

ENZİM IMMUNO ASSAY'LERDE KONJUGASYON YÖNTEMLERİ (derleme)

Seyfullah HALİLOĞLU¹

Behiç SERPEK¹

Conjugation methods in the enzyme immunoassays

SUMMARY

Enzyme immunoassays have come a long way in a relatively short time. Not much more twenty years ago it was questioned whether their handling advantages over RIAs could outweigh their drawbacks. Today's EIAs measure haptens such as T3, T4 and steroids with as much sensitivity and reliability as any RIA.

The fragmentary nature of the information which has been derived from investigation heterology about conjugation methods on the performance of EIA's is such that it is impossible to draw hard and fast conclusions about their influence on assay sensitivity.

It is aimed in this article to give inform about enzymes which can be employed as labels in EIA and variations among conjugation methods.

KEY WORDS: Enzyme immunoassay, conjugation methods

GİRİŞ

İdeal bir konjugasyon yöntemi, pratik olması yanı sıra, enzim ve antikorun inaktivasyonuna sebep olmaksızın tayin edilebilir yapıda %100 konjugat verebilmeli ve oluşan bağlar stabil olmalıdır. Fakat günümüzde kullanılan konjugasyon yöntemlerinden hiçbiri bu şartlara tam uygun değildir. Bu nedenle konjugasyon yöntemi seçilirken, yapılacak olan immunoassay tipi, enzimin ve hormonun yapısı göz önünde tutulmalıdır. Örneğin Enzim Immuno Histochemistry (EIH)'da 1:1 oranında konjugat uygun görülürken, EIA'de aktivitelerinde herhangi bir kayıp olmaksızın oluşturulabilecek en yüksek enzim/antikor oranı tercih edilir (Tijssen 1992).

Bugüne kadar birçok konjugasyon yöntemi geliştirilmiş olmakla birlikte özellikle son 30 yılda protein kimyası üzerine yapılan çalışmalar bu konuda önemli adımlar atılmasını sağlamış ve polipeptit zincirden çıkan reaktif gruplara sahip aminoasit uzantılarının büyük öneme sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Konjugatın hazırlanmasında göz önüne alınan en önemli amino asitlerden birisi ϵ -amino reaktif grubuna sahip olan lizin' dir. Bu amaçla lizin' in

ÖZET

Enzim immunoassayler çok kısa sürede büyük mesafeler kat etmişlerdir. Çok değil, bundan yirmi yıl önce, enzim immunoassaylerin RIA'e göre önemli üstünlüklerinin olup olmadığı sorulurken, bugün EIA'lerle T3, T4 ve steroidler gibi haptener, herhangi bir RIA'dan daha hassas ve güvenilir şekilde ölçülebilmektedir.

Enzim immunoassaylerin uygulamasında konjugasyon yöntemleri konusundaki çok sayıda araştırmalardan elde edilen bilgilerin düzensizliği, assay hassasiyeti üzerine bu yöntemlerin etkileri hakkında kesin ve hızlı sonuçların alınmasını imkansız kılmaktadır.

Bu makalede EIA'lerde işaretleyici olarak kullanılabilen enzimler ve konjugasyon yöntemleri arasındaki farklılıklar hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER : Enzim immunoassay, konjugasyon yöntemleri

yanı sıra farklı reaktif gruplara sahip olan ve aşağıda verilen bir dizi aminoasit de kullanılabilir (Sauer ve ark 1982).

Aminoasit

Asparajin, Glutamin
Arjinin, Histidin, Lizin, Triptofan
Aspartik asit, Glutamik asit
Serin, Treonin
Tirozin
Sistein

Reaktif Grubu

Amid
Amino, İmino
Karboksil
Hidroksil
Fenolik
Tiyol

Bir kısım proteinler amino asit yan zincirleri yanında potansiyel olarak reaktif oligosakkarit grubuna da sahiptirler (örneğin Horse Radish Peroksidaz (HRPO)) ve oligosakkaritler proteinlere genellikle serin ve treonin'deki OH grupları ile ve sialik asitin sonuna amino şekerler oluşturarak bağlanırlar (Sauer ve ark 1982).

Genel olarak konjugasyon yöntemleri 3 grupta incelenebilir: **Kimyasal işaretleme (markeleme)** ile yapılan konjugasyonlar en sık kullanılan yöntemler arasındadır. Özgün kimyasal işaretleme yöntemleri gün geçtikçe daha da modifiye edilmekte ve konjugasyonda meydana gelebilecek olası sakıncalar en aza indirilebilmektedir. İkinci tip konjugasyon;

birbirlerine karşı affinite gösteren avidin-biotin gibi **yardımcı moleküller**'in kullanıldığı yöntemdir ve metodik açıdan kimyasal konjugasyon yöntemleri içinde de sayılabilir. Örneğin, enzim ve immün reaktiften herhangi biri biotinile edilir ve avidin ya da streptavidin gibi bağlayıcı bir molekülle bağlanır. **İmmunolojik konjugasyon** olarak bilinen üçüncü tip konjugasyonda enzim aktivitesinde kayıp olmaksızın uygun bir enzimle, anti-enzim antikorun reaksiyonu söz konusudur. Enzim-antikor konjugatı daha sonra anti-IgG maddeler aracılığıyla immün komplekslere bağlanır. Peroksidaz anti-Peroksidaz (PAP) komplekslerinin oluşumu bu tip konjugasyona iyi bir örnektir. EIA'de tracer olarak kullanılabilir de özellikle EIH'de geniş kullanım alanları bulmuştur (Tijssen 1992).

Kimyasal konjugasyonda konjugasyon kalitesini etkileyen birçok faktör vardır:

-Konjuge edilecek moleküllerin konsantrasyonları (kütlenin etkisi yasası); Konjugasyon yöntemlerinde göz ardı edilmesine karşın reaktiflerin uygun konsantrasyonlarında kaliteli bir konjugasyonun gerçekleşeceği unutulmamalıdır. Örneğin protein konsantrasyonunun 5 mg/ml'den 1 mg/ml'ye düşürülmesi, aynı miktarda konjugat oluşturulabilmesi için inkubasyon periyodunun 25 kez artırılmasını gerektirir. Bu nedenle proteinlerin yüksek konsantrasyonları inkubasyon süresinin kısaltılması açısından önemlidir (Tijssen 1992). Aynı zamanda konjuge edilecek iki molekülün molar konsantrasyon oranı da konjugat oluşumunda önem taşır.

Düşük protein konsantrasyonlarında ortaya çıkan bir başka sakınca relatif olarak intramoleküler bağların intermoleküler bağlardan daha fazla olmasıdır. Bu durum proteinlerin biyolojik fonksiyonlarının inaktivasyonunu artırır ve bu sakınca inkubasyon süresinin uzatılmasıyla giderilmeye çalışılır (Tijssen 1992).

-Protein molekülünün amino asit içeriği: Bazı proteinler, oldukça az miktarda reaktif gruba sahip aminoasit içerirler. Bu tür proteinlerin ilginç bir örneğini, yapısındaki izotiyosyanattan dolayı az sayıda amino grubu içeren HRPO oluşturur ve glutaraldehidle reaksiyon oranı IgG' den daha düşüktür (Sauer ve ark 1982).

-Reaksiyon yeteneğinde olan amino asit yan zincirlerinin molekül içinde gizlenmesi: Belirsiz ve gizlenmiş yan zincirler çapraz reaksiyona giremezler. Buna karşın karbonhidrat yan zincirleri büyük bir hacme sahip olduklarından kolaylıkla reaksiyona girerler ve konjugasyonda bir avantaj oluştururlar (Sauer ve ark 1982).

Enzim veya proteinlerin kimyasal konjugasyon işlemi sırasında co-conjugation adı verilen, aynı tür moleküllerin kendi aralarında konjugat oluşturmaları gibi istenmeyen durumlar gelişebilir (Doel ve Collen 1982). EIA'de enzimatik olarak aktif olmayan polimerler, immünolojik reaksiyonlarda düşük konjugat oluşumuna neden olabilirler. Büyük polimerler, daha büyük antikor ve

enzimatik aktivite içermeye olasılarına sahip olsalar da, sterik faktörler ve kimyasal modifikasyonlar sonucu gelişen polimerizasyon artışı aktivite kaybına yol açabilir. Büyük polimerlerin oluşumu, reaktivitesi yüksek proteinin konsantrasyonunun düşürülmesiyle sınırlandırılabilir.

-Tampon çözeltilerin saflığı ve komponentlerinin çapraz bağlayıcı ajanlarla reaktivitesi; Tampon seçimi de özenle yapılmalıdır. Primer ve sekonder amino grubu içeren tamponlarda gruplar üzerinden konjugasyon oluşabildiğinden, α -ve ϵ -amino grupları üzerinden konjuge edilecek proteinlerin konjugasyonlarında bu tür tamponların kullanılması sakıncalıdır (Sauer ve ark 1982). Ayrıca konjuge edilecek proteinlerin iyonik güçlerinin farklı, kullanılan tamponun gücünün de bu güçlerin arasında olması uygundur (Tijssen 1992).

Bağlayıcı ajanların aktivitesi için de tamponlar önemlidir. Örneğin proteinlerin serbest amino grupları ile Bis (4-floro-3-nitrofenil)-sülfon(FNPS)' nin reaksiyonu pH 10.5'de gerçekleştirilebilir. Glutaraldehitte konjugasyon için seçilen pH'dan daha yüksek derecelerde de iyi sonuçlar alınabilmesine karşın, glikoproteinlerin periodat tarafından aktivasyonu pH'ya bağımlıdır ve optimum pH 4.0-5.0 civarındadır.

-Biyolojik aktivite için gerekli grupların korunması; Konjugasyonda kullanılan moleküllerin bazı grupları antikor spesifitesi için önemli olabilir ve bu tür grupların konjugasyondan etkilenmesi önlenmelidir.

Ayrıca iki molekülle çapraz-bağlayıcı ajanın relatif reaksiyon oranı ve çapraz-bağlayıcı ajanların etkili konsantrasyonları da konjugasyon oranı açısından önemlidir.

Tek ve Çift Basamaklı Yöntemler

Konjugasyonda kullanılan bağlayıcı reaktifin yapısına göre tek ya da çift basamaklı konjugasyon yöntemleri uygulanabilir.

Tek basamaklı konjugasyon yönteminde kovalent bir şekilde bağlanacak olan iki komponent bağlayıcı ajanla birlikte karıştırılırken; çift basamaklı konjugasyon yönteminde, birinci basamakta iki komponentten sadece biri bağlayıcı ajanla reaksiyona girilir ve artan çapraz bağlayıcı ajanın uzaklaştırılmasından sonra ikinci komponente ilave edilir (Clark ve Engvall 1980, Otto ve ark 1973).

Bir basamaklı konjugasyon yönteminde karşılaşılan en önemli problemlerden biri, konjuge edilecek molekülün birinin yetersizliğinde, diğer moleküllerin kendi aralarında polimerize olmasıdır. Örneğin Horse Radish Peroksidaz (HRPO) ve IgG'nin konjugasyonunda polimerizasyon gelişir ve HRPO-IgG konjugatından çok daha fazla IgG polimerleri oluşur (Sauer ve ark 1982).

En az 2 reaktif gruba sahip olan çapraz-bağlayıcı ajanlar homobifonksiyonel ve heterobifonksiyonel reaktifler olmak üzere iki grup altında incelenebilirler.

Homobifonksiyonal reaktiflerde reaktif gruplar aynı iken, heterobifonksiyonal reaktiflerde farklıdır ve bu nedenle her bir grup farklı şartlarda reaksiyona girer. Teorik olarak heterobifonksiyonal reaktifler konjugasyonun daha iyi kontrol edilmesini sağlarlar. Bazı homobifonksiyonal reaktifler, konjugasyon basamağı şartlarında bir değişiklik gerektiğinde ya da moleküllerin birinin kross bağlayıcıyla reaktivitesinin düşük olduğu hallerde çift basamaklı yöntemlerde de kullanılabilirler. Bütün bunların yanı sıra homobifonksiyonal reaktifler, enzimler ve diğer proteinlerin (antijen, antikor gibi) ilavesinden sonra çapraz bağlayıcılarla direkt reaksiyon verebiliyorlarsa tek basamaklı prosedürlerde kullanılırlar. Bir basamaklı yöntemlerin konjugatların yapı ve büyüklüğü üzerindeki kontrolleri zayıftır (Doel ve Collen 1982).

Konjugasyon Yöntemleri ve Çapraz Bağlayıcı Reaktifler:

Glutaraldehyd (GA) ve GA Konjugasyon Yöntemi

Bazı proteinlerle oldukça etkili ve basit bir konjugasyon gerçekleştirilebildiğinden yaygın bir şekilde kullanılan glutaraldehyd ile hem tek basamaklı hem de çift basamaklı konjugasyon yöntemleri gerçekleştirilebilir (Otto ve ark 1973, Tijssen 1992) (Şekil 1).

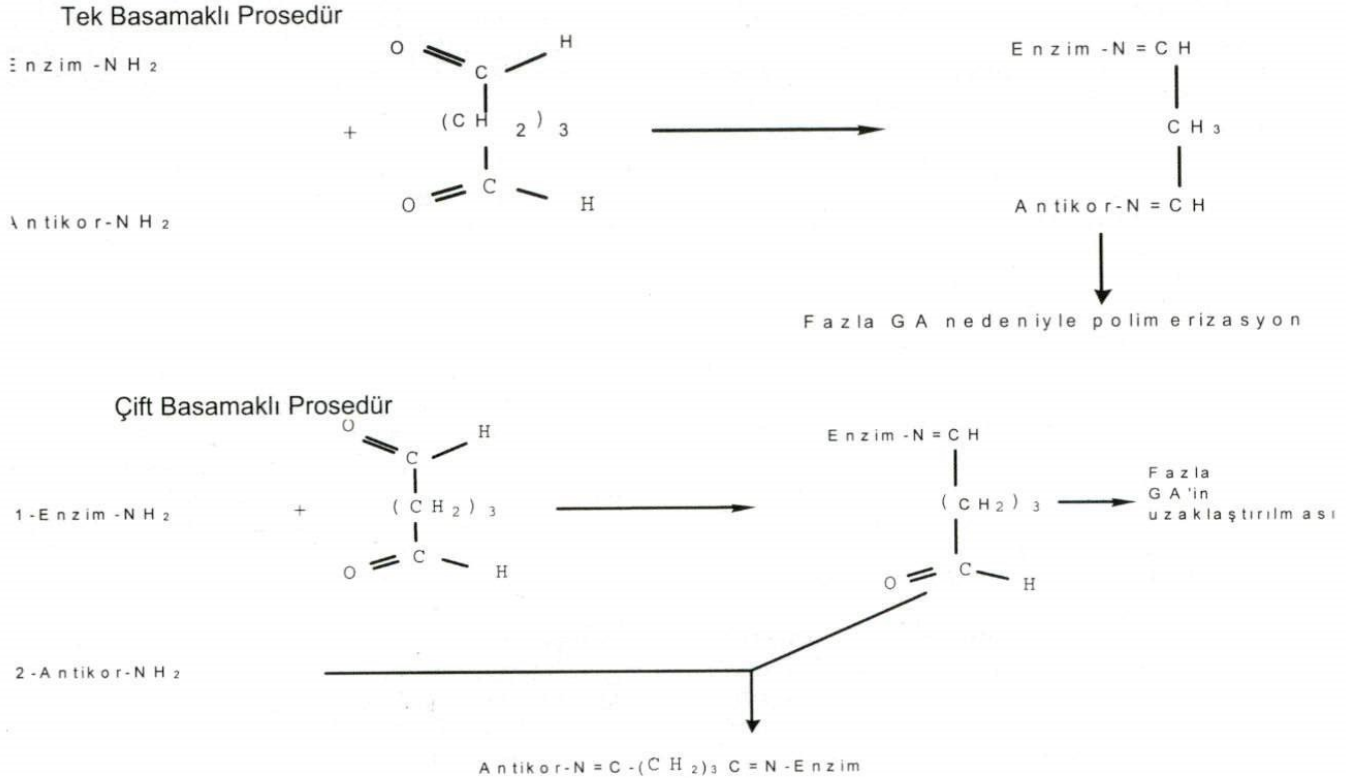
Glutaraldehyd'le konjugasyonda sağlanan konsantrasyon (% 0.01-8), inkubasyon süresi (1-24

saat) ve ısı (4-25 °C) gibi reaksiyon kriterlerinde konjuge edilecek moleküle göre değiştirilebilir. Glutaraldehyd oda ısısında hidrat formunda bir dialdehidir. Lizin'in ε-amino grubuyla irreversible olarak reaksiyona girerek şif baz oluşturur. Oluşan bağ hidrolize karşı stabildir (Sauer ve ark 1982).

Glutaraldehyd-protein reaksiyonu, pH'nın 7'nin üzerine çıkarılması, ısı ve glutaraldehyd konsantrasyonunun artırılması ile iyileştirilebilir. Glutaraldehyd ve protein konsantrasyonunun dengeli olması durumunda, dayanıklı intermoleküler çapraz bağlar kurulur (Sauer ve ark 1982, Tijssen 1992). Glutaraldehyd konsantrasyonu yanısıra protein moleküllerindeki reaktif grupların sayısı da agregat oluşum kapasitesini etkiler (Otto ve ark 1973). Fakat kontrol dışı polimerlerin oluşumu konjugatların enzimatik ve antikor aktivitesinde düşmeye yol açar (Tijssen 1992).

Guesdon ve Avrameas (1983) immun serumun yeterli miktarlarda bulunmadığı hallerde antikor BSA'ya bağladıktan sonra, enzimle işaretlemişler ve en verimli işaretlemenin %0.1'lik GA konsantrasyonunda elde edildiğini saptamışlardır.

Bu yöntemlerde, kalan aktive edilmiş grupların bloklanması ve depolama sırasında agregat oluşumunu önlemek amacıyla bir miktar L-lizin ilavesi yapılır. Otto ve ark. (1973) ferritin ve IgG' nin, GA'le konjugasyonunda çift basamaklı yöntemle üretilen konjugatların tek basamaklı



Şekil 1. Bir ve İki Basamaklı Glutaraldehyd Yöntemi.

yöntemle üretilenlerden daha stabil ve iyi çözünür olduğunu saptamışlardır.

Konjugatlarda immun reaktifin, %5'i ve peroksidazın ancak %1'i tekrar elde edilebildiğinden tek basamaklı glutaraldehyd konjugasyon yöntemi pek önerilmez. Buna karşın AP_{ase}'lerle etkisi çok iyi, GOase ile orta derecede bir bağlama gerçekleştirilirken, 0.3 mmol glutaraldehyd içeren ortamlarda laktoperoksidaz'ın protein moleküllerine bağlanma oranı %60-70 kadardır (Tijssen 1992).

Periodat Şif Baz Oluşumu

Glikoproteinler için çok etkili ve kullanışlı bir kimyasal konjugasyon yöntemidir. İlk kez Nakane ve Kawaoi (1974) tarafından Horse Radish Peroksidaz (HRPO)'ın IgG'ye konjugasyonunda kullanılan yöntem, günümüzde amiloglikozidaz, glikoz oksidaz gibi glikoprotein yapısındaki enzimler için de kullanılmaktadır (Tijssen 1992).

Glutaraldehyd (GA) yöntemiyle karşılaştırıldığında, konjugatların daha geniş spektrum verdiği ve daha fazla ürün oluştuğu gözlenmiştir (Schrenk Körzinger 1986), ayrıca ölçülme oranının (detectabilite) 5 kez daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Tijssen 1992). Bu avantajlarıyla EIA ve immunoperoksidaz yöntemlerinin geliştirilmesinde büyük rol oynamıştır (Sauer ve ark 1982, Tijssen 1992).

Orjinal Periodat Yöntemi'nde peroksidazın bütün amino gruplarına 1,floro-2,4,dinitrobenzen (FDNB, Sanger's Reaktif) bağlanarak enzim moleküllerinin kendi aralarında birleşmeleri önlenir. Daha sonra enzimin karbonhidrat kısmı NaO₄ (sodyum periodat) ile oksitlenir. HRPO' daki yaklaşık %18'lik karbonhidrat kısmı enzim aktivitesi üzerinde etkili olmadığından, oksidasyonla enzim aktivitesinde kayıp söz konusu değildir. Oksidasyonla oluşturulan yeni aldehid ve karboksil gruplarından, aldehid grupları proteinin serbest amino gruplarıyla bağlanarak 'Şif baz' oluşturur. Bu bağ stabil değildir. Bağın dayanıklı hale getirilmesi NaBH₄ (Sodyum Borohidrid) ile redüksiyonla sağlanır. Bu yöntemle her IgG molekülüne 5-6 POase konjuge edilebilmekte ve IgG'nin %99'u, POase'ın %70'i konjugasyonda kullanılmaktadır.

Karbonhidrat kısmı enzim aktivitesi üzerine etkili olmamasına karşın, oksidasyonun çok fazla ilerlemesi enzim aktivitesini etkiler. Ayrıca ileri dereceli bir oksidasyon, kromatografik ayırmalarda problemler yaratan polimerlerin oluşumunu kolaylaştırır. Periodat konsantrasyonunun artmasıyla peroksidazın üçüncül yapısında değişim görülür ve bunu izleyerek enzim inaktive olur. Oksidasyon derecesi üzerine periodat konsantrasyonu yanı sıra, ışık (işlem karanlıkta yürütülmelidir), çözeltinin pH'sı (optimal pH 3.0-5.0) ve bidistile suyun kalitesi (okside edici maddelerle kontamine olmamalıdır) etkilidir (Tijssen 1992).

Diğer çapraz bağlayıcı reaktifler arasında N-hidroksisüksinimidil-m-maleimidobenzoat (HSMB), p-

Benzikinin (PBQ), N,N'-o-Fenilendimaleimid (OPDM), İzosiyanatlar ve Toluene diizosiyanat (TDIC) sayılabilir (Tijssen 1992).

Steroid Hormonların Konjugasyonu:

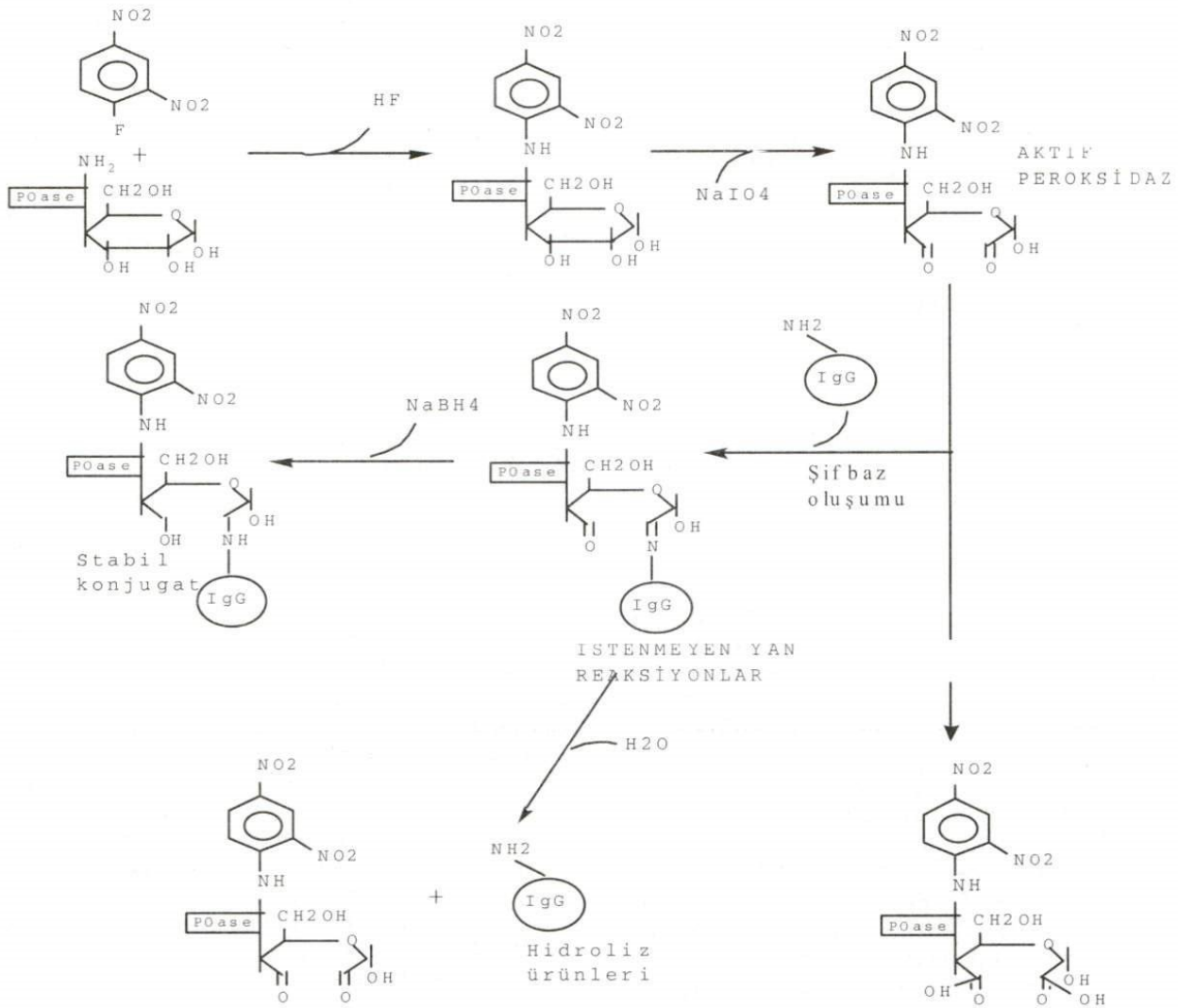
Steroid hormonların konjugasyon yöntemlerinin incelenmesinden önce hatalı kullanımlara yol açan immunojen ve antijen terimleri arasındaki farklılığın açıklığa kavuşturulması zorunludur. **Immunojenler**, bir hayvana enjekte edildiğinde immun yanıt oluşturabilen, **antijenler** ise antikora spesifik olarak bağlanabilen maddelerdir. Aslında bütün immunojenler kendilerine karşı oluşturulan antikorlara bağlanabildiklerinden aynı zamanda antijendirler. Fakat tüm antijenler vücuda verildiklerinde antikor oluşumunu aktive edemezler. Bu durumun en güzel örneği steroid hormonlarda görülür. Serbest steroid hormonlar canlı bir organizmaya enjekte edildiklerinde antikor oluşumunu uyarmamalarına karşın, bir protein-steroid konjugatına karşı oluşturulan antikora yüksek bir affiniteyle bağlanırlar. Bu nedenle, serbest steroidler bir antijen olmalarına karşın, immunojen değildirler (Pratt 1978).

Protein hormonlar büyük moleküler yapı, immunojenik özelliğe sahip maddelerdir. Moleküler ağırlığı 1000'in altında olan moleküllerin çoğunun immunolojik özellikleri yoktur ve **haptan** olarak isimlendirilirler. Steroid hormonlar ve prostoglandinler de daha küçük moleküler ağırlığa sahip olduklarından (yaklaşık 300-400), immunojenik değildirler. Immunoassaylerin uygulanabilmesi için bu tür maddelere immunojenik nitelik kazandırılması zorunludur. Bu işlem, küçük moleküler ağırlıklı bir maddenin (steroid), büyük moleküler ağırlıklı (bovine serum albumine,BSA) bir moleküle bağlanması ile yapılabilir ve bağlanma sırasında her bir protein molekülüne karşı en az 10-20 hormon molekülü reaksiyona girmelidir (Kaneko 1989, Rowley ve ark 1975).

Haptanlar oldukça farklı aktif gruplara sahip olan maddelerdir. Bu gruplar konjugasyonda kullanılabilir, ancak konjugasyonda kullanılan aktif grupların kaybı nedeniyle anti-haptan antikorlara bağlanmada spesifikite kaybı söz konusudur (Murphy 1967). Bu nedenle haptanların belirli esterleri kullanılır.

Kimyasal konjugasyonda sözü edilen etkili birçok faktörün yanı sıra haptanların konjugasyonunda, haptanın stabilitesi, çözünürlüğü ve konjugasyon için kullanılacak grubun yapısı dikkate alınmalıdır (Tijssen 1992). Hosoda ve ark.(1986) steroid hormon immunoassaylerinde enzimle işaretlemeye kullanılan bağlayıcı bölgenin (köprü) uzunluğunun da hassasiyeti etkilediğini ve daha kısa köprünün hassasiyeti artırdığını belirlemişlerdir.

Tüm bu faktörler yanı sıra antiserum üretimi için taşıyıcı maddenin seçimi de büyük önem taşır. En çok kullanılan taşıyıcılar çeşitli hayvan türlerinin serum albuminleridir. Sentetik polipeptitler ve homolog proteinler steroidler için etkili bir taşıyıcı değildirler. Bu amaçla en çok kullanılan taşıyıcı



Şekil 2. Orjinal Periodat Yöntemiyle Peroksidazın IgG'ye direkt konjugasyonu

protein sığır serum albumini (BSA)'dir. Genelde sığır serum albumininin kullanılmasının nedeni reaksiyon için gerekli organik solventlerin denatürasyonuna karşı dayanıklılığıdır (Guesdon ve Avrameas 1983). Keza aynı amaçla sığır thyroglobulini, sığır γ -globulini de kullanılmaktadır. Aynı immunojenin farklı gruplarının etkisinin değişken olması ve yine aynı immunojene farklı bireylerin gösterdiği reaksiyonun büyük varyasyonlar göstermesi sonucu hayvan türlerinde protein taşıyıcılarının etkisinin sistematik bir karşılaştırmasının yapılması hemen hemen olanaksızdır (Pratt 1978).

Haptenlerin proteinlere bağlanması proteinlerin ε - ve α - amino, fenolik, sülfidril, imidazol ve karboksil gibi, aktif grupları üzerinden gerçekleştirilir. Uygulanan tekniklerin gelişimi protein kimyasındaki gelişmelerle paralellik gösterir. Kullanılan reaktifler asile, alkile, okside ve redükte edici ve elektrofilik reaktifler olarak gruplandırılabilirler (Tijssen 1992).

Asile edici reaktiflerin genel formülü $R-C(=O)X$ 'dir ve karboksil gruplarının aktivasyonu ile elde edilirler. Amino (deprotone lizin) ve hidroksil (tirozin) grupları ile öncelikle stabil türevler oluştururlarken, alkali ortamlarda sisteil ve histidil uzantılarıyla oluşan türevler stabil değildirler. Asetik ya da karışık anhidrid, N-hidroksi süksinimid esterleri (NHS) bu türevlerinin iyi birer örneğidirler. Anhidridler hızlı bir şekilde hidrolize olduklarından, asilasyon reaktifin hidroliziyle yarış halindedir.

Hafif alkali ortamlarda (pH 7-8.5) kullanılan alkile edici reaktiflerin en önemlileri ise N-etilmaleimid'in prototipi olan maleimidler ve DNFB ve TDIC gibi aril halojenleridir ve aynı şekilde hidroliz, alkilasyon reaksiyonu ile yarış halindedir.

Disülfidlerin oksidasyon ve redüksiyonlarını hızlandıran redoks reaksiyonları konjugasyonda çok nadir kullanılır. Elektrofilik reaktifler arasında da en iyi bilineni diazonium tuzlarıdır.

Çapraz bağlayıcı reaktifler hapten ve taşıyıcı

arasında oluşan köprünün yapısına göre de, (a) karboksil grubu (genelde haptin üzerindeki) ile amino gruplarının aktivasyonu, (b) iki amino grubu arasında köprü oluşumu ve (c) tirozil ve histidil uzantılarıyla azo bağlarının oluşumu şeklinde sınıflandırılabilir. Bu reaktiflerden en çok kullanılanı karboksil aktive edici reaktiflerdir (Tijssen 1992).

Haptinlerdeki karboksil ya da amino grupları, antikor spesifitesi için önem taşıyorsa, direkt konjugasyonda kullanılabilir. Fakat haptinlerde bu grupların immün reaksiyon sırasında tanınması gerektiğinden haptin türevlerinin sentezlenerek kullanılması daha uygundur.

Doğal steroid hormonlar hidroksil ya da keton grubu içerirler. Bu gruplar steroidlerin aktif grup taşıyan türevlerinin hazırlanmasında merkez olarak kullanılırlar. Bunun nedeni, hidroksil ya da keton gruplarının taşıyıcı proteinlerle kuvvetli peptit bağları oluşturamamalarıdır. Bu merkezlerde aktif türevler oluşturulması steroid hormon-protein konjugatındaki bağın dayanıklı kovalent bağdan oluşması zorunluluğudur. Aksi halde steroid protein konjugatındaki bağlanma *in vivo* olarak parçalanır ve immünojen kaybedilir (Direkt olarak steroidin OH ve CO grupları üzerinden bağlar zayıf bağ niteliğindedirler). Steroidlerde COOH içeren reaktiflerle aktivasyonda OH gruplarından hemisüksinat esterleri, keton gruplarından oxim (karboksimetil)'ler oluşturulur ve oluşan bu aktif gruplar proteinlerde yer alan amino gruplarıyla kuvvetli kovalent bağ niteliğindeki peptit bağları oluşturarak proteinleri bağlarlar.

Karboksil grubu içeren veya karboksile edilebilen haptinlerin proteinlere konjugasyonunda en çok kullanılan yöntemler arasında karışık anhidrid yöntemi, karbodiimid yöntemi ve N, hidroksisüksinimid (NHS) ve p-nitrofenil ester yöntemleri sayılabilir.

Karbodiimid Yöntemi

Basit ve direkt bir yöntem olan **karışık anhidrid yöntemi**, testesteron ve kortizol'ün BSA'ya konjugasyonunda kullanılmıştır. Erlanger ve ark. (1957) steroidleri, proteinin lizin uzantılarına amid bağlarıyla bağlamışlar ve bu yöntem özellikle haptin-taşıyıcı konjugatlarının oluşturulmasında birçok araştırmacıyı yönlendirmiştir. Karışık anhidrid yönteminde haptinin karboksil grubu, proteinin amino grubuyla reaksiyona girebilen asid anhidride dönüştürülür. Bu dönüşüm haptene iso-butyl kloroformat ilavesiyle yapılır ve yöntem susuz ortamda (dimetil formamid'de, DMF) uygulandığı için enzimin ya da proteinin co-conjugation'u en alt düzeye indirilebilir (Doel ve Collen 1982). Enzim-haptin konjugasyonunda 1 mol enzim için genellikle 10-20 mol haptin kullanılır (Rowley ve ark 1975).

Şekil 3' de özellikle enzim steroid konjugasyonunda sıklıkla kullanılan karışık anhidrid yönteminin reaksiyon basamakları verilmiştir (Doel ve Collen 1982). En çok kullanılan yöntemlerden **karbodiimid yönteminde** konjugat verimi %20

kadardır ve enzim-haptin konjugasyonunda enzim molekülünün co-konjugasyonu bu yöntemin kullanılabilirliğini sınırlaması yanısıra karbodiimid reaktifinin sağlanmasındaki güçlük bu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır.

Genel formülasyonda karbodiimidler, ürenin N,N'-disubstitüe edilmiş anhidridleri olarak kabul edilirler: $R-N=C=N-R'$. R ve R' grupları alifatik veya aromatik, benzer ya da farklı yapıda olabilirler ve bu yapılar karbodiimidin çözünürlüğünü etkiler (Kurzer ve Dougraghi-Zadeh 1967).

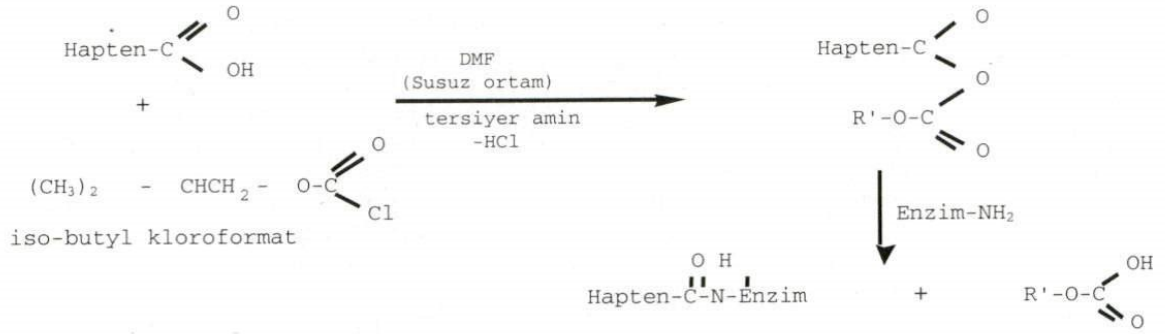
Protein hormonların konjugasyonunda da sıklıkla kullanılan karbodiimidlerin proteinlerle reaksiyonu tam olarak anlaşılammış olmasına karşın, bağ oluşumunun bir molekülün NH_2 ile diğer molekülün COOH grubu arasında olduğu ileri sürülmektedir.

Karbodiimid kullanılarak bir enzim molekülü ile haptin konjugasyonu Şekil 4' de formüle edilmiştir. Karbodiimid yönteminin bir diğer türü de **N-hidroksi suksinimid (NHS) ester ve p-nitrofenil (p-NP) ester** yöntemleridir. Haptinlerin ya da haptin türevlerinin aktif esterlerinin sentezi enzim-haptin konjugatlarının üretilmesinde en etkili ve uygun yöntemleri oluşturur. Bu yöntemin üstünlüğü sudan izole edilebilmesi, saflaştırılabilmesi nedeniyle sulu ve nötral pH'da enzimle konjugasyonda kullanılabilmesidir. Bu nitelik enzim denatürasyonunu ve co-conjugation olasılığını ortadan kaldırdığından yöntemin bir avantajı olarak kabul edilir. Yöntemde önce NHS, disikloheksil karbodiimide bağlanır ve NHS esteri oluşturulur. Oluşan NHS esteri ortamdan izole edilir ve ester, proteinlere amid bağı aracılığıyla bağlanır. Bu esterler kuru ortamlarda uzun zaman saklanabilir (Tijssen 1992).

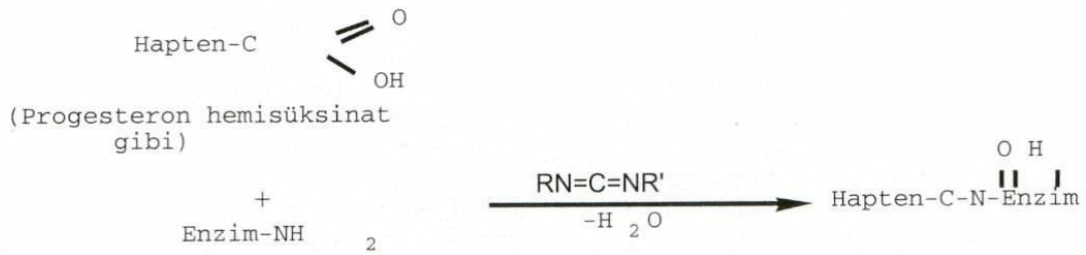
Bu tip aktif ester türevleri üzerinden, 11-deoksikortizolün β -Galaktozidaz, horse radish peroksidaz, glukoz oksidaz gibi enzimlere, testesteron türevlerinin ALP, Glukoz oksidaz ve Glukoz-6-fosfat dehidrogenaza, progesteron'un β -Galaktozidaz'a konjugasyonunda ve daha birçok hormonun enzimlere konjugasyonunun yanında avidin-biotin sistemi gibi yardımcı moleküller kullanılarak yapılan konjugasyonlarda da aktif esterler kullanılabilirler.

Konjugasyonda Yardımcı Moleküllerin

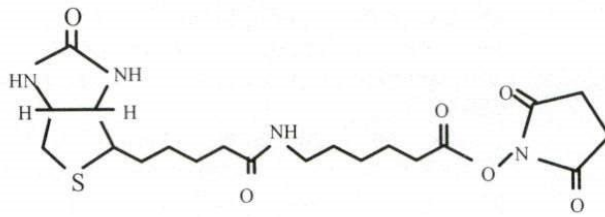
Kullanımı: Enzim immunoassaylerde, enzim ya da antijenin bağlanması için yardımcı moleküllerin de kullanılabileceği düşünülmüş ve bu amaçla en uygun yardımcı moleküllerin de birbirine çok yüksek bir affinite gösteren avidin ya da streptavidin ile biotin olduğu ortaya konmuştur. Biotin 244 molekül ağırlığında, suda çok iyi çözünen, yumurta akından elde edilen ve glikoprotein yapısındaki avidine ya da streptomyces avidinii'den kazanılan ve glikoprotein yapısında olmayan streptavidine çok yüksek bir affinite ile bağlanan bir maddedir. Kendall ve ark. (1983), 3 farklı EIA ve bir RIA tekniğiyle uygulamış oldukları testlerde en hassas sonuçları biotin-avidin sisteminde elde etmişlerdir.



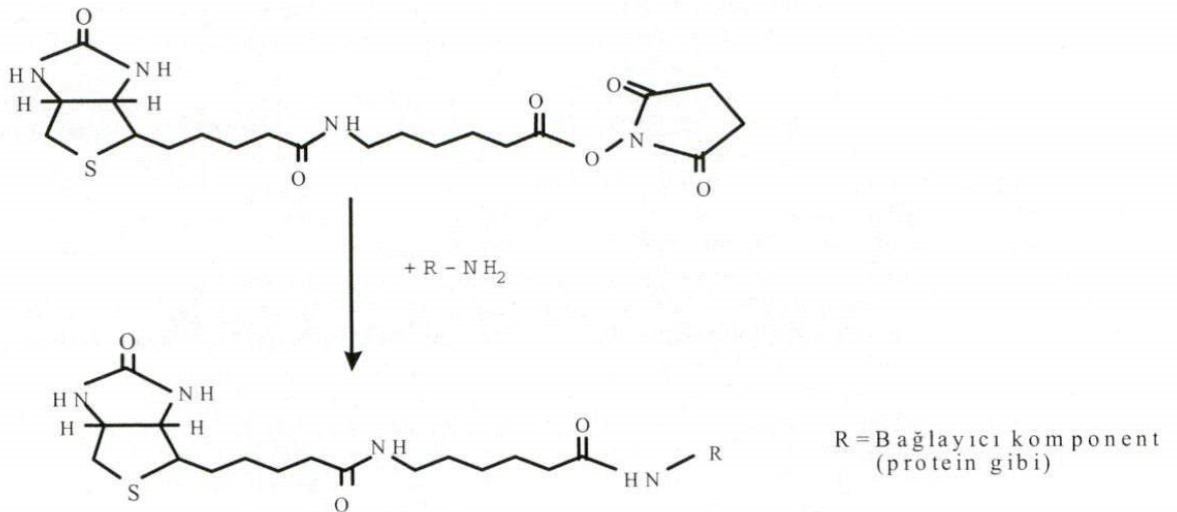
Şekil 3. Karışık Anhidrit Yöntemi.



Şekil 4. Karbodiimid Yöntemi.



Bu aktif ester aşağıda gösterilen karışık anhidrit prensibine göre protein molekülüne bağlanabilir.



Protein molekülüne biotin bağlanması irreversibl bir nitelik gösterir, her protein molekülü biotin için 4 bağlanma bölgesine sahiptir (Tijssen 1992). Bu amaçla biotinün aktif formu olan D-Biotinoyl-ε-amino caproic asit N-Hydroxy succinimide esteri (Biotin X – NHS) halinde üretilmektedir.

Vitamin yapısının yanısıra karboksilasyon reaksiyonlarında kullanılan enzimler için koenzim fonksiyonu olan biotin'in valerik asit yan zincirinin karboksil grubu enzimlerin lizin uzantılarının ε-amino grubuna bir amid bağı aracılığıyla bağlanır.

Avidinin de immün reaktiflerin birine direkt olarak konjuge edilebilmesine karşın, bu sistemin asıl avantajı avidin'in biotinle edilen enzim ve biotinle edilen immün reaktif arasında köprü olarak kullanılabilmesidir. Proteinlerle biotinilasyon işleminde amino gruplarına karşı yüksek aktiviteleri gösteren biotinil p-nitrofenil ester (BNP) ve biotinil N-hidroksi süksinimid (BNHS) esterleri daha çok kullanılır.

Biotinil-NHS esterleri, suda daha fazla eriyebildiklerinden kullanımları daha kolaydır fakat hidrolizi engellemek amacıyla kuru yerde muhafaza edilmesi zorunludur. Her iki ester de disikloheksil karbodiimidele hazırlanır. Konjugasyonda geniş ligantlar biotinün karboksil grubuna direkt olarak bağlanırsa avidinin biotinle reaksiyonu engellenebilir. Bu sakınca biotinün karboksil grubu ile NHS grubu arasına ε-amino kaproik asit gibi aracı (spacer) moleküllerin kullanımı ile önlenabilmektedir.

KAYNAKLAR

- Clark BR, Engvall E (1980) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects, In "Enzyme Immunoassay" Ed. E.T.Maggio, 8, 167-181, CRD Press, Florida.
- Doel TR, Collen T (1982) Chemical cross-linking and the preparation of conjugates for ELISA. In "The ELISA; Enzyme Linked Immunosorbent Assay in Veterinary Research and Diagnosis" Eds. Wardley RC, Crowther JR, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 22, 10-20.
- Erlanger BF, Borek F, Beiser SM, Lieberman S (1957) Steroid-protein conjugates I. Preparation and characterisation of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortizone, J. Biol. Chem., 228, 713-27.
- Guesdon JL, Avrameas S (1983) An amplification system using BSA-antibody conjugate for sensitive Enzyme Immunoassay, J. Immunol. Meth., 58, 133-42.
- Hosoda H, Kabayashi N, Ishii N, Nambara T (1986) Bridging phenomena in steroid immunoassay. The effect of bridge length on sensitivity in Enzyme Immunoassay. Chem. Pharm. Bull., 34, 5, 2105-11.
- Kaneko JJ (1989) "Clinical Biochemistry of Domestic Animals", 4th Ed., Acad. Press, San Diego.
- Kendall C, Matiu II, Dreesman GR (1983) Utilisation of avidin-biotin system to amplify the sensitivity of the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), J. Immunol. Meth., 56, 329-39.
- Kurzer F, Dougraghi-Zadeh K (1967) Advances in the chemistry of carbodiimides, Chem. Reviews, 67, 2, 107-52.
- Murphy BEP (1967) Some studies of protein binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein binding radioassay. J. Clin. Endoc. Metab., 27, 973-90.
- Nakane PK, Kawaoi A (1974) Peroxidase-labeled antibody, A new method of conjugation, J. Histochem. Cytochem., 22, 12, 1084-91.
- Otto H, Takamiya H, Vogt A (1973) A two-stage method for cross linking antibody globulin to ferritin by glutaraldehyde: Comparison between the one-stage and the two-stage method. J. Immunol. Meth., 3, 137-46.
- Pratt JJ (1978) Steroid immunoassay in clinical chemistry, (A review). Clin. Chem., 24, 11, 1869-90.
- Rowley GL, Rubenstein KE, Huisjen J, Ullman EF (1975) Metabolism by which antibody inhibit hapten-malate dehydrogenase conjugates, J. Biol. Chem., 250, 3759-66.
- Sauer MJ, Cookson AD, McDonalds BJ, Foulkes JA (1982) The use of enzyme immunoassay for the measurement of hormones with particular reference to the determination of progesterone in unextracted whole milk. In "The ELISA; Enzyme Linked Immunosorbent Assay in Veterinary Research and Diagnosis" Eds. Wardley RC, Crowther JR, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 22, 271-301.
- Schrenk WJ, Körzinger K (1986) Purpose-made enzyme conjugates for quantitative immunoassays, Med. Lab. Sci., 43, 269-76.
- Tijssen P (1992) Practice and Theory Of Enzyme Immunoassay, In "Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology" Eds. R.H. Burdon and P.H. Van Knippenberg, vol.15, Elsevier, Amsterdam.

DÜZELTME

Hayvancılık Araştırma Dergisi 10 (1-2) sayısı 43-46. sayfalarda yayınlanan "Anöstrüs Dönemindeki Koyunlarda Ovaryum Aktivitesinin Uyarılmasında PGF_{2α}'nın Etkisi" adlı makale yazarlarından Mehmet GÜRKAN'ın adı sehven Mehmet GÖKMEN olarak yazılmıştır.

Makalenin ilk sayfasının düzeltilmiş hali arka sayfada tekrar verilmiştir. Bu yazım hatasından ötürü özür dileriz. Saygılarımızla. **Yayın Kurulu.**