izolasyonu
- c. Belirli bir DNA bölgesinin parçalanarak yıkımlanması
- d. Belirli bir DNA bölgesinin ifadesinin sağlanması
- e. Belirli bir DNA bölgesinin ifadesinin baskılanması

9. Antijen-Antikor reaksiyonlarında ortama doğrusal polimerlerin ilavesi ne sağlar?

- a. Oluşan kompleksin çökmesini
- b. Kompleks oluşum hızının artmasını
- c. Oluşan kompleksin büyümesini
- d. Antijen-Antikor bağlanma özgüllüğünün artmasını
- e. Hiçbiri

10. I. Elektroforez  
II. PCR  
III. ELISA  
IV. Western-Blot  
V. Affinite kromatografi

Antijen-Antikor ilişkisi yukarıdaki tekniklerden hangisinde yer almaktadır?

- a. Yalnız IV
- b. Yalnız V
- c. I ve II
- d. III ve IV
- e. III, IV ve V



## Kendimizi Sınyalım Yanıt Anahtarı

1. e Yanıtınız yanlış ise “Elektroforez” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
2. e Yanıtınız yanlış ise “Elektroforez” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
3. c Yanıtınız yanlış ise “Kromatografi” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
4. b Yanıtınız yanlış ise “Kromatografi” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
5. a Yanıtınız yanlış ise “İmmunokimyasal Teknikler” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
6. e Yanıtınız yanlış ise “İmmunokimyasal Teknikler” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
7. d Yanıtınız yanlış ise “İmmunokimyasal Teknikler” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
8. a Yanıtınız yanlış ise “Polimeraz Zincir Reaksiyonu” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
9. b Yanıtınız yanlış ise “İmmunokimyasal Teknikler” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.
10. e Yanıtınız yanlış ise “İmmunokimyasal Teknikler” bölümünü tekrar gözden geçiriniz.

## Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

### Sıra Sizde 1

Serum protein elektroforezinde, protein molekülleri yük/kütle oranına göre hareket etmektedir. Albumin, izoelektrik noktası en düşük proteinlerden biri olduğuna göre alkali ortamda en fazla negatif yüke sahip olacaktır. Molekül ağırlığı da en düşük protein olduğundan katot tarafına uygulandığında en uzağa giden protein yine albumin olacaktır.

### Sıra Sizde 2

İdrar gibi tuz ve mineral madde içeriği yüksek biyolojik sıvılar konsantre edildiğinde; proteinlerin yayında bu maddelerin de konsantrasyonu oldukça yüksek olacaktır. Bilindiği üzere tuzlar ve mineral iyonlar elektrik akımını oldukça iyi iletirler. Bunların örnekle birlikte destek ortamına uygulanması sonucu elektrik alanı dağılımında uniformite bozulacağından, jelde boyama sonrası artefaktlar görülebilir.

### Sıra Sizde 3

Kromatografide şartlar değiştirilmek istendiğinde ilk denemeler hareketli faz kompozisyonu üzerine yapılmalıdır. Sıralama kullanıcıya veya kullanılan maddelele ilgili olup denemeler şu başlıklar halinde özetlenebilir:

- pH değişikliğine neden olan maddelerin konsantrasyonunun veya türünün (Ör: TFA yerine Formik asit) değiştirilmesi
  - Organik çözücü konsantrasyonu veya türünün değiştirilmesi
  - Kolon uygulanan ısının (çalışma ısısı) değiştirilmesi
- Ancak yukarıdaki denemeler sonuç vermediğinde kolon tipi değiştirilebilir.

### Sıra Sizde 4

Boyut dışlama (Jel Filtrasyon) kromatografi tekniği kullanarak proteinlerin molekül büyüklüğü yönünden ayrılması denenebilir. Gama globulinler en yüksek molekül ağırlığına sahip proteinler olduğundan kolonu ilk önce terk ederler. Bu nedenle ilk fraksiyonlar uzaklaştırılır. Geriye kalanlar orta ve düşük molekül ağırlıklı olduğundan bu fraksiyonlar toplanarak analizlerde kullanılır.

**Sıra Sizde 5**

Kasların, özellikle kalp kasının zedelenip zedelenmediğini anlamak, için myoglobin testi yapılmaktadır. Normalde kas dokusunda yer alan bu protein, harabiyet sonucu açığa çıkar ve kan dolaşımına katılır. Bilindiği üzere hemoglobin ve myoglobin proteinleri hem fonksiyonel hem de yapısal olarak benzerlikler gösterirler. Hemoglobin eritrosit içinde yer aldığından normal plazma veya serumda bulunmaz fakat örnek alınması ve taşınması sırasında meydana gelen olumsuzluklar eritrositin parçalanarak içeriğinin serum veya plazmaya sızması ile sonuçlanabilir. Bu nedenle seçilecek antikorun sadece myoglobine özgü olması yani hemoglobin ile çapraz reaksiyon vermediğine emin olunması gerekmektedir.

**Sıra Sizde 6**

Proteinlerin niceliksel analizinde sandviç ELISA testi "Altın Standart" olarak kabul edilmektedir. Bu test iki özgül antikorun varlığına dayanan oldukça özgül testtir. ELISA kuyucuklarına tespit edilmiş yakalayıcı (capture) antikor testin spesifitesini sağlarken etkileşime neden olan diğer protein ve benzeri moleküllerin ortamdaki yıkılarak uzaklaştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. İkinci antikor ise testin hassasiyeti üzerinde etkilidir. Bu tip ELISA testleri serum, idrar tükürük ve benzeri pekçok karmaşık yapıya sahip örneklerde proteinlerin miktarca tayinini pg/ml düzeylerinde dahi mümkün kılmaktadır.

**Yararlanılan ve Başvurulabilecek Kaynaklar**

- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M. & Diker, K.S. (1994). *İmmunoloji*. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R. & Bruns, D.E. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. Saunders/Elsevier, St Louis.
- Durmaz, R. (Ed.). (2001). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Kozan Ofset, Ankara.
- Karagül, H., Altıntaş, A., Fidancı, U.R. & Sel, T. (2000). *Klinik Biyokimya*. Medisan Yayınevi, Ankara.
- McPherson, M.J. & Moller, S.G. (2006). *PCR*. Taylor & Francis, New York.