

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİNLERİN FLUORESANS MADDELER İLE
İŞARETLENMESİ

106214

Kimyager İbrahim E. ÖZYİĞİT

F.B.E Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

106214

Tez Danışmanı

: Doç.Dr. Huriye KUZU

Doç. Dr. İnci Akay

Prof. Dr. Mehmet Mustafa Akbulut

İSTANBUL, 2001

Doç. Dr. Huriye Kuz

Huriye

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON BİRİMİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iii
KISALTMA LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÇİZELGE LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK KISIM	2
2.1 Floresans Spektroskopisi.....	2
2.1.1 Ayna Görüntüsü.....	3
2.1.2 Stokes Kanunu.....	4
2.1.3 Floresansın Kuantum Verimi	4
2.2 Zaman-Çözümlü Floresans	4
2.2.1 Floresans Şiddeti-Zaman Grafiğinin Analizi	6
2.3 CD4 ve CD8 Antijenleri.....	7
2.4 Protein İşaretlenmesi.....	8
3. DENEYSEL KISIM	9
3.1 Fluoresein İzotiyosiyanat (FITC) ile BSA ve Monoklonal Antikor (Anti CD4, Anti CD8) ile İşaretleme	9
3.1.1 Materyal ve Yöntem	9
3.2 Pirenil İzotiyosiyanat (PITC) ile BSA ve Monoklonal Antikor (Anti CD 4) İşaretleme	10
3.2.1 Materyal ve Yöntem	10
4. DENEYSEL SONUÇLAR.....	13
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	46

SİMGE LİSTESİ

E_0	Elektronik enerji
E_v	Vibrasyonel enerji
E_r	Rotasyonel enerji
S_0	Temel hal
S_1	Uyarılmış singlet hal
s	Saniye
ns	Nanosaniye
ϕ	Kuantum verimi
I_f	Fluoresans şiddeti
I_a	Absorbsiyon şiddeti
kHz	Frekans birimi (kilohertz)
$L(t)$	Lamba "pulse"ı
$R(t)$	Fluoresans bozunması
$F(t)$	Respons fonksiyonu



KISALTMA LİSTESİ

TRES	Zaman ayırmalı fluoresans spektrumu (Time-resolved emission spectra)
TNS	2-toluidinil-6-naftalen sülfonik asit
FITC	Fluoresein izotiyosiyanat
BSA	Sığır serum albumin (Bovine Serum Albumine)
PITC	Pirenil izotiyosiyanat
DNA	Deoksiribonükleik asit
CD	Lemfosit yüzey antijeni (Clusters of differentiation)
Ig	İmmünoglobulin
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü (Human immuno deficiency virus)
NK	Öldürücü immün sistem hücresi (Natural killer cell)
UV	Morötesi ışın (Ultraviolet)
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate buffer solution)
Lys	Lizin amino asidi
Cys	Sistein amino asidi
DMSO	Dimetil sülfoksit
FL	Fluoresans bozunma (Fluorescence decay)



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Jablonski Diyagramı.....	3
Şekil 2.2	Fluoresans emisyonunda ayna görüntüsü.....	3
Şekil 2.3	Uyarılmayı takiben zaman aralıkları ile alınan spektrumlar.	4
Şekil 2.4	2-Anilinonaftalen ile işaretlenmiş fosfolipid kürecikleri ile alınan grafikler	5
Şekil 2.5	TNS işaretli fosfolipid küreciklerinin verdiği fluoresansın zamana bağlı olarak bozunması (Time-resolved decay). A: Lamba profili, B: Fluoresans bozunma profili.....	6
Şekil 4.1	Deneme 1F Fraksiyonları.....	14
Şekil 4.2	Deneme 2F Fraksiyonları.....	15
Şekil 4.3	Deneme 3F Fraksiyonları.....	16
Şekil 4.4	Deneme 4F Fraksiyonları.....	17
Şekil 4.5	Deneme 5F Fraksiyonları.....	18
Şekil 4.6	Deneme 6F Fraksiyonları.....	19
Şekil 4.7	Deneme 7F Fraksiyonları.....	20
Şekil 4.8	Deney 1 FITC-Anti CD4 Fraksiyonları.....	21
Şekil 4.9	Deney 2 FITC-Anti CD8 Fraksiyonları.....	22
Şekil 4.10	Deneme 1P Fraksiyonları.....	24
Şekil 4.11	Deneme 1P PITC-BSA (TRES).....	25
Şekil 4.12	Deneme 1P PITC-BSA (FL).....	26
Şekil 4.13	Deneme 2P Fraksiyonları.....	27
Şekil 4.14	Deneme 2P PITC-BSA (TRES).....	28
Şekil 4.15	Deneme 2P PITC-BSA (FL).....	29
Şekil 4.16	Deneme 3P Fraksiyonları.....	30
Şekil 4.17	Deneme 3P PITC-BSA (TRES).....	31
Şekil 4.18	Deneme 3P PITC-BSA (FL).....	32
Şekil 4.19	Deneme 4P Fraksiyonları.....	33
Şekil 4.20	Deneme 4P PITC-BSA (TRES).....	34
Şekil 4.21	Deneme 4P PITC-BSA (FL).....	35
Şekil 4.22	Deneme 5P Fraksiyonları.....	36
Şekil 4.23	Deneme 5P PITC-BSA (TRES).....	37
Şekil 4.24	Deneme 5P PITC-BSA (FL).....	38
Şekil 4.25	Deneme 6P Fraksiyonları.....	39
Şekil 4.26	Deneme 6P PITC-BSA (TRES).....	40
Şekil 4.27	Deneme 6P PITC-BSA (FL).....	41

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 4.1	Deneme 1F (FITC-BSA).....	14
Çizelge 4.2	Deneme 2F (FITC-BSA).....	15
Çizelge 4.3	Deneme 3F (FITC-BSA).....	16
Çizelge 4.4	Deneme 4F (FITC-BSA).....	17
Çizelge 4.5	Deneme 5F (FITC-BSA).....	18
Çizelge 4.6	Deneme 6F (FITC-BSA).....	19
Çizelge 4.7	Deneme 7F (FITC-BSA).....	20
Çizelge 4.8	Deney 1 FITC-Anti CD4.....	21
Çizelge 4.9	Deney 2 FITC-Anti CD8.....	22
Çizelge 4.10	Deneme 1P (PITC-BSA).....	24
Çizelge 4.11	Deneme 2P (PITC-BSA).....	27
Çizelge 4.12	Deneme 3P (PITC-BSA).....	30
Çizelge 4.13	Deneme 4P (PITC-BSA).....	33
Çizelge 4.14	Deneme 5P (PITC-BSA).....	36
Çizelge 4.15	Deneme 6P (PITC-BSA).....	39



ÖNSÖZ

Başta bu çalışmanın kurgusunu düzenleyen Sayın hocam Doç. Dr. Huriye KUZU'ya bana gösterdiği büyük destek ve ilgiden dolayı minnettar olduğumu belirtir ve sonsuz teşekkürler sunarım. Bize laboratuvar olanaklarını sunan İ.Ü. Tıp Fakültesi DETAM İmmunoloji Bilim Dalı çalışanlarından Sayın Dr. Gaye YILLAR, Msc. Sema BİLGİÇ ve Msc. Esin AKTAŞ'a ve ayrıca bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Günay YÜCE ile Uzman Neşe ATACI'ya teşekkürü borç bilirim.



ÖZET

Fluoresans madde ile işaretlenen antikolar, antijenler ve DNA oligonükleotidleri biyolojik maddelerin tayininde yer alan analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu fluoresans maddeler proteinlerin amino asit yan zincirlerine ya da oligonükleotidlere eklenen modifiye bazların özel gruplarına kovalent olarak bağlanmaktadır.

Bu çalışmada BSA'nın Fluoresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenme işlemi farklı reaksiyon koşullarında incelendi. Daha sonra, protein A kolonu ile saflaştırılan Anti-CD4 monoklonal antikoları FITC ile işaretlendi. Anti-CD8 antikor örneği için ön saflaştırma yapılmadı. Doğrudan FITC ile işaretleme gerçekleştirildi. İşaretli anti-CD8 antikolarının lenfosit yüzeyine bağlanması "flow-cytometry" ile gözlemlendi.

Ek olarak, BSA'nın pirenil izotiyosiyanat ile bağlanması incelendi. Anti-CD8 antikoları da bu madde ile işaretlendi. "Time-Master" spektrofotometre kullanılarak bu işaretli BSA ve antikoların fluoresans bozunma grafikleri ve zaman ayırmalı fluoresans spektrumları (TRES) alındı, fluoresans ömürleri hesaplandı.

ABSTRACT

Antibodies, antigens or DNA oligonucleotides labeled with fluorescent substances are widely used for the development of analytical methods applied for the determination of biological substances. These fluorescent substances have been bound covalently to amino acid residues of protein or to the special groups of the modified bases added to the oligonucleotide. Usually lysin residues are preferred for the labelling reactions.

In this work, the labeling of BSA with Fluorescein isothiocyanate (FITC) was studied in different reaction conditions. After BSA labeling, anti-CD4 monoclonal antibody purified by using protein A column was labeled with FITC. Anti-CD8 monoclonal antibody sampels were not purified directly labeled with FITC. The bounding to anti-CD8 antibodies of the lymphocyte surfaces were observed using Flow Cytometry.

In addition, the labeling of BSA with pyrenyl isothiocyanate was studied. Anti-CD8 antibodies were also labeled with this substance. Fluorescence decay, time-resolved emission spectra (TRES) of these labeled substances were obtained with Time Master Spectrofluorometer, and fluorescence lifetimes were calculated.

1. GİRİŞ

Biyolojik olarak aktif moleküllerin işaretlenmesi ve bunların özellikle kantitatif veya kalitatif tayin amaçlı kullanılması 1950 yılı öncesine kadar gitmektedir. Radyoaktif madde kullanarak antijen yada antikorların işaretlenmesi ve bunların kullanılması ile immüno­lojik kitlerin hazırlanması 1960 yılı ve sonrasında gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim ve fluoresans madde işaretli biyolojik moleküllerin kullanılması ile klinik tayinlerde kullanılan kitlerin geliştirilmesi konusu oldukça hız kazanmıştır. Çeşitli özellikte fluoresans maddeler işaretlemede kullanılmıştır. Uzun ömürlü fluoresans maddelerin işaretleme işleminde yer alması ve zaman ayırmalı fluoresans yöntemi ile ölçüme olanak sağlayan fluorometrelerin geliştirilmesi, çok hassas klinik kitlerinin hazırlanmasını gündeme getirmiştir. Fluoresans spektroskopisi özellikle biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında, birçok reaksiyonun izlenmesinde araştırma amaçlı olarak yer almaktadır. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmakta olan zaman-ayrım­lı fluoresans tekniği (Time-resolved fluorescence), emisyonun bozunma profilleri ve zamanı dikkate alan spektrumların alınmasına imkan sağlamaktadır. Böylece fluoresans ömrü hesaplanabildiği gibi, moleküller arası etkileşimler, solvent etkisi ve reaksiyonlar izlenebilmektedir.

Bu çalışmada fluoresein ve pirenilin tiyosiyanat grubu vasıtasıyla proteinlere bağlanması incelenmiştir. Fluoresein işaretli antikorun "flow cytometry" aletinde sonuç verdiği görülmüştür. Pirenil işaretli proteinler "Time Master" spektrofluorometre ile incelenmiştir.

2. TEORİK KISIM

2.1 Fluoresans Spektroskopisi

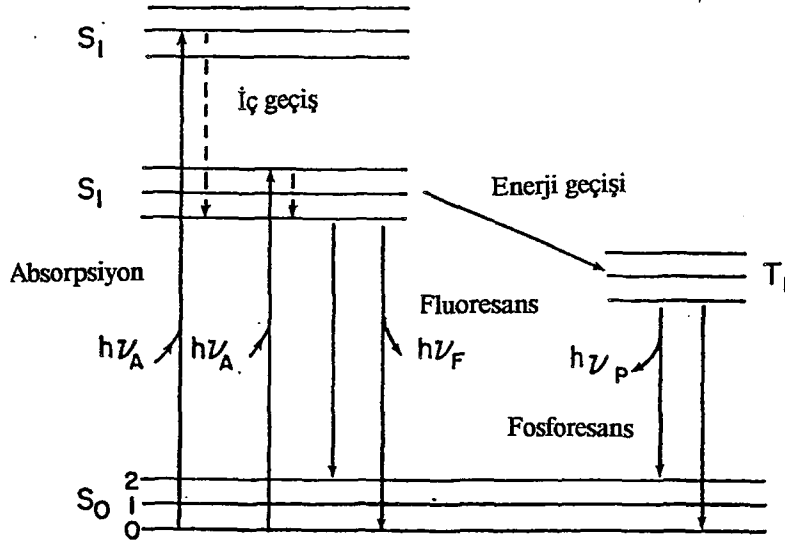
Bir molekülün enerjisi elektronik (E_e), vibrasyonel (E_v) ve rotasyonel (E_r) enerjilerin toplamından oluşmaktadır. Her bir elektronik enerji seviyesi bir seri vibrasyonel seviye bulundurmaktadır. Her bir vibrasyonel seviye de birbirine oldukça yakın olarak yer alan rotasyonel seviyeler içermektedir.

Genel bir kural olarak, oda sıcaklığında moleküllerin çoğunun temel elektronik halin en düşük vibrasyonel seviyelerinde bulunduğu kabul edilmektedir. Moleküler orbitalde spinleri antiparalel olarak yerleşmiş elektron çiftinin durumu singlet hal olarak adlandırılmaktadır. Bu elektronların spinlerinin paralel olduğu durum ise triplet hal şeklinde ifade edilmektedir.

Işık enerjisi absorblandığında temel hal S_0 'dan yukarı doğru enerji geçişleri meydana gelmektedir. Absorbsiyon spektrumunda birbirine çok yakın olarak yer alan rotasyonel seviyeler arası geçişler algılanamaz. Bazı moleküllerde vibrasyonel seviyelerin yerleşimi çok karmaşık değildir. Bu moleküllerdeki vibrasyonel seviyeler absorpsiyon spektrumunda bir seri maksimum noktası şeklinde izlenebilir.

Herhangi bir eksite halin üst vibrasyonel seviyelerinde bulunan bir molekül, fazla vibrasyonel enerjisini çevresindeki moleküller ile çarpışma sırasında verebilir. Bu işlem vibrasyonel relaksasyon olarak adlandırılmaktadır. Bir molekülün yüksek elektronik seviyenin düşük vibrasyonel seviyesinden düşük elektronik seviyesinin üst vibrasyonel seviyelerine geçişi ise 'iç geçiş' (vibrational relaxation) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.1). Kural olarak molekül en düşük uyarılmış hal S_1 'in, en düşük vibrasyonel seviyesine düşer. S_1 uyarılmış halde kalma süresi (lifetime of S_1 state) 10^{-9} saniye iken daha üst seviyelerde 10^{-12} saniye olmaktadır.

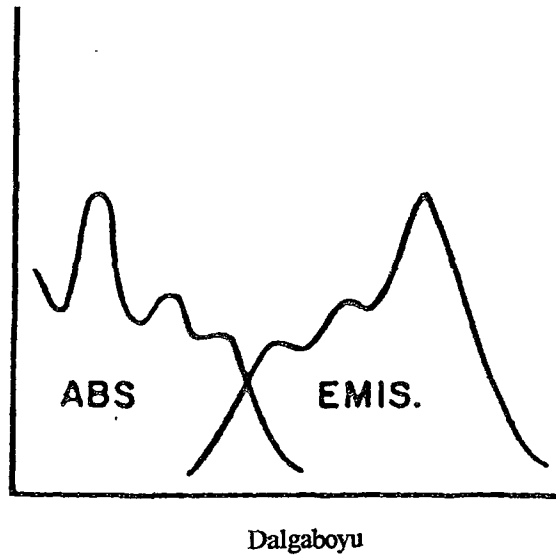
Uyarılmış singlet hal S_1 'in en düşük vibrasyonel seviyesinden temel hal S_0 'ın herhangi vibrasyonel-rotasyonel seviyelerine geçişte verilen emisyon fluoresans olarak adlandırılmaktadır. Triplet halden temel singlet hale geçişte oluşan emisyon fosforesans denir (Şekil 2.1). Fluoresans maddenin uyarılmış halde kalma süresi fluoresans ömrü (lifetime) şeklinde isimlendirilmektedir. Emisyonun yüksek hızda gerçekleştiği fluoresansta ömür 10^{-8} s - 10ns kadardır. Fosforesansta emisyon daha kısa sürede gerçekleşmekte ve ömür milisaniye düzeyinde olmaktadır.



Şekil 2.1 Jablonski Diyagramı

2.1.1 Ayna Görüntüsü

Bir molekülün absorpsiyon spektrumu elektronik olarak uyarılmış halin vibrasyonel seviyelerini, emisyon spektrumu ise temel halin vibrasyonel seviyelerini yansıtmaktadır. Genellikle elektronik uyarma vibrasyonel seviyelerin yerleşim durumunu değiştirmedeğinden, emisyon spektrumu molekülün absorpsiyon spektrumunun ayna görüntüsüne çok yakındır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Fluoresans emisyonunda ayna görüntüsü

2.1.2 Stokes Kanunu

Enerjide meydana gelen kayıp nedeniyle, fluoresansın dalga boyu uyarıcı ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür.

Buhar fazındaki atomlar hariç, absorpsiyona göre emisyonunda daima daha düşük dalga boylarına doğru bir kayma izlenir. Bu durum ilk defa 1852 yılında Stokes tarafından izlendiği için 'Stokes shift' adını almıştır. Solvent etkisi ve uyarılmış halde gerçekleşen reaksiyonlar nedeniyle Stokes shift daha büyük ölçüde gerçekleşebilir.

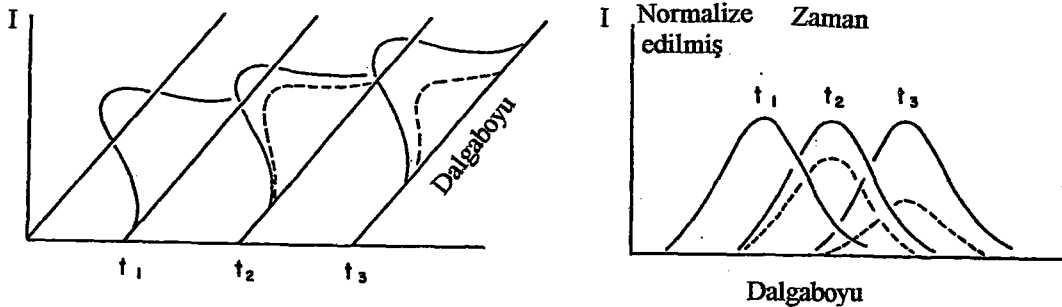
2.1.3 Fluoresansın Kuantum Verimi

Birim zamanda, 'steady-state' rejimde sistemin yayınladığı foton sayısının absorbladığı foton sayısına oranına denir (Lakowich, 1986; Demchenko, 2000).

$$\phi = I_f / I_a \quad (2.1)$$

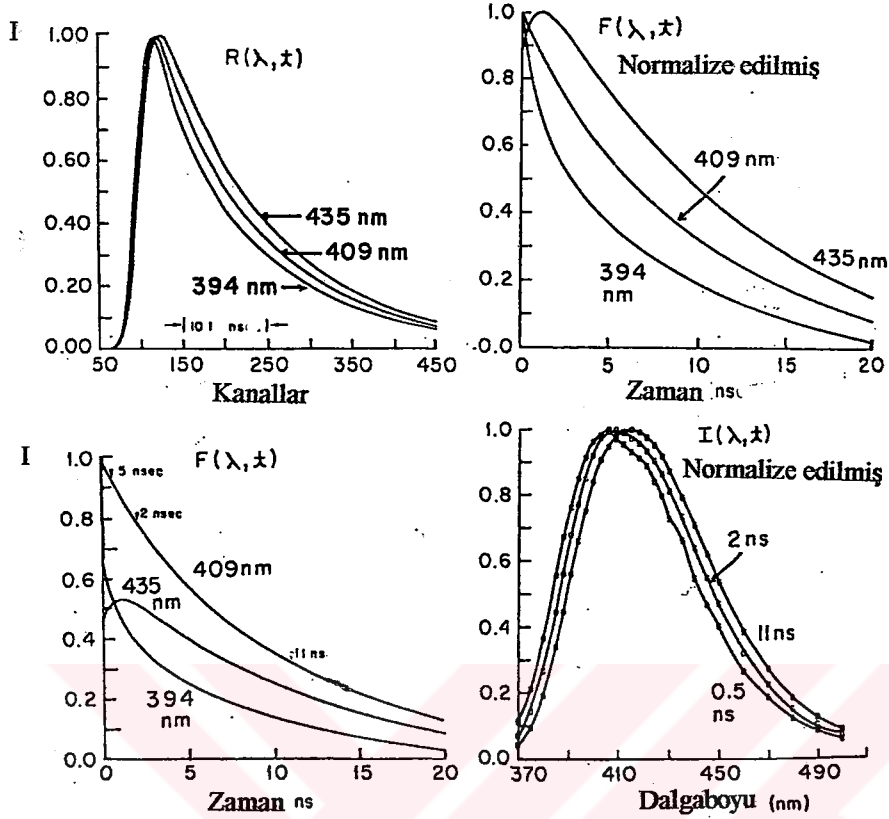
2.2 Zaman-Çözümlü Fluoresans

Belirli dalga boyunda ışık enerjisi ile çok kısa zaman aralığında uyarılan fluoresans maddenin verdiği emisyonun zamana bağlı olarak değişmesi, yani bozunma profili elde edilmektedir. Fluoresans maddelerin emisyon dalga boyundan başka bozunma süresi ile de karakterize edilebileceği düşünülürse de bu görüş tam olarak doğru değildir. Fluoresans madde uyarıldığında meydana gelen reaksiyonlar (fenol ve naftolde proton kaybı), yük transfer kompleksi oluşması (antrasen ve aminler arasında), solvent dipolar relaksasyonu, çözücüye karşı duyarlılık, birçok maddenin emisyonunun 'pulse' ile uyarılmayı takiben, zamana bağlı olarak daha büyük dalga boylarına kaymasına sebep olur (Şekil2.3.). Bu belirtilen sebeplerle zamana bağlı olarak gerçekleşen kayma, zaman-ayırımı fluoresans spektrumu 'TRES' ile izlenebilir. TRES spektrumu uyarılma 'pulse'ını takiben çeşitli zamanlarda alınarak elde edilmektedir (Lakowich, 1986).



Şekil 2.3 Uyarılmayı takiben zaman aralıkları ile alınan spektrumlar.

Fluoresansta bozunma belli bir dalga boyunda izlenmektedir. Şekil 2.4.'de verilen grafikler, emisyonun bozunması ve 'TRES' grafiğinin esasını açıklamaktadır.



Şekil 2.4 2-Anilino-naftalen ile işaretlenmiş fosfolipid kürecikleri ile alınan grafikler

Zaman ayırmalı fluoresans grafiklerini elde etmek üzere başlıca üç tür teknik kullanılmaktadır.

Bu teknikler şunlardır;

- 'Stroboscopic' Teknik
- Zamana Bağlı Olarak Foton Sayma Yöntemi
- Faz Kayma Yöntemi

'Stroboscopic' Teknik: Deneylerde kullanılan alette uygulanmakta olan bu teknik uygulamada en yeni yöntemdir. Alette nanosaniye aralıklarla ışınım yapan lamba (nanosecond flash lamp) veya lazer kullanılmaktadır. Sistemde yer alan bir osilatör (master clock) 'pulse'ların belirli bir frekansta (18-25kHz) gerçekleşmesini sağlamaktadır. Aletin lambası ışınım yapar, örnek uyarılır ve fluoresans yayınlanır. Aynı zamanda lambayı uyaran faz ile aynı fazda bulunan 'pulse' dedektör için uyarı yapar. Bu ikinci 'pulse' belli bir gecikme ile verilir. Dedektör bilgisayar ile kontrol edilmektedir.

Zamana Bağlı Olarak Foton Sayma Yöntemi: Bu yöntemde 'stroboscopic' teknik ile aynı uyarma şekli kullanılmakta fakat dedeksiyon farklı şekilde yapılmaktadır.

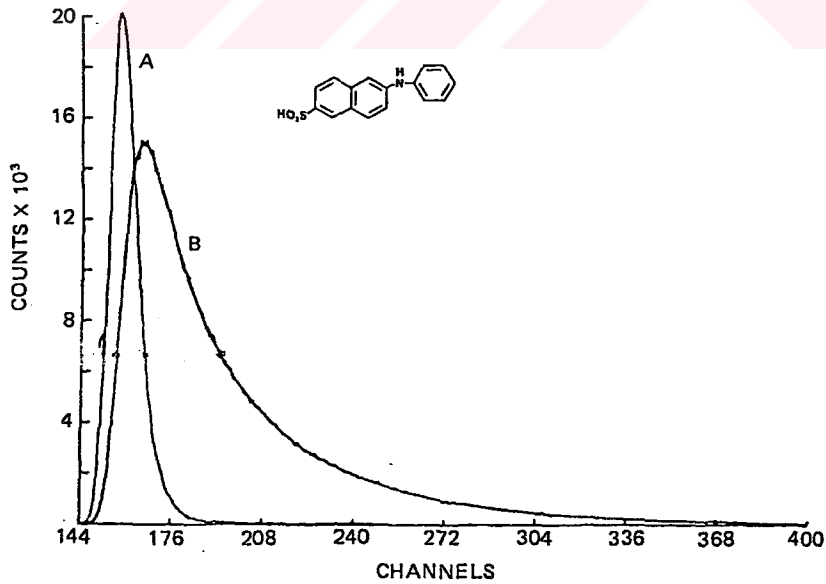
Faz Kayma Yöntemi: Bu teknik uygulananların içinde en eski olanıdır. Diğer yöntemlerden farklı olarak devamlı ışık veren (örn. ksenon ark lambası) kullanılmaktadır. Bu lambanın siddeti belli frekansta sinüzoidal olarak değişmektedir (Siemiarczuk, 2000).

2.2.1 Floresans Şiddeti-Zaman Grafiğinin Analizi

Bu amaçla 2-toluidinil-6-naftalensülfonik asid (TNS) ile işaretlenen fosfolipid kabarcıklarının 'time-resolved decay' grafiğini dikkate alalım. Bu grafikte lamba 'pulse'ı $L(t)$ ışığın saçılmasını sağlayan bir örnek kullanılarak elde edilmektedir. Lamba profili zamana bağlı olarak değiştiği için, floresans bozunma grafiği (fluorescence decay) ile olabildiğince yakın zaman aralığında alınmış olmalı. Floresans bozunmasını (fluorescence decay) $R(t)$ şeklinde ifade edelim. Bu verilerden yararlanarak respons fonksiyonu (responce function) $F(t)$ elde edilir. Bu nedenle bir çok araştırmacı tarafından aşağıda verilen ifade tanımlanmıştır.

$$R(t) = \int_0^t L(t') F(t-t') dt' \quad (2.2)$$

$R(t)$ ve $L(t)$ değerlerinden yararlanarak $F(t)$ 'nin hesaplanması konusunda birçok yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte, en çok kullanılan en küçük kareler yöntemidir (Lakowich, 1986).



Şekil2.5 TNS işaretli fosfolipid küreciklerinin verdiği floresansın zamana bağlı olarak bozunması (Time-resolved decay). A: Lamba profili, B: Floresans bozunma profili.

2.3 CD4 ve CD8 Antijenleri

Hücreler yüzeylerinde glikoprotein yapısında reseptörler bulundurmaktadır. Her biri antijenik özellikte olan ve aynı zamanda bulunduğu hücrenin kimliğini de gösteren bu reseptörler sayesinde hücreler birbirini tanır, birbiriyle veya salgıladıkları ürünlerle etkileşime girerler. Hücre yüzeyindeki bu antijenik yapılar CD (Clusters of Differentiation) farklılaşma kümeleri terimi ile adlandırılmaktadır. Her bir CD hücre yüzeyinde bulunan farklı bir antijenik yapıyı temsil etmektedir (Barber vd., 1989; Prince, vd., 1994; Andrade vd., 1998; Yılmaz ve Deniz, 1999).

CD4

55-59 kD büyüklüğünde, monomer yapıdadır. Hücre dışında bulunan kısmı Ig'nin V bölgesi benzeri dört kısımdan oluşmuştur. Bunun hidrofobik bir transmembran kısmı ve yüksek derecede bazik, 38 amino asid uzunluğunda bir intrasitoplazmik kuyruk kısmı takip etmektedir. Periferik kanda $\alpha\beta$ T hücrelerinin (yardımcı T lenfositleri) %65'i CD4 taşımaktadır. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) de CD4 molekülüne bağlanmaktadır. CD4 antijenleri yardımcı T hücreleri yanında düşük oranda monositlerde de bulunmaktadır (Sattentau vd., 1986; McClure vd., 1987; Veillette vd., 1989; Frank ve Parnes, 1998).

CD 8

CD8 molekülünün yapısı, türler arasında ve T hücrelerinin olgunlaşması aşamalarında değişiklik göstermektedir. İnsan periferik kanındaki T hücrelerinde bulunan CD8 molekülü ya CD8 α zincirinden oluşmuş bir homodimer ya da CD8 α ve CD 8 β zincirlerinin birlikte oluşturdukları heterodimer yapıdadır. Zincirin $-\text{NH}_2$ ucu hücre dışında yer almaktadır. Hücre içinde kalan kısmı 25-27 amino asitten oluşmaktadır. Bu kısımda bazik amino asitler fazla orandadır. CD 8 periferik kan lenfositlerinin %15-40'ını oluşturan sitotoksik T hücrelerinde timositlerin %80'inde ve NK hücrelerinin alt gruplarında bulunmaktadır.

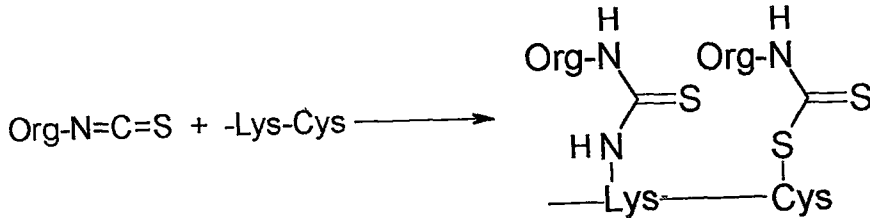
Hücre yüzeylerindeki CD tayinleri çeşitli fluoresans maddeler ile işaretlenmiş anti CD monoklonal antikorları kullanılarak, genellikle "flow-cytometry" ile yapılmaktadır. Floresans mikroskopu ile de, işaretli antikor kullanarak ve bilgisayar hesaplama programları ile değerlendirme yapılarak CD miktar tayini mümkün olmaktadır (Barber vd., 1989; Tsuchida vd., 1994; Bikoue vd., 1996; Noble vd., 1998; White ve Harty, 1998).

2.4 Protein İşaretlenmesi

Antikor ya da antijenlerin radyoaktif maddelerle işaretlenmesi ve biyolojik maddelerin tayini için analiz kitlerinin geliştirilmesi yaklaşık 1960'dan beri yaygın olarak uygulanmaktadır. Zararlı etkileri nedeniyle radyoaktif maddelerin kullanılması, giderek azalırken işaretlemede enzimlerin ve fluoresans maddelerin önemi gündeme gelmiştir. Fluoresans maddelerin enzimlere göre daha kararlı yapıda olmaları, daha kolay muhafaza edilmeleri uzun süre kullanıma izin vermeleri işaretlemede fluoresans maddeleri daha kullanılabilir kılmıştır. Uzun ömürlü fluoresans maddelerin sentezlenip işaretleme amacıyla değerlendirilmesi ve zaman ayırmalı (time-resolved) fluoresans tekniği ile duyarlı ölçümler alınması, son yıllarda çok hassas ölçümlere olanak sağlayan immünolojik yöntemlerin geliştirilmesine neden olmuştur.

Fluoresans maddelerin ve hatta radyoaktif madde ve enzimlerin, örneğin antikor ya da antijen olarak adlandırılan proteinlerin işaretlenmesinde kullanılması, bu maddelerin protein zincirinde yer alan amino asitlerin yan zincirlerine bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bu bağlanma reaksiyonları için lizin, sistein, histidin, tirozin vb. yan zincirleri kullanılabilir.

Bu çalışmada fluoresein ve pirenil izotiyosiyanat türevleri işaretlemede kullanılmışlardır. İzotiyosiyanat grubu özellikle lizin yan zincirine, tiyofüre bağı oluşturarak kuvvetli bir şekilde bağlanmaktadır. İzotiyosiyanatın az oranda sisteine de bağlandığı görülmektedir (Coons, 1956; McDevitt vd., 1962; Knopp ve Weber, 1967; Knopp ve Weber, 1969; The ve Feltkamp, 1970; Weltman vd., 1973; Soini ve Hemmilä, 1979; Kranz vd., 1982; Hemmilä, 1985; Rowley vd., 1987; Der-Balian vd., 1988; Telsler vd., 1989; Csontos vd., 1990; Micheel vd., 1988; Mukkla, 1993; Reif vd., 1994; Imaizumi vd., 1995; Karşıl原因 vd., 1997; Little vd. 1997; Bouzige vd., 1999).



3. DENEYSEL KISIM

3.1 Fluoresein İzotiyosiyanat (FITC) ile BSA ve Monoklonal Antikor (Anti CD4, Anti CD8) ile İşaretleme

3.1.1 Materyal ve Yöntem

Protein Çözeltileri

Flouresan maddelerle protein işaretlemede iyi sonuç alabilmek için önerilen en düşük protein konsantrasyonu 2 mg/ml 'dir. Bu tanıma uygun olarak 0,1 gr BSA / 50 ml destile su olacak şekilde protein çözeltisi hazırlandı.

FITC Çözeltisi

pH : 9,5 karbonat tamponunda bir miktar FITC çözülerek hazırlanan stok FITC çözeltisinden 10µl alınıp 1000µl'ye seyreltildi (seyrelme oranı 100) ve 495 nm'deki uv absorbanı (A_{495}) okundu.

$$(A_{495}/200) \times \text{Seyrelme oranı} = \dots \text{mg/ml FITC} \quad (3.1)$$

Bu hesap stok çözeltideki FITC miktarını vermektedir. Bu değerden yararlanarak işaretleme için istenilen mol FITC / mol protein oranına göre stok FITC çözeltisinden işaretleme için alınacak hacim belirlenir.

Reaksiyon Çözeltisinin Hazırlanması

Reaksiyon karışımındaki bileşenlerin toplam hacmine uygun bir Eppendorf tüpüne;

- 05mg/250µl protein çözeltisi ve
- Hesaplanan miktar FITC çözeltisi

alındı. pH :9,5 karbonat tamponu ile reaksiyon karışımı uygun hacme tamamlandı. Reaksiyon karışımı uygun sıcaklıkta ve yeterli sürede tepkimeye bırakıldı. Reaksiyon süresi sonunda jel filtrasyon işlemi ile saflaştırma yapıldı.

Safılaştırma

İşaretleme reaksiyonu karışımından işaretlelenen proteini ayırmak için 1,5x20 cm boyutlarında sephadex G-50 jeli doldurulmuş jel filtrasyon kolonu hazırlandı. Ayırma çözeltisi olarak fizyolojik pH'ya uygun 10mM fosfat tamponu (PBS) pH :7,3 tamponu kolona uygulandı ve fraksiyonlar 2ml'lik hacimler halinde tüplere toplandı, sonra uv absorbans değerleri "Philips PU 8740 UV/VIS Scanning" Spektrofotometre ile okundu ve FITC-Anti CD8 antikoru için BD Faxcalibur marka Flow Cytometry cihazı ile işaretleme izlendi.

Fraksiyonlarda FITC / Protein Mol Oranının Hesaplanması

FITC (mol) = $A_{495} / (200 \times 390)$ hesabı FITC'nin mol miktarını verir.

$$M_{(FITC)} = 390 \text{ gr/mol}$$

1 mol gr FITC'nin absorbans değeri = 200

$$\text{Protein (mol)} = A_{\text{protein}} / [1,4 \times (\sim M_{(\text{protein})})]$$

$$M_{(BSA)} = 70.000 \text{ (yaklaşık değer)} \quad M_{(\text{Anti-CD 8})} = 160.000 \text{ (yaklaşık değer)}$$

Burada FITC'nin proteinin 280 nm'deki absorbansına yaptığı katkıyı gidermek için aşağıdaki hesap yapılır.

$$A_{\text{protein}} = A_{280} - A_{495} \times (DF) \quad \text{Düzeltilme faktörü (DF)} = A_{280} (\text{saf FITC}) / A_{495} (\text{saf FITC})$$

FITC (mol) / Protein (mol) oranı 1 molekül proteine bağlanan yaklaşık FITC molekülü sayısını verir.

3.2 Pirenil İzotiyosiyanat (PITC) ile BSA ve Monoklonal Antikor (Anti CD4) İşaretleme

3.2.1 Materyal ve Yöntem

Protein Çözeltileri

FITC deneylerinde olduğu gibi 0,5 mg protein 250 µl olacak şekilde hazırlanmış BSA çözeltisi ile monoklonal antikor çözeltisi işaretleme için kullanıldı.

PITC Çözeltisi

20 mg PITC 1000 μ l DMSO'da çözülerek stok PITC çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden istenilen mol PITC / mol protein oranına göre işaretleme için gerekli hacim alındı.

Reaksiyon Çözeltisinin Hazırlanması

Reaksiyon karışımının toplam hacmine uygun bir Eppendorf tüpüne;

- 0,5 mg / 250 μ l protein çözeltisi ve
- İstenilen mol oranına göre 20mg PITC /1000 μ l DMSO çözeltisinden hesaplanan miktarda hacim alındı.

PH : 9 karbonat tamponu ile reaksiyon karışımı uygun hacme tamamlandı. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 1 gece bekletildi ve jel filtrasyon işlemiyle saflaştırıldı.

Saflaştırma

PITC işaretli proteini reaksiyon karışımından ayırmak için 1,5x20 cm boyutlarında sephadex G-50 jeliyle dolu ayırma kolonu kullanıldı. Ayırma çözeltisi olarak fizyolojik pH'ya uygun fosfat tamponu (pH:7,3) kolona uygulandı ve fraksiyonlar 2 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı. Philips PU 8740 UV/Vis Scanning Spektrofotometresi ile absorbansları okundu ve PTI-Time Master C71 model spektrofotometre ile fluoresans spektrumları ve fluoresans bozunma izlendi.

Fraksiyonlarda PITC /Protein Mol Oranı Hesabı

20 mg PITC / 1000 μ l DMSO çözeltisinden 25 μ l alınıp destile suyla 5 ml'ye tamamlandı. Absorbans değerleri $A_{280} = 1,119$ ve $A_{360} = 1,134$. Bu değerler ile 1 mol-gram PITC'nin absorbans değeri ve düzeltme faktörü hesaplandı.

1000 μ l DMSO'da 20mg PITC var ise;

25 μ l DMSO'da 0,5 mg PITC bulunur. Buna göre

0,5 mg PITC için $A_{360}=1,134$ ise 1 mol-gram PITC yani ,

259,32 mg PITC için $A_{360}= 294,0688$ (~ 294,07) olur.

Buradan hareketle,

$$\text{PITC (mol)} = A_{360} / (294,07 \times 259,32) \quad (3.7)$$

ifadesi elde edilir. Ayrıca PITC'nin protein 280 nm'deki absorbansına yaptığı katkıyı gidermek için gerekli düzeltme faktörü

$(DF)_{\text{PITC}} = A_{280(\text{saf PITC})} / A_{360(\text{saf PITC})} = 1,119 / 1,134 = \sim 0,9867$ olarak bulunur. Buna göre bir fraksiyon için

$$A_{\text{protein}} = A_{280} - A_{360} \times 0,98672 \quad (3.8)$$

dir.

$$\text{Protein(mol)} = A_{\text{protein}} / [1,4 \times (\sim M_{\text{protein}})] \quad (3.9)$$

olduğuna göre

$$\text{PITC (mol)} / \text{Protein (mol)} \quad (3.10)$$

oranı bir molekül proteine bağlanan yaklaşık PITC sayısını verir.

$$M_{\text{BSA}} = \sim 70.000 \quad M_{\text{Anti-cd 4}} = \sim 160.000$$

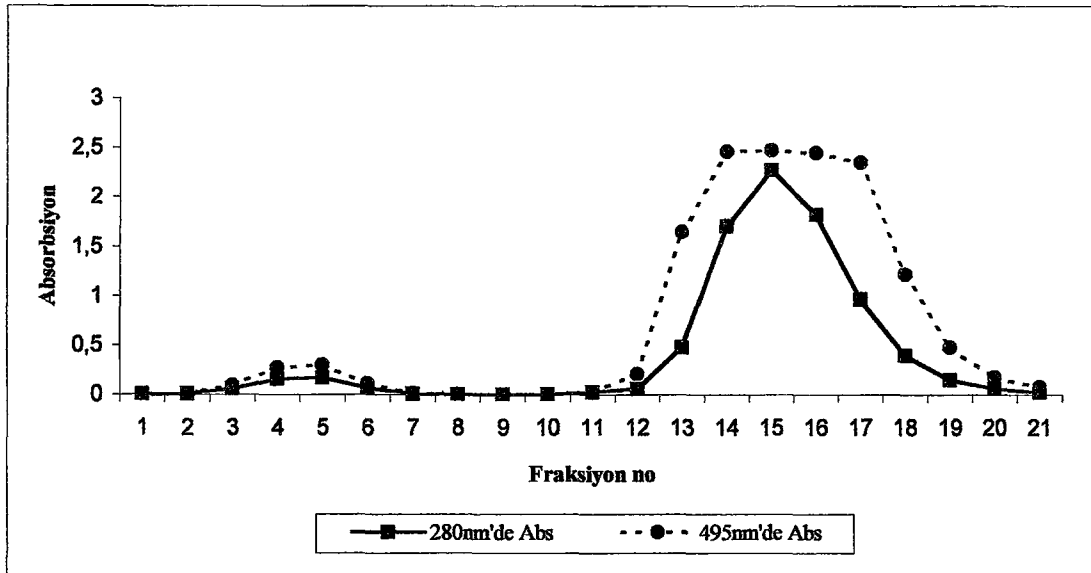
4. DENEYSEL SONUÇLAR

Yapılan deneylerde uygulanan reaksiyon koşulları ve jel filtrasyon ile saflaştırma işlemleri sonucu elde edilen fraksiyonlarda fluoresans madde (FITC, PITC) ile işaretli proteinlerin UV. absorbans değerleri, 'flow cytometry' sonuçları ve zaman özümlü fluoresans ölçümleri izelge ve grafikler halinde sunulmaktadır.



Çizelge 4.1 Deneme 1F (FITC-BSA)

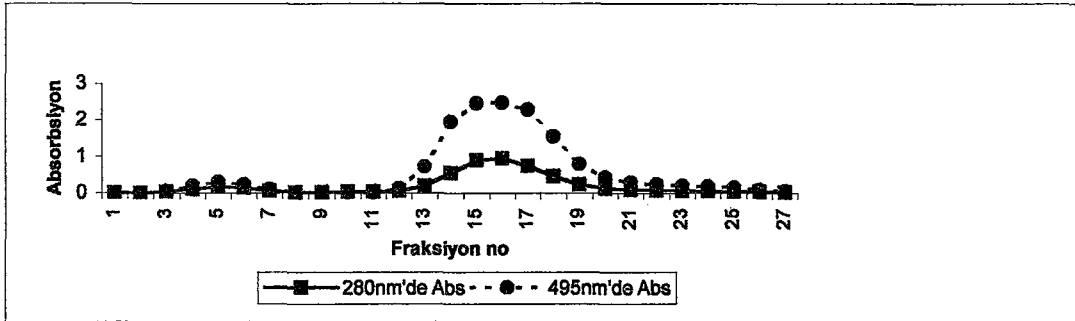
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/BSA mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg BSA	1	0	0	0
İşaretleme reaktifi : FITC	2	0,008	0,009	2
FITC/BSA mol oranı : 120	3	0,058	0,092	4
Toplam hacim 750µl	4	0,156	0,27	5
Reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı	5	0,166	0,297	5
Reaksiyon süresi : 1 saat	6	0,062	0,107	5
	7	0,009	0,01	2
	8	0	0	
	9	0	0	
	10	0	0	
	11	0,028	0,029	
	12	0,059	0,207	
	13	0,482	1,647	
	14	1,705	2,461	
	15	2,274	2,472	
	16	1,819	2,451	
	17	0,965	2,35	
	18	0,394	1,217	
	19	0,152	0,481	
	20	0,057	0,172	
	21	0,028	0,079	



Şekil 4.1 Deneme 1F Fraksiyonları

Çizelge 4.2 Deneme 2F (FITC-BSA)

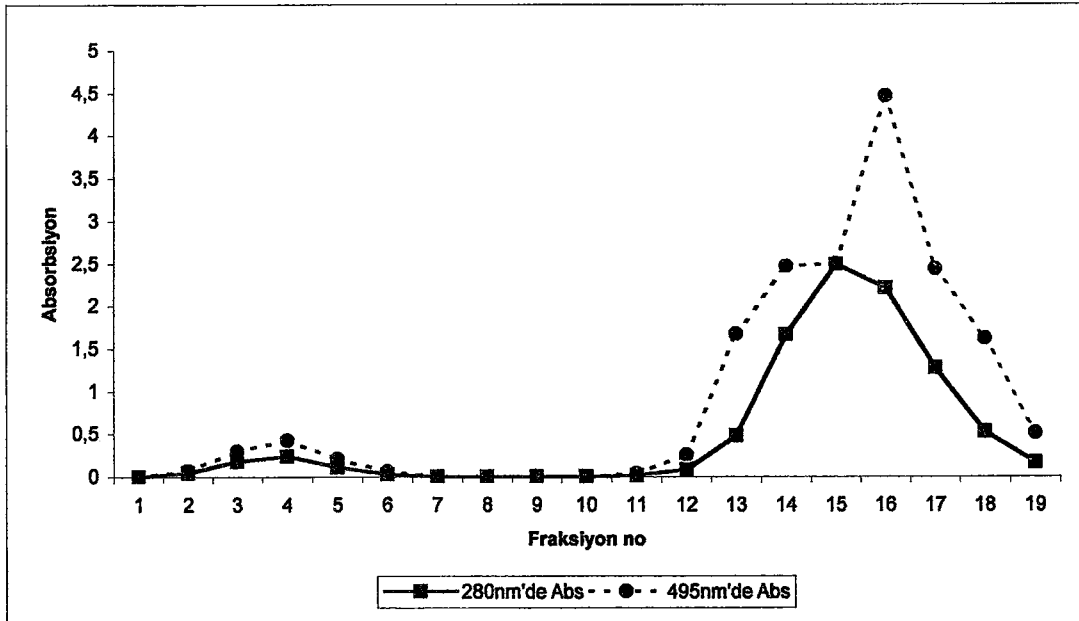
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/BSA mol oranı
0.5 mg BSA	1	0	0	
FITC/BSA mol oranı :120	2	0,005	0	
Toplam hacim 750µl	3	0,032	0,048	3
Reaksiyon sıcaklığı:oda sıcaklığı	4	0,112	0,189	4
	5	0,178	0,301	5
	6	0,137	0,232	5
	7	0,057	0,097	5
Reaksiyon süresi : 1 gece	8	0,015	0,024	4
	9	0,022	0,016	1
	10	0,032	0,016	1
	11	0,038	0,015	1
	12	0,06	0,131	
	13	0,187	0,722	
	14	0,542	1,952	
	15	0,892	2,462	
	16	0,95	2,475	
	17	0,745	2,285	
	18	0,464	1,547	
	19	0,224	0,792	
	20	0,125	0,414	
	21	0,086	0,281	
	22	0,066	0,225	
	23	0,059	0,197	
	24	0,05	0,167	
	25	0,039	0,132	
	26	0,027	0,09	
	27	0,02	0,056	



Şekil 4.2 Deneme 2F Fraksiyonları

Çizelge.4.3 Deneme 3F (FITC-BSA)

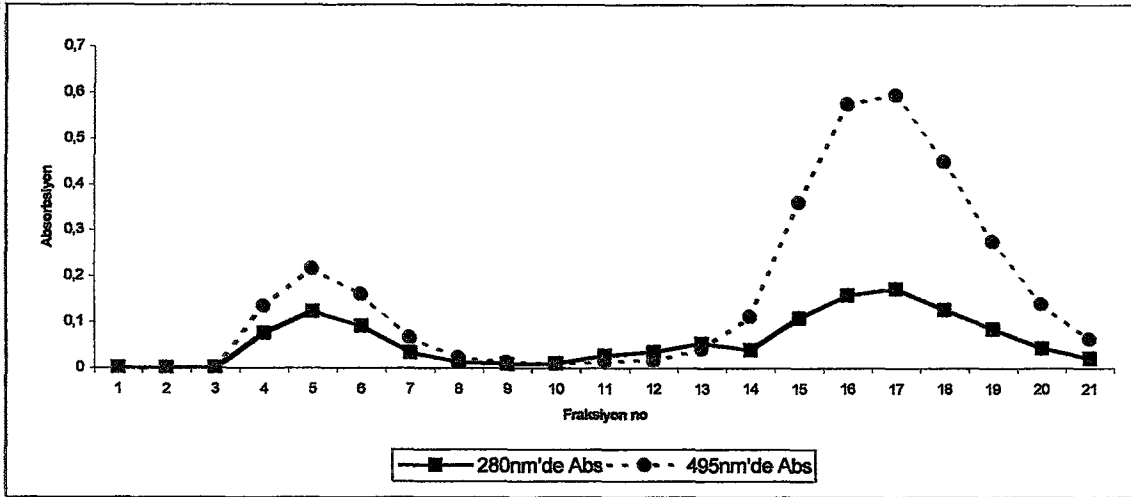
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/BSA mol oranı
0.5 mg BSA	1	0	0	
FITC/BSA mol oranı :120	2	0,045	0,071	4
	3	0,179	0,298	4
Toplam hacim 750µl	4	0,241	0,428	5
	5	0,114	0,212	6
Reaksiyon sıcaklığı:oda sıcaklığı	6	0,028	0,061	10
	7	0	0	
Reaksiyon süresi : 2 saat	8	0	0	
	9	0	0	
	10	0	0	
	11	0,017	0,04	
	12	0,082	0,256	
	13	0,482	1,67	
	14	1,662	2,464	
	15	2,488	2,493	
	16	2,209	4,465	
	17	1,273	2,436	
	18	0,528	1,621	
	19	0,162	0,511	



Şekil 4.3.Deneme 3F Fraksiyonları

Çizelge 4.4 Deneme 4F (FITC-BSA)

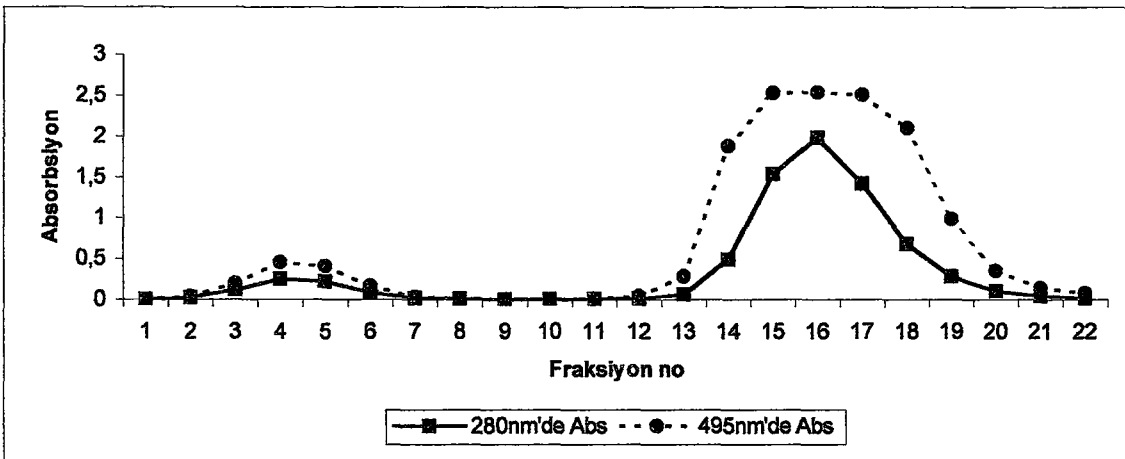
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/BSA mol oranı
0.5 mg BSA	1	0	0	
FITC/BSA mol oranı :12	2	0	0	
	3	0	0	
Toplam hacim 750µl	4	0,075	0,133	5
	5	0,123	0,216	5
Reaksiyon sıcaklığı: 37 C	6	0,091	0,16	5
	7	0,034	0,065	6
Reaksiyon süresi : 1 saat	8	0,012	0,022	6
	9	0,008	0,012	
	10	0,01	0,009	
	11	0,027	0,014	
	12	0,035	0,016	
	13	0,053	0,04	
	14	0,039	0,112	
	15	0,109	0,361	
	16	0,159	0,575	
	17	0,172	0,594	
	18	0,127	0,45	
	19	0,085	0,276	
	20	0,043	0,139	
	21	0,021	0,063	



Şekil 4.4 Deneme 4F Fraksiyonları

Çizelge 4.5 Deneme 5F (FITC-BSA)

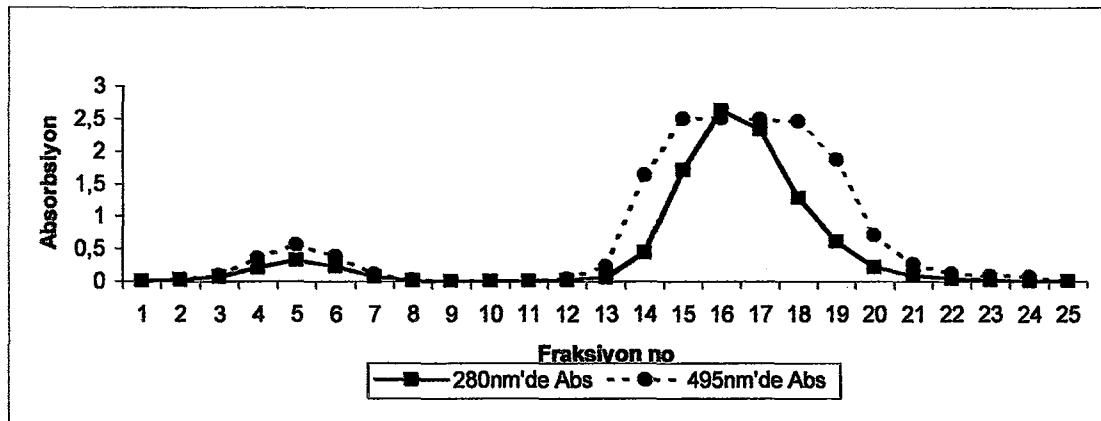
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/BSA mol oranı
0.5 mg BSA	1	0	0	
FITC/BSA mol oranı :120	2	0,021	0,041	2
Toplam hacim 750µl	3	0,114	0,195	5
Reaksiyon sıcaklığı:42 C	4	0,25	0,456	5
Reaksiyon süresi : 1 saat	5	0,221	0,411	6
	6	0,085	0,163	6
	7	0,017	0,031	5
	8	0,005	0,005	2
	9	0	0	
	10	0	0	
	11	0,008	0,009	
	12	0,011	0,038	
	13	0,063	0,283	
	14	0,497	1,879	
	15	1,537	2,53	
	16	1,984	2,539	
	17	1,419	2,509	
	18	0,678	2,098	
	19	0,285	0,986	
	20	0,099	0,35	
	21	0,039	0,141	
	22	0,018	0,077	



Şekil 4.5 Deneme 5F Fraksiyonları

Çizelge 4.6 Deneme 6F (FITC-BSA)

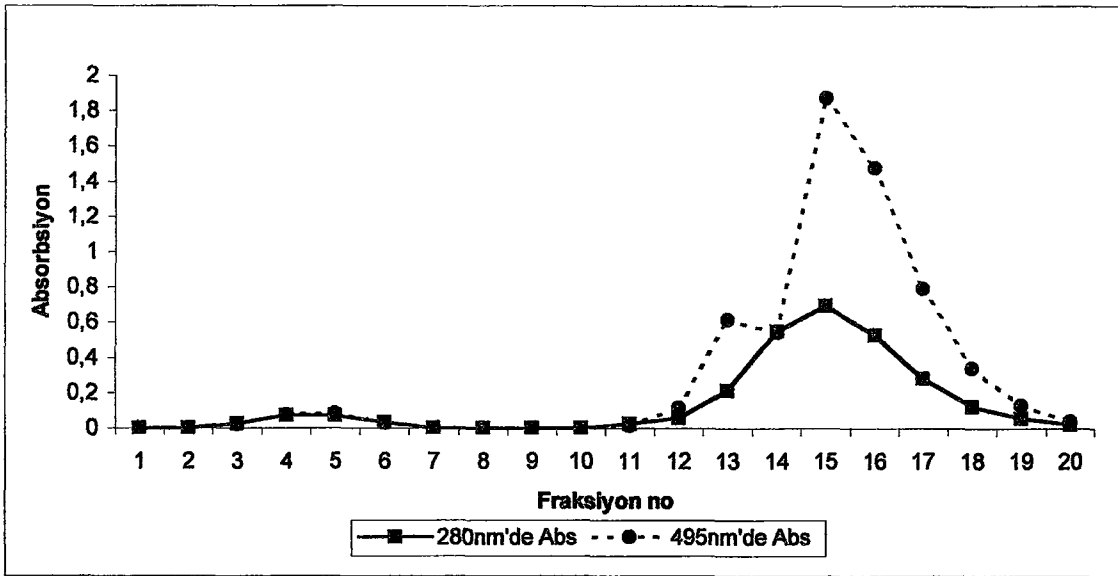
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/BSA mol oranı
0.5 mg BSA	1	0	0	
FITC/BSA mol oranı :120	2	0,021	0,019	1
Toplam hacim 750µl	3	0,069	0,093	3
Reaksiyon sıcaklığı: 37 C	4	0,21	0,35	4
Reaksiyon süresi : 1 saat	5	0,329	0,557	5
	6	0,226	0,379	4
	7	0,066	0,106	4
	8	0,014	0,019	3
	9	0	0	
	10	0	0	
	11	0	0	
	12	0,024	0,041	
	13	0,062	0,224	
	14	0,443	1,632	
	15	1,715	2,495	
	16	2,627	2,506	
	17	2,329	2,489	
	18	1,28	2,458	
	19	0,613	1,865	
	20	0,218	0,704	
	21	0,084	0,268	
	22	0,035	0,116	
	23	0,02	0,078	
	24	0,014	0,064	
	25	0	0	



Şekil 4.6. Deneme 6F Fraksiyonları

Çizelge 4.7 Deneme 7F (FITC-BSA)

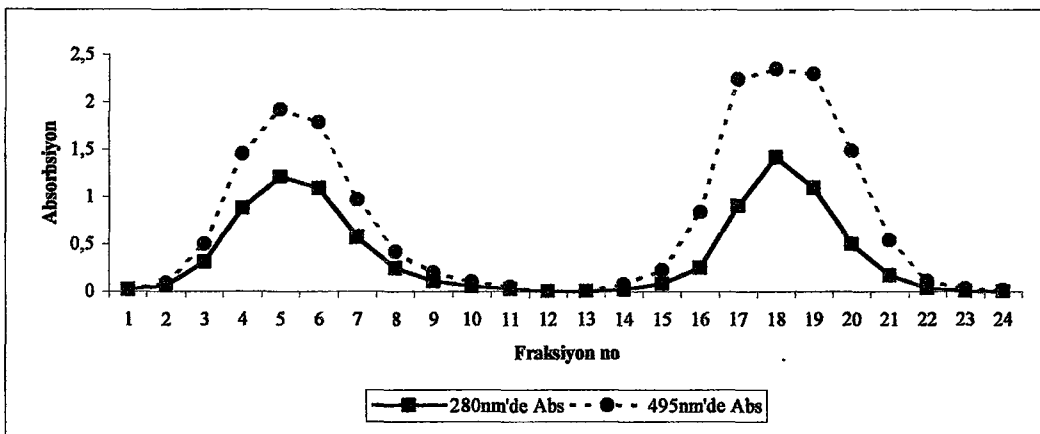
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/BSA mol oranı
0.5 mg BSA	1	0	0	
FITC/BSA mol oranı :50	2	0	0	
Toplam hacim 750µl	3	0,027	0,022	1
Reaksiyon sıcaklığı:oda sıcaklığı	4	0,071	0,077	2
Reaksiyon süresi : 1 saat	5	0,071	0,084	2
	6	0,032	0,03	2
	7	0	0,001	
	8	0	0	
	9	0	0	
	10	0	0	
	11	0,026	0,014	
	12	0,057	0,116	
	13	0,213	0,616	
	14	0,549	0,544	
	15	0,695	1,872	
	16	0,528	1,48	
	17	0,283	0,794	
	18	0,125	0,34	
	19	0,057	0,132	
	20	0,02	0,04	



Şekil 4.7 Deneme 7F Fraksiyonları

Çizelge 4.8 Deney 1 FITC-Anti CD4

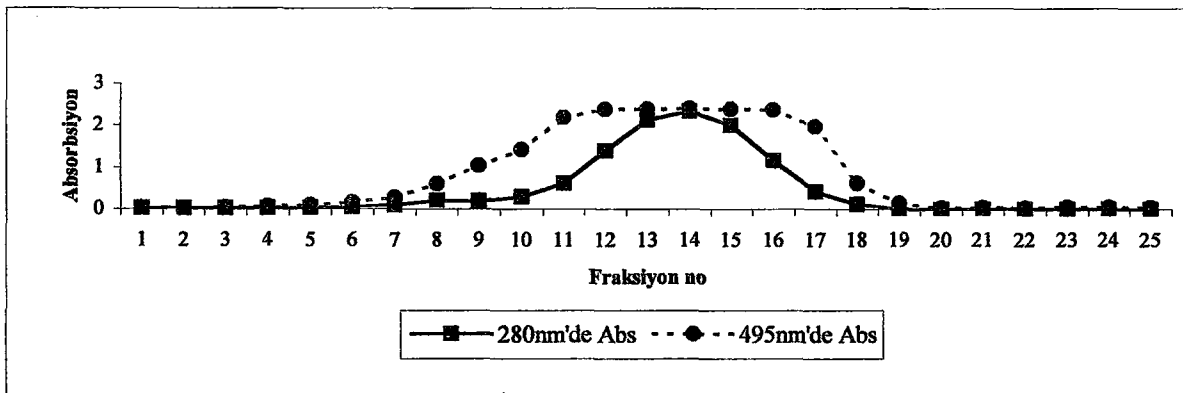
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/Anti CD 4 mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg Anti CD 4	1	0,019	0,016	3
İşaretleme reaktifi : FITC	2	0,061	0,089	9
FITC/Anti CD 4 mol oranı : 120	3	0,308	0,501	10
Toplam hacim: 1000µl	4	0,879	1,455	11
Reaksiyon sıcaklığı: 37 C	5	1,21	1,917	10
Reaksiyon süresi : 2 saat	6	1,09	1,782	10
	7	0,568	0,963	11
	8	0,241	0,419	12
	9	0,108	0,199	14
	10	0,053	0,102	16
	11	0,024	0,05	22
	12	0	0	
	13	0	0	
	14	0,022	0,071	
	15	0,078	0,224	
	16	0,248	0,839	
	17	0,905	2,246	
	18	1,42	2,35	11
	19	1,097	2,299	
	20	0,497	1,486	
	21	0,172	0,538	
	22	0,033	0,108	
	23	0,006	0,026	
	24	0,002	0,016	



Şekil 4.8 Deney 1 FITC-Anti CD4 Fraksiyonları

Çizelge 4.9 Deney 2 FITC-Anti CD8

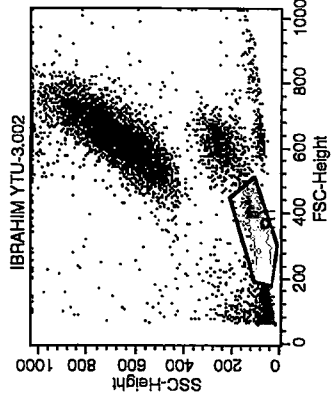
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	495nm'de Abs	FITC/Anti CD 8 mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg Anti CD 8	1	0,008	0,013	
İşaretleme reaktifi : FITC	2	0,011	0,022	
FITC/Anti CD 8 mol oranı : 150	3	0,014	0,036	
Toplam hacim: 1500 µl	4	0,022	0,063	
Reaksiyon sıcaklığı: 37 C	5	0,032	0,095	
Reaksiyon süresi : 4 saat	6	0,049	0,146	
	7	0,092	0,268	
	8	0,203	0,59	
	9	0,183	1,035	
	10	0,291	1,427	
	11	0,613	2,196	
	12	1,387	2,381	12
	13	2,126	2,393	5
	14	2,336	2,403	5
	15	2,006	2,389	6
	16	1,166	2,365	20
	17	0,42	1,973	
	18	0,107	0,61	
	19	0	0,138	
	20	0	0,035	
	21	0	0,025	
	22	0	0,031	
	23	0	0,042	
	24	0	0,052	
	25	0	0,053	



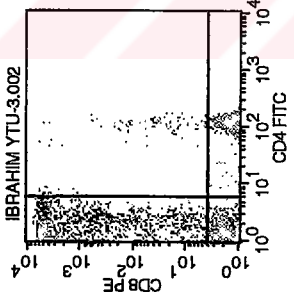
Şekil 4.9 Deney 2 FITC-Anti CD8 Fraksiyonları

ISTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DETAE
IMMUNOLOJİ ABD

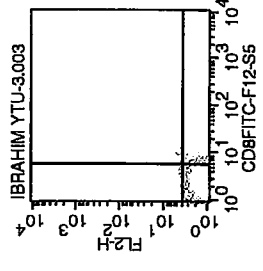
HASTANIN ADI SOYADI İBRAHİM-3
 YTU
 TARİHİ: 24.03.2000
 YAŞ:
 ORNEK:PERİFERİK KAN
 ÜCRETİ/SEVKLİ:



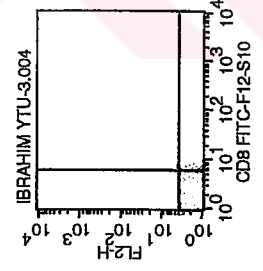
Region	Events	% Gated	Px,Py
R1	2734	27.34	1,2



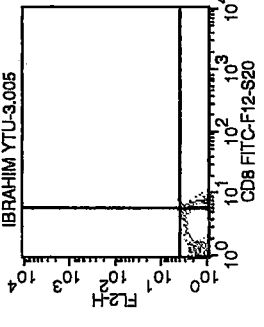
Quad	Events	% Gated
UL	1285	47.00
UR	104	3.80
LL	539	19.71
LR	806	29.48



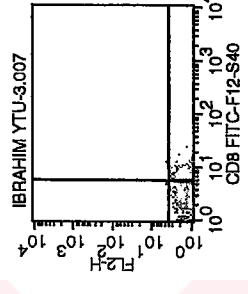
Quad	Events	% Gated
UL	5	0.17
UR	4	0.14
LL	2825	96.09
LR	106	3.61



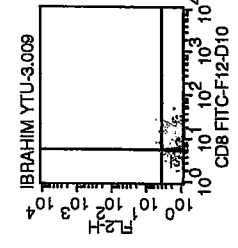
Quad	Events	% Gated
UL	1	0.03
UR	1	0.03
LL	2928	97.96
LR	59	1.97



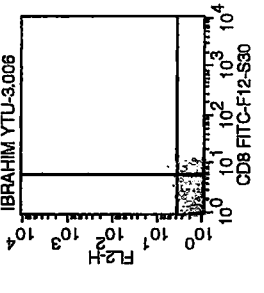
Quad	Events	% Gated
UL	1	0.03
UR	2	0.07
LL	2628	91.09
LR	254	8.80



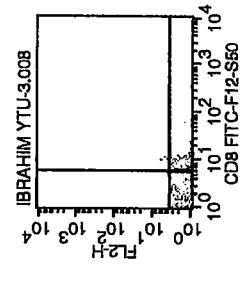
Quad	Events	% Gated
UL	4	0.14
UR	1	0.03
LL	1969	67.39
LR	948	32.44



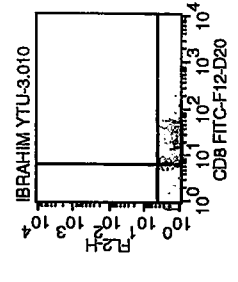
Quad	Events	% Gated
UL	1	0.03
UR	13	0.45
LL	190	6.51
LR	2716	93.01



Quad	Events	% Gated
UL	2	0.07
UR	2	0.07
LL	2043	73.81
LR	721	26.05



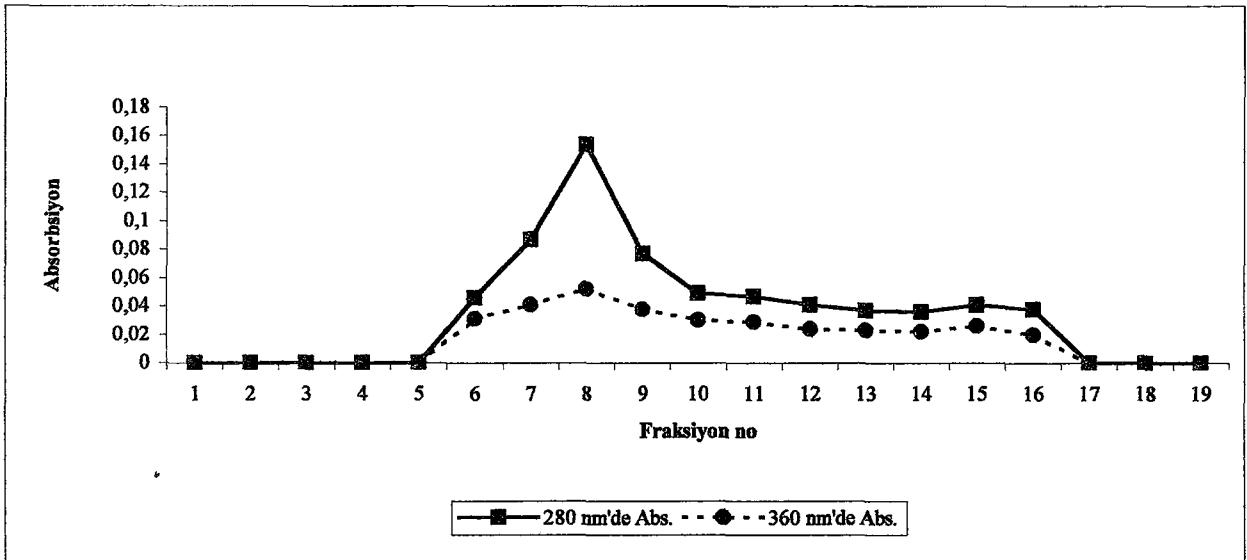
Quad	Events	% Gated
UL	1	0.03
UR	4	0.14
LL	1680	57.67
LR	1228	42.16



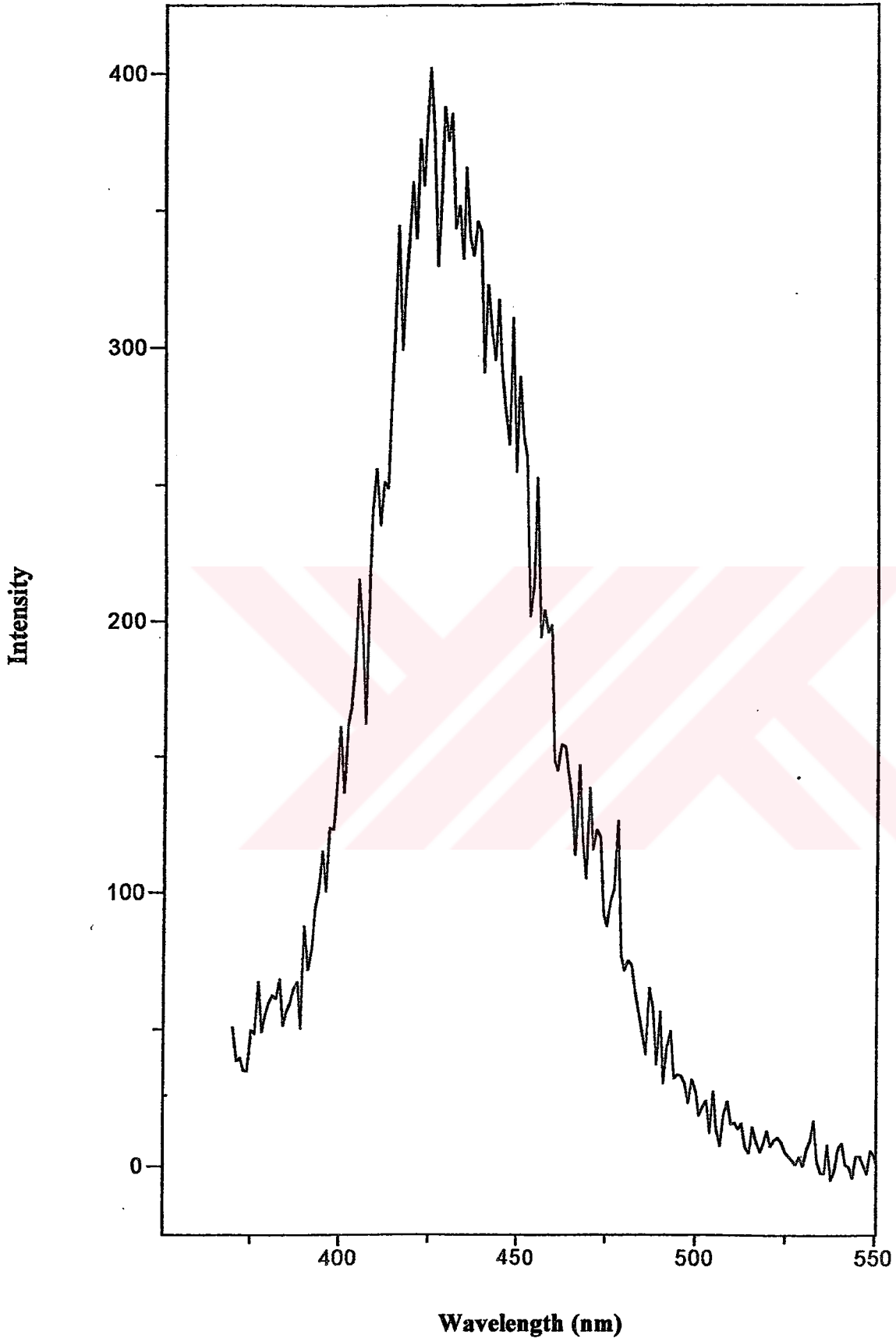
Quad	Events	% Gated
UL	0	0.00
UR	18	0.62
LL	17	0.59
LR	2849	98.79

Çizelge 4.10 Deneme 1P (PITC-BSA)

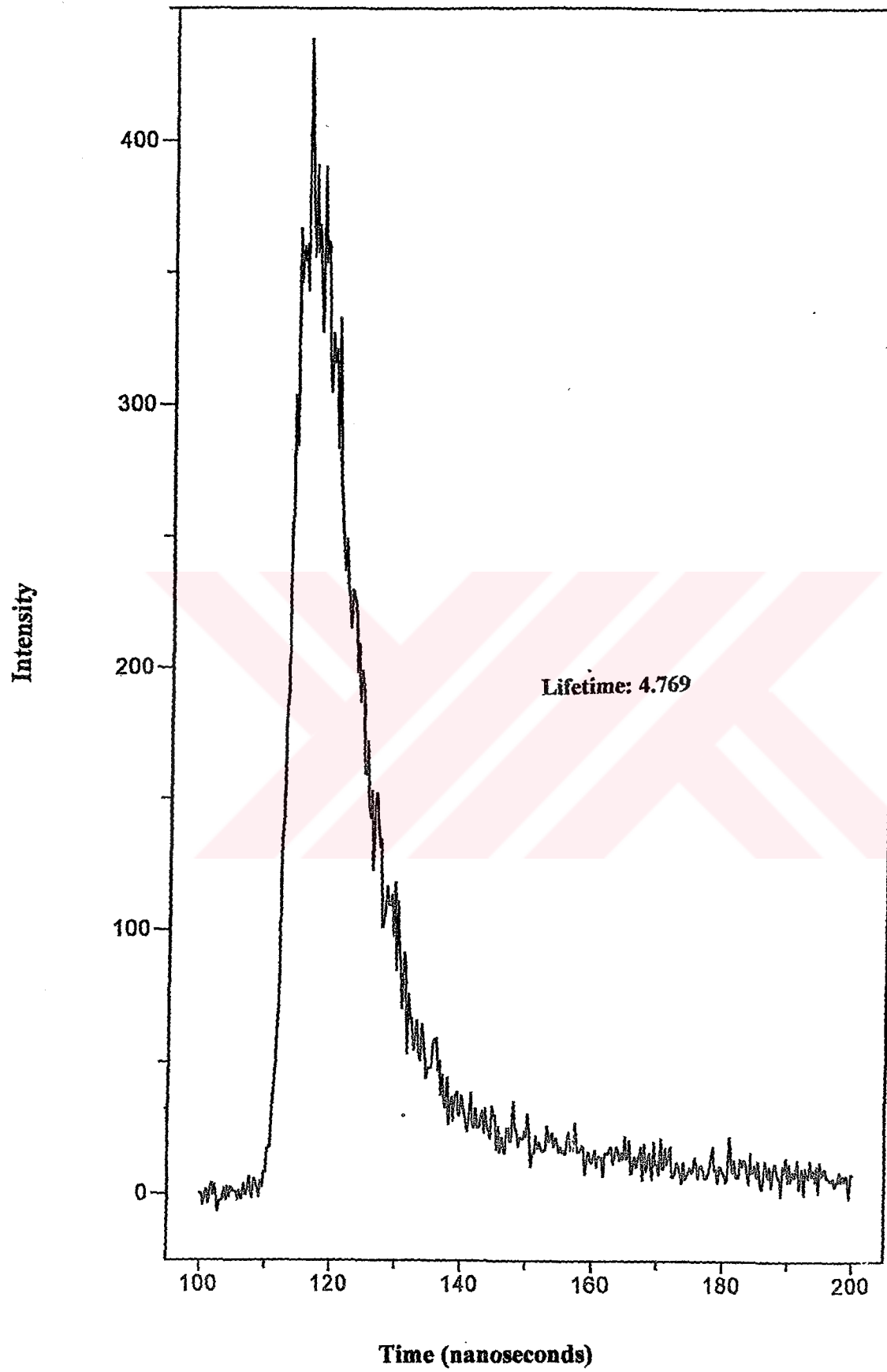
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280 nm'de Abs.	360 nm'de Abs.	PITC/BSA mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg BSA	1	0	0	
İşaretleme reaktifi : PITC	2	0	0	
PITC/BSA mol oranı : 1	3	0	0	
	4	0	0	
	5	0	0	
Toplam hacim : 500µl	6	0,046	0,031	2
	7	0,087	0,041	1
Reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı	8	0,154	0,052	1
	9	0,077	0,038	1
Reaksiyon süresi : 1 gece	10	0,049	0,03	2
	11	0,047	0,029	2
	12	0,041	0,024	2
	13	0,037	0,023	2
	14	0,036	0,022	2
	15	0,041	0,026	2
	16	0,038	0,02	1
	17	0	0	
	18	0	0	
	19	0	0	



Şekil 4.10 Deneme 1P Fraksiyonları



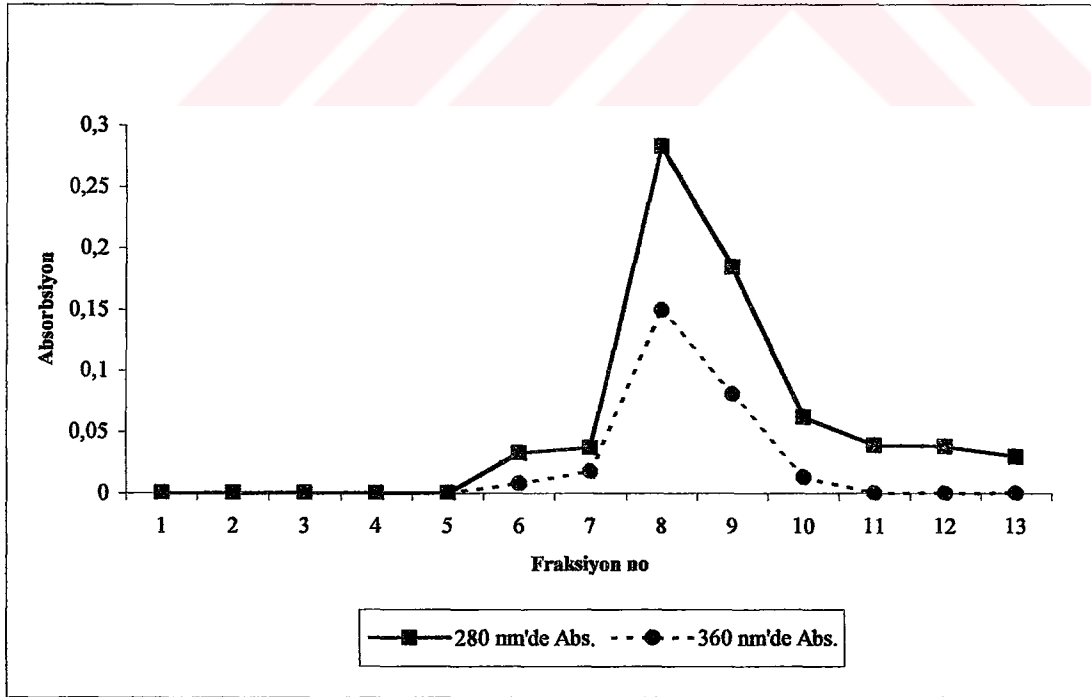
Şekil 4.11 Deneme 1P PITC-BSA (TRES)



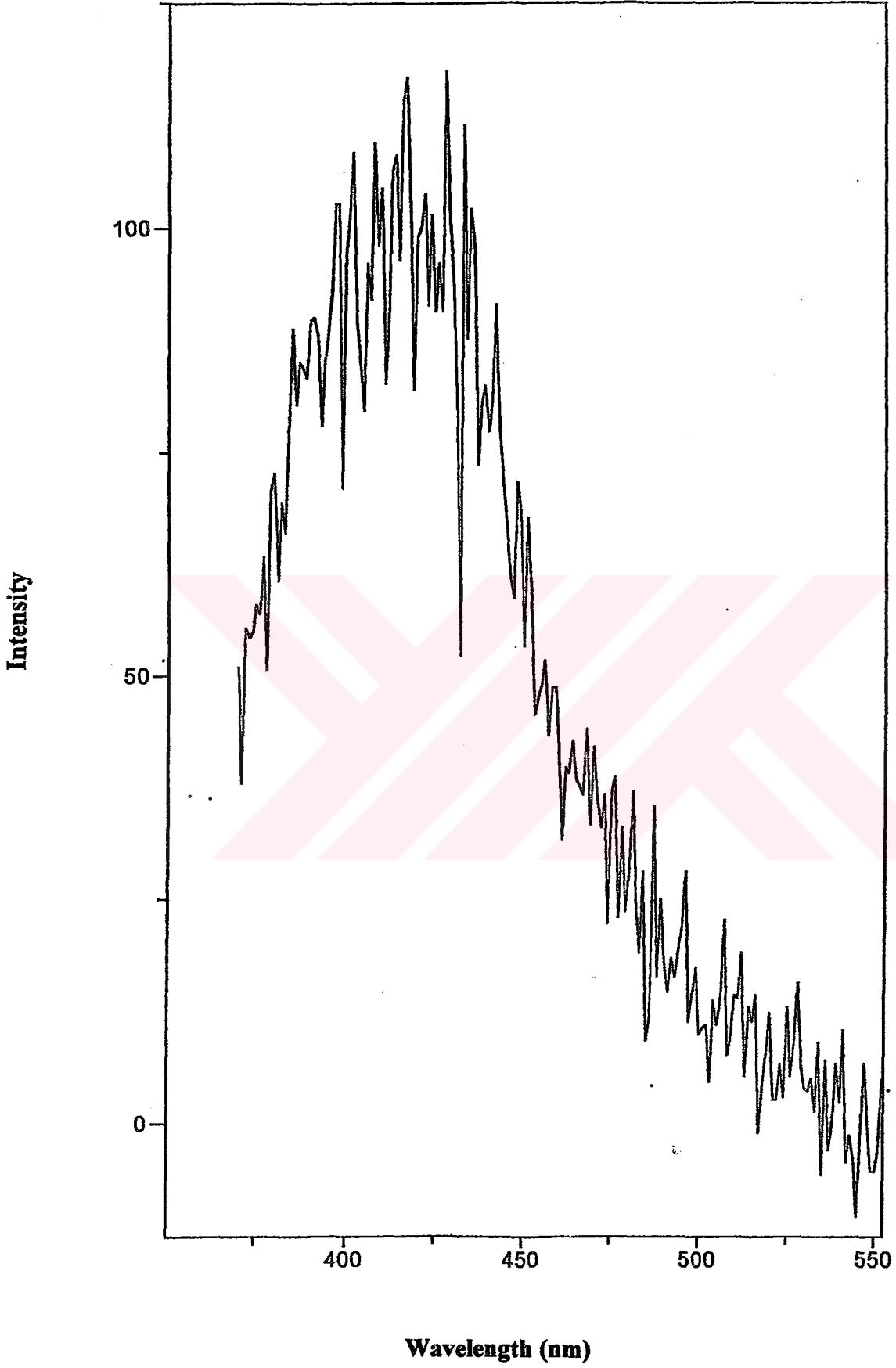
Şekil 4.12 Deneme 1P PITC-BSA (FL)

Çizelge 4.11 Deneme 2P (PITC-BSA)

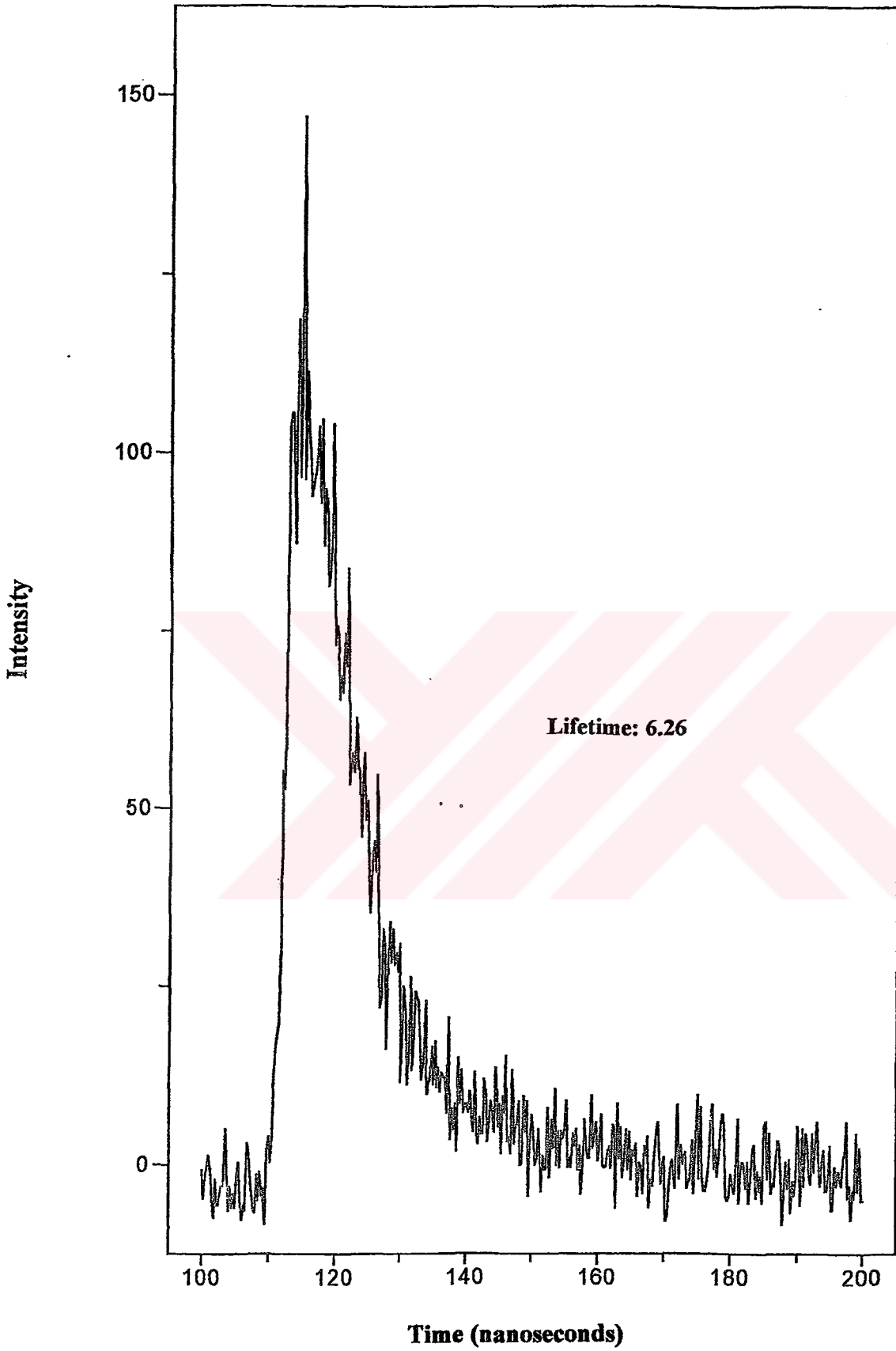
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280 nm'de Abs.	360 nm'de Abs.	PITC/BSA mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg BSA	1	0	0	
İşaretleme reaktifi : PITC	2	0	0	
PITC/BSA mol oranı : 10	3	0	0	
	4	0	0	
	5	0	0	
Toplam hacim 500 µl	6	0,033	0,008	
	7	0,037	0,018	1
Reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı	8	0,283	0,149	1
	9	0,184	0,081	1
Reaksiyon süresi : 1 gece	10	0,062	0,013	
	11	0,039	0	
	12	0,038	0	
	13	0,03	0	



Şekil 4.13 Deneme 2P Fraksiyonları



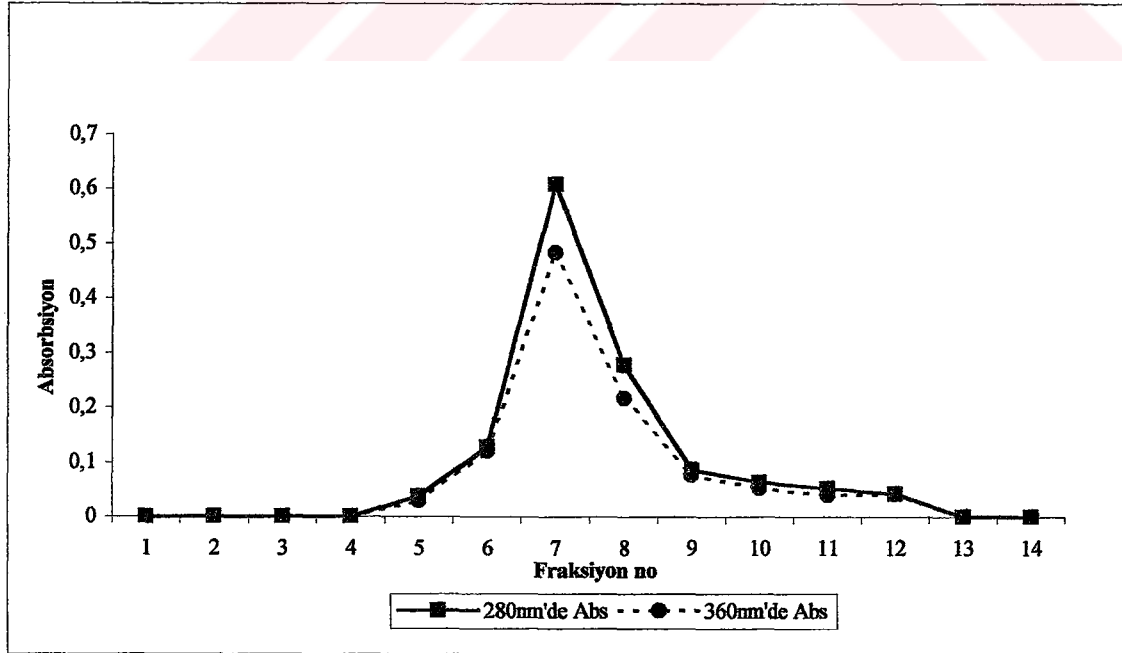
Şekil 4.14 Deneme 2P PITC-BSA (TRES)



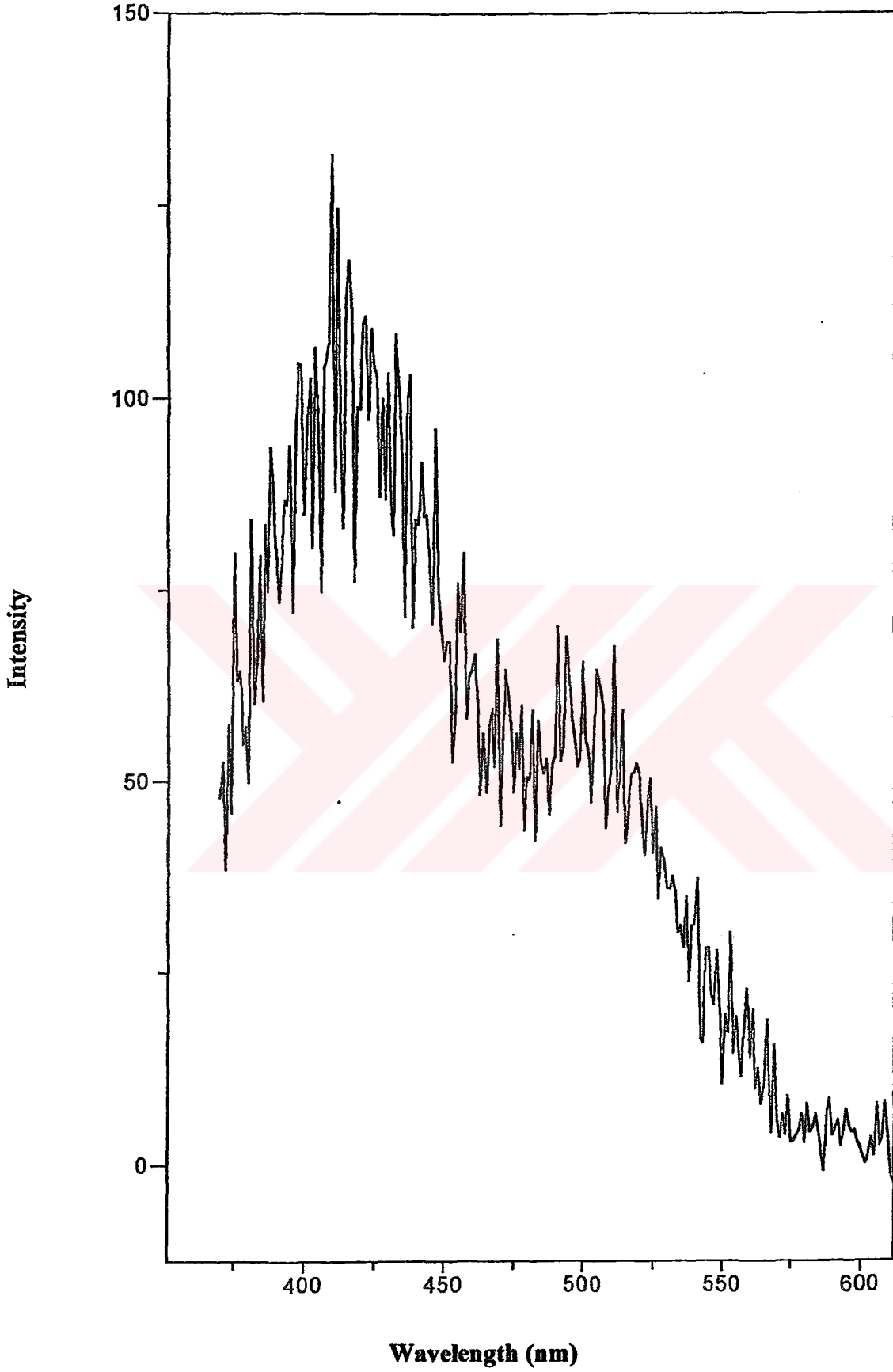
Şekil 4.15 Deneme 2P PITC-BSA (FL)

Çizelge 4.12 Deneme 3P (PITC-BSA)

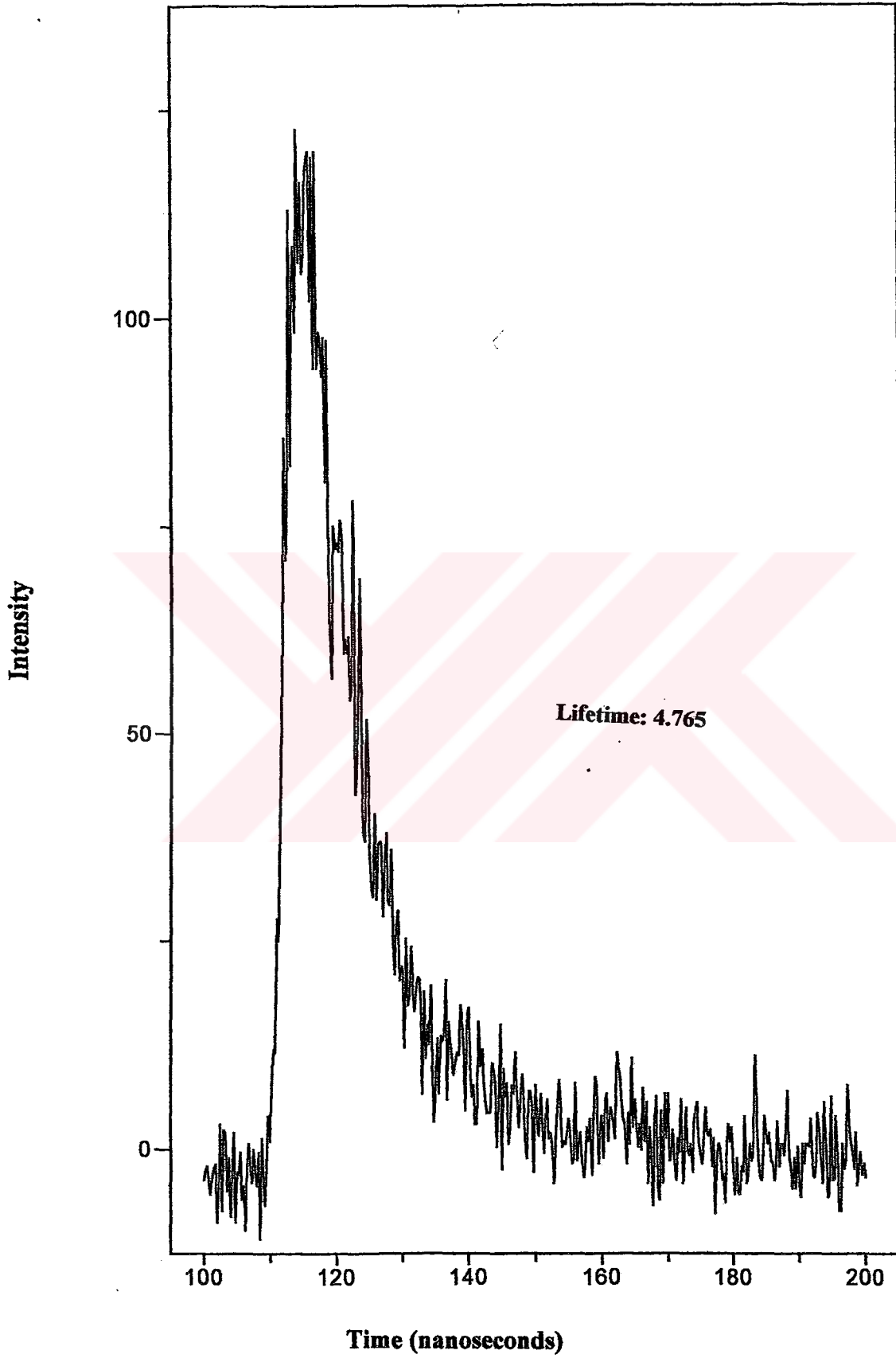
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	360nm'de Abs	PITC/BSA mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg BSA	1	0	0	
İşaretleme reaktifi : PITC	2	0	0	
PITC/BSA mol oranı : 50	3	0	0	
	4	0	0	
Toplam hacim 500µl	5	0,038	0,029	4
	6	0,128	0,121	18
Reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı	7	0,609	0,484	4
	8	0,278	0,216	4
	9	0,087	0,076	8
Reaksiyon süresi : 1 gece	10	0,063	0,053	6
	11	0,052	0,04	4
	12	0,042	0,042	
	13	0	0	
	14	0	0	



Şekil 4.16 Deneme 3P Fraksiyonları



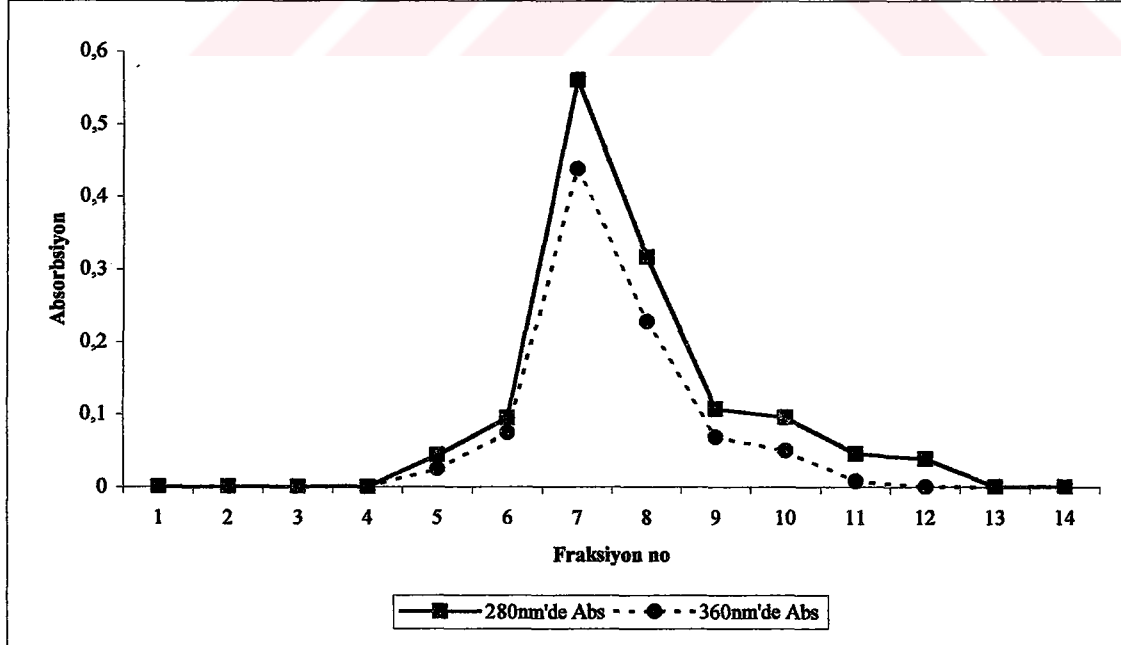
Şekil 4.17 Deneme 3P PITC-BSA (TRES)



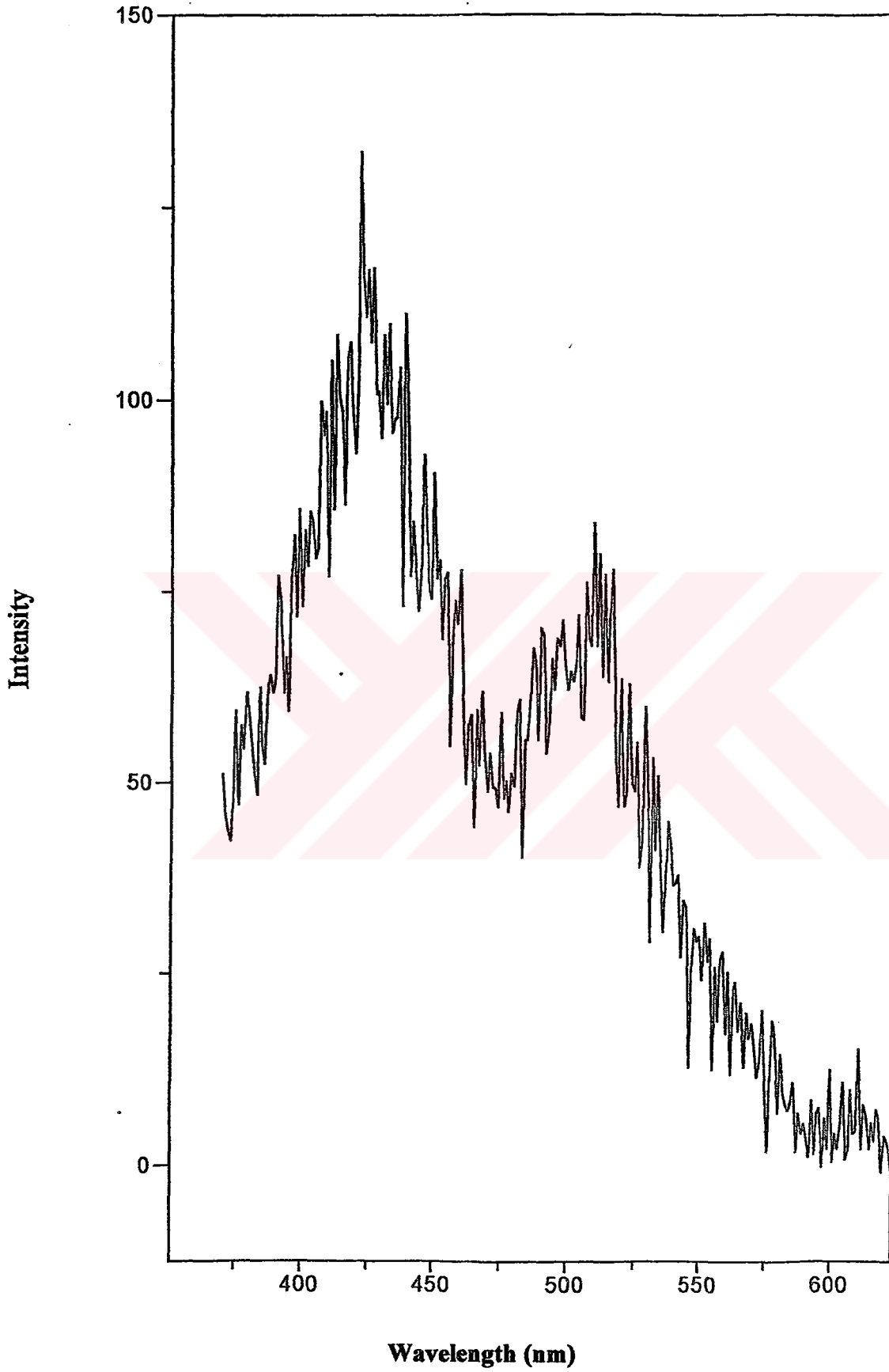
Şekil 4.18 Deneme 3P PITC-BSA (FL)

Çizege 4.13 Deneme 4P (PITC-BSA)

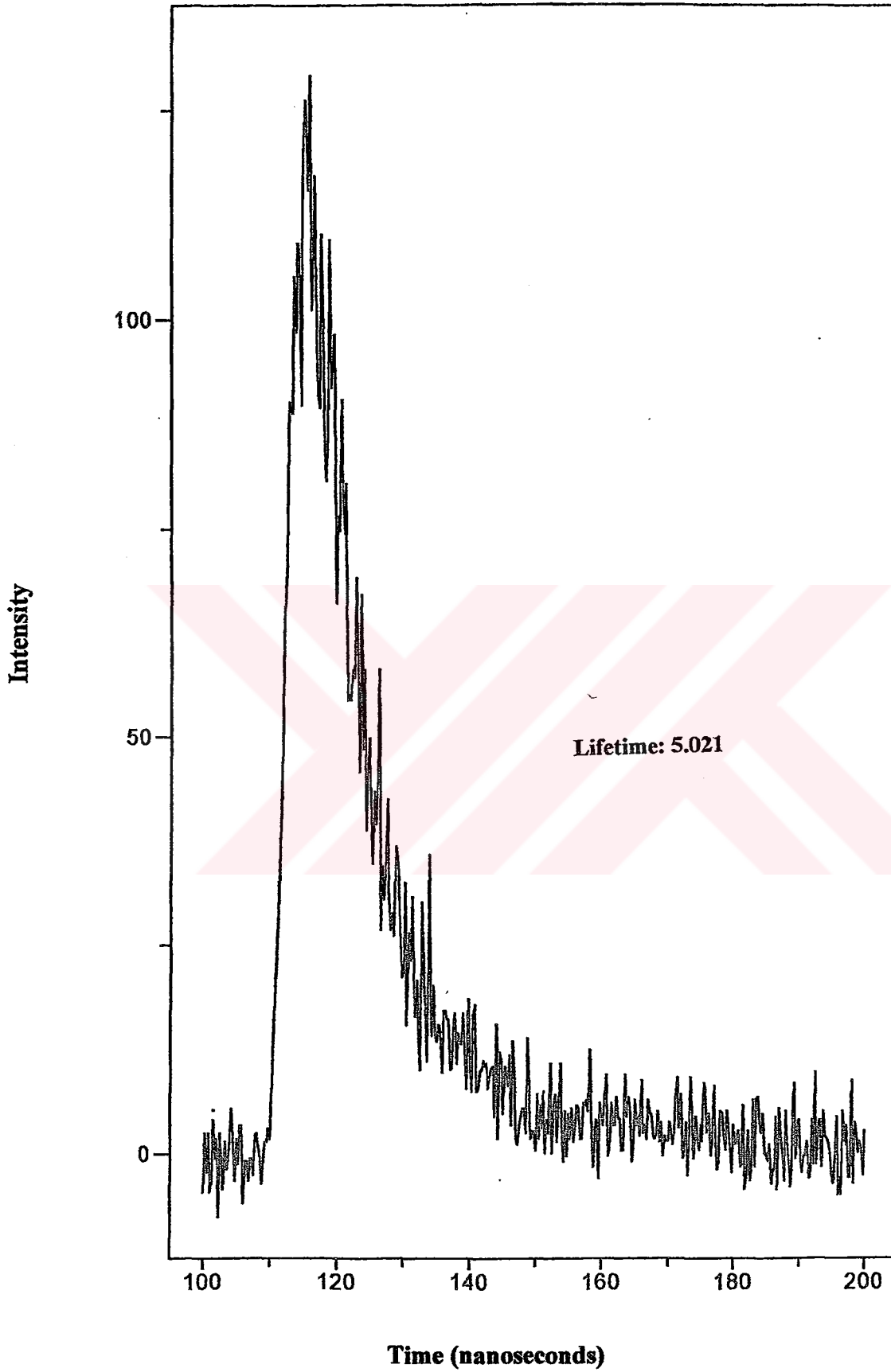
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTRASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	360nm'de Abs	PITC/BSA mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg BSA	1	0	0	
İşaretleme reaktifi : PITC	2	0	0	
PITC/BSA mol oranı : 100	3	0	0	
	4	0	0	
Toplam hacim 500µl	5	0,044	0,025	1
	6	0,095	0,075	4
Reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı	7	0,56	0,438	4
	8	0,317	0,228	3
	9	0,107	0,069	2
Reaksiyon süresi : 1 gece	10	0,096	0,05	1
	11	0,046	0,008	
	12	0,039	0	
	13	0	0	
	14	0	0	



Şekil 4.19 Deneme 4P Fraksiyonları



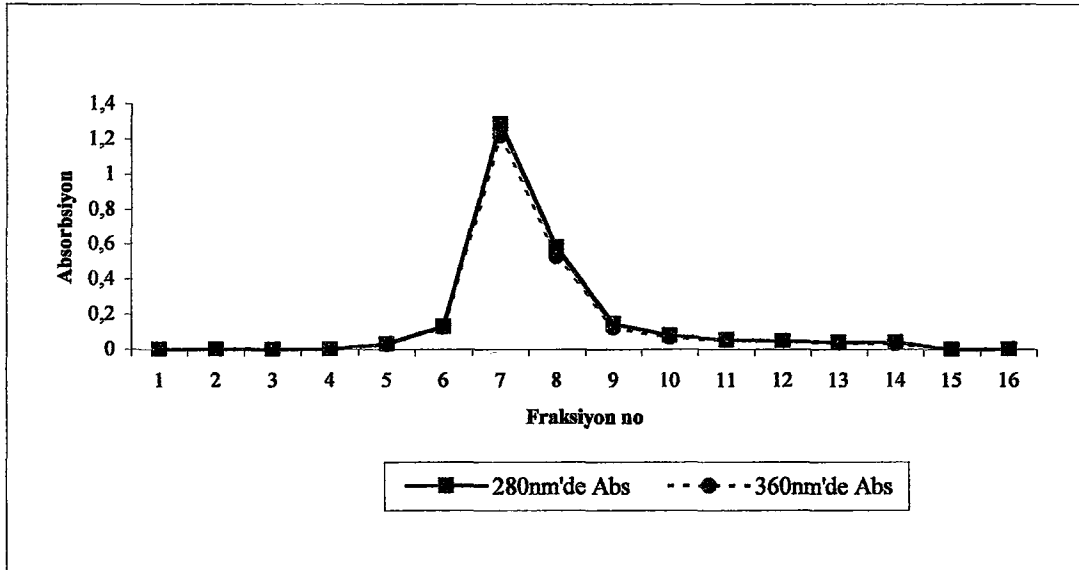
Şekil 4.20 Deneme 4P PITC-BSA (TRES)



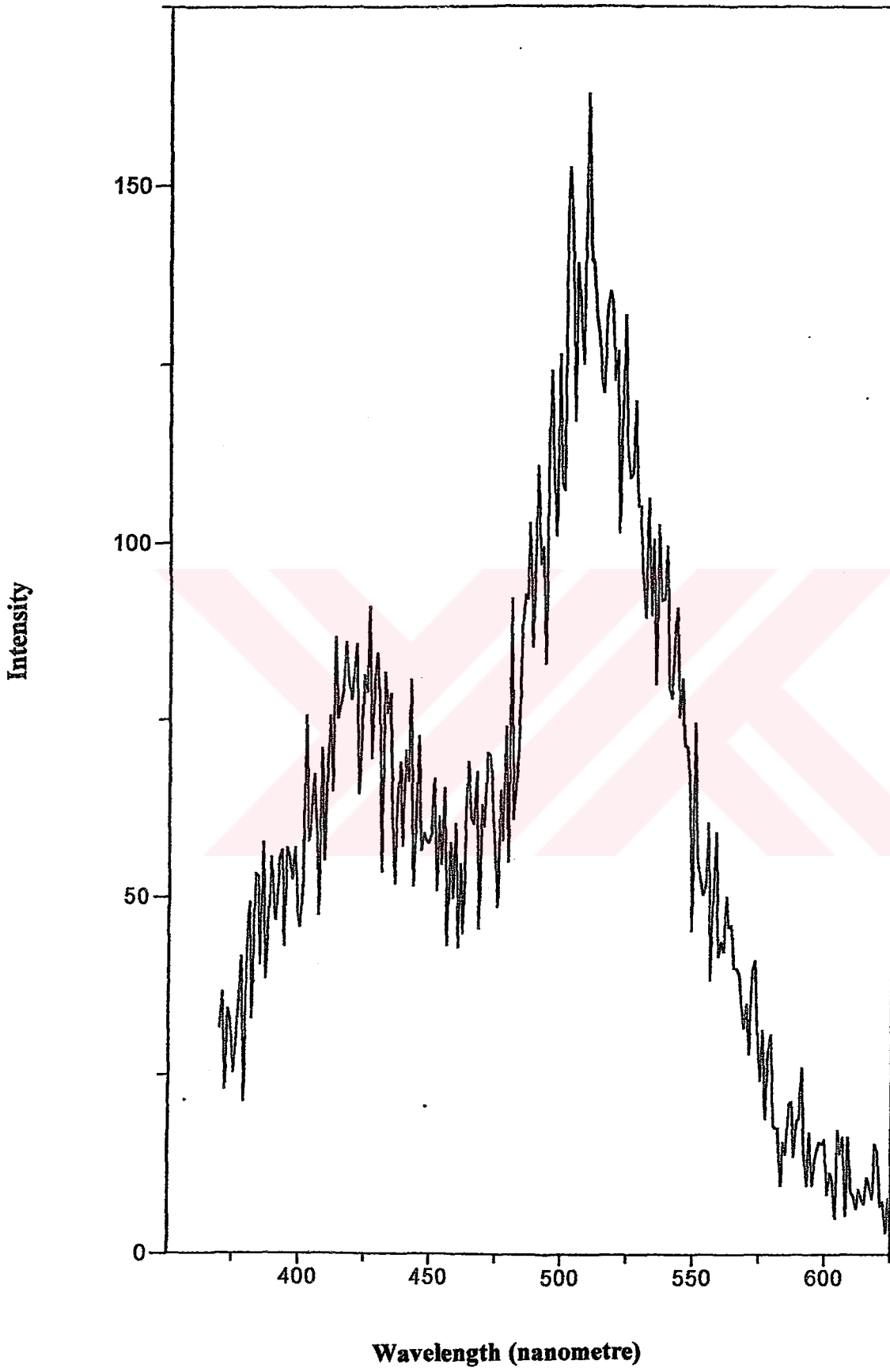
Şekil 4.21 Deneme 4P PITC-BSA (FL)

Çizelge 4.14 Deneme 5P (PITC-BSA)

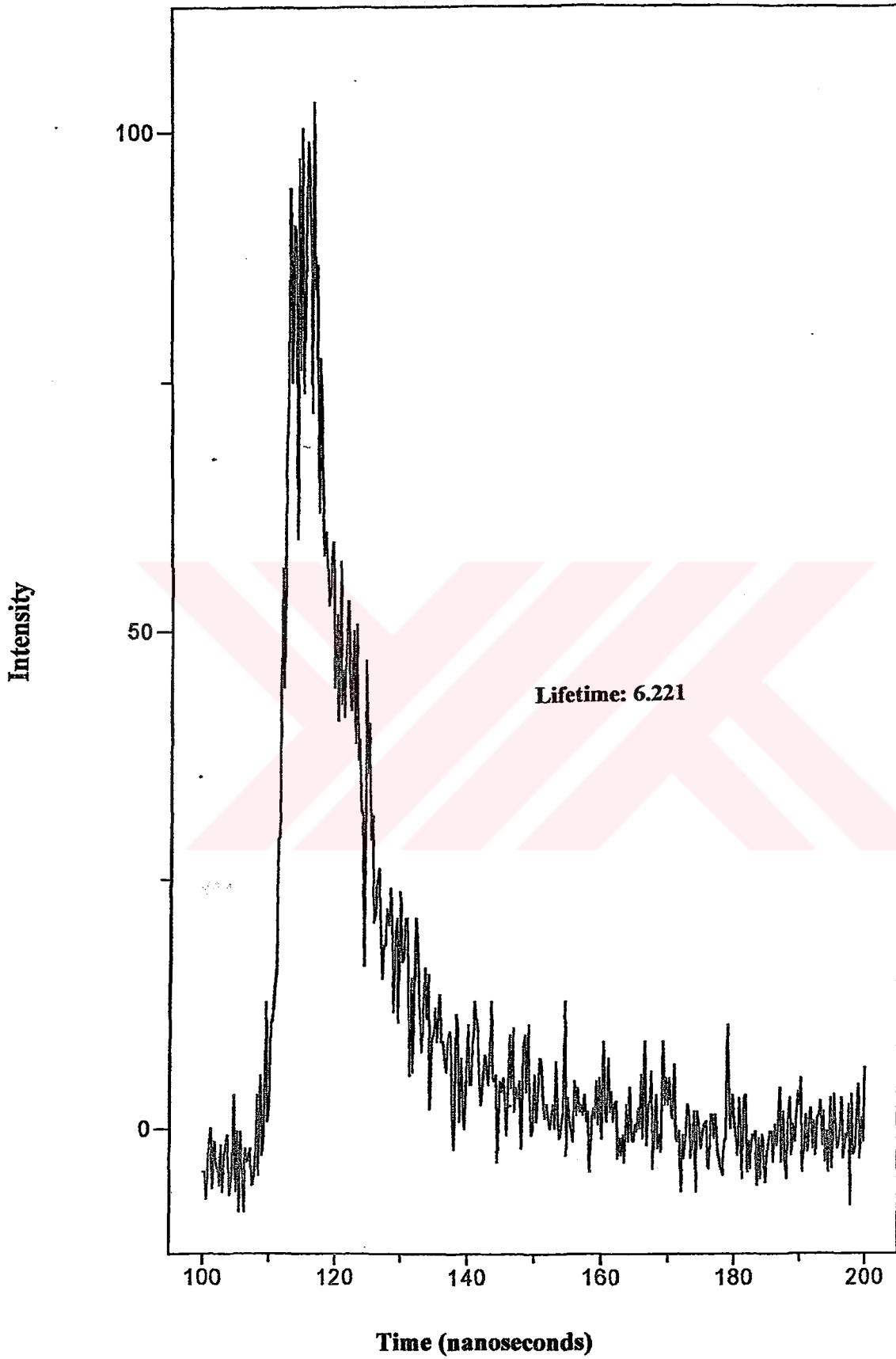
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTREASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	360nm'de Abs	PITC/BSA mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg BSA	1	0	0	
İşaretleme reaktifi : PITC	2	0	0	
PITC/BSA mol oranı : 200	3	0	0	
	4	0	0	
Toplam hacim 500µl	5	0,031	0,028	10
	6	0,133	0,128	24
Reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı	7	1,288	1,216	17
	8	0,584	0,528	10
Reaksiyon süresi : 1 gece	9	0,145	0,124	7
	10	0,082	0,069	6
	11	0,054	0,052	
	12	0,046	0,046	
	13	0,04	0,037	
	14	0,04	0,032	
	15	0	0	
	16	0	0	



Şekil 4.22 Deneme 5P Fraksiyonları



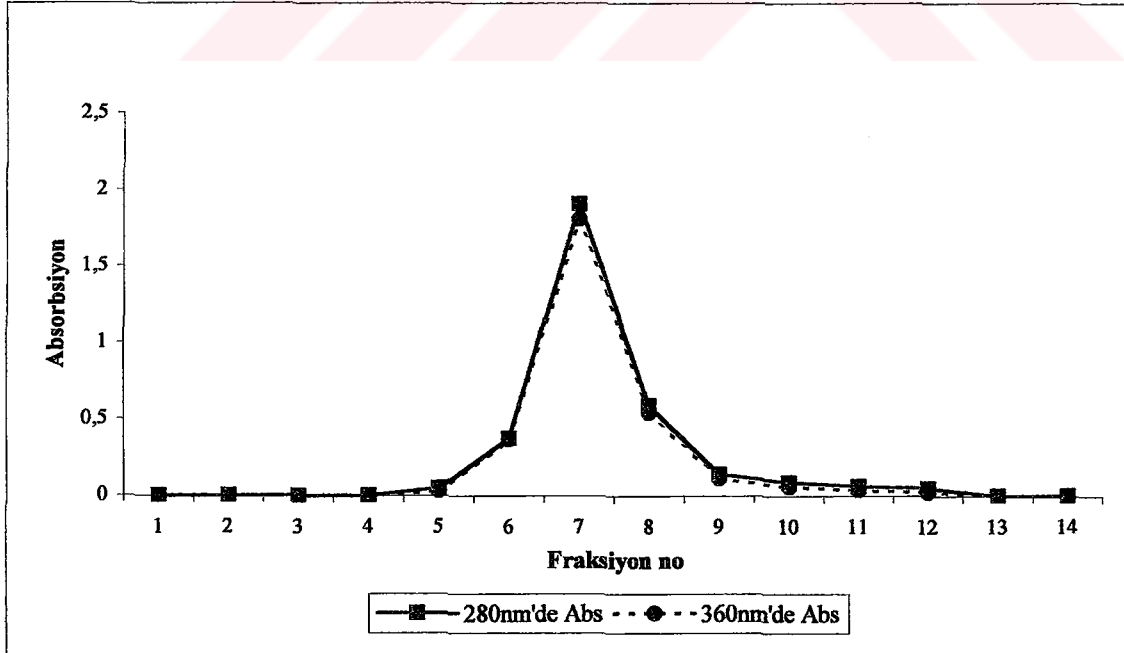
Şekil 4.23 Deneme 5P PITC-BSA (TRES)



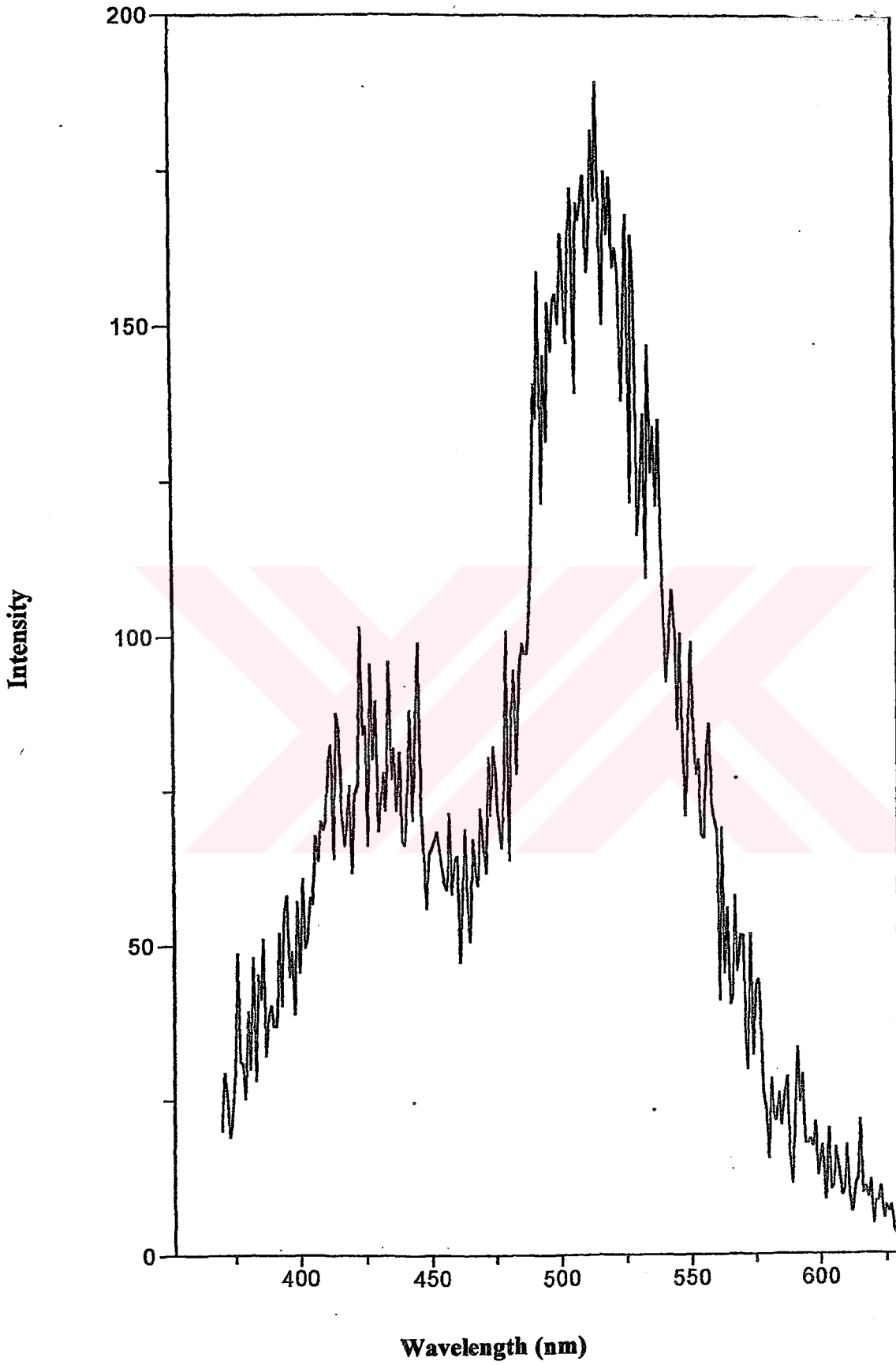
Şekil 4.24 Deneme 5P PITC-BSA (FL)

Çizelge 4.15 Deneme 6P (PITC-BSA)

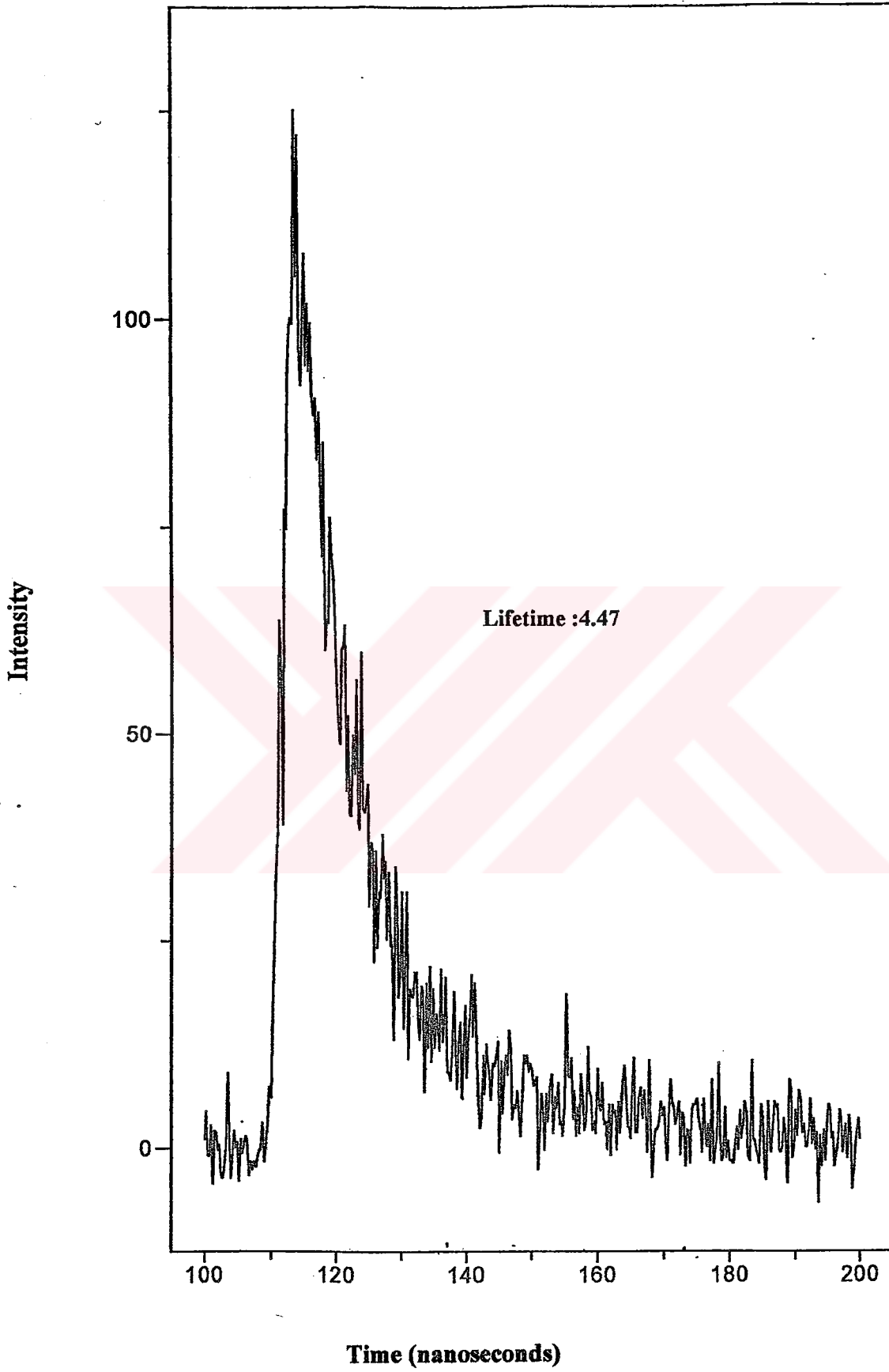
REAKSİYON KOŞULLARI	JEL FİLTRASYON SONUÇLARI			
	Fraksiyon no	280nm'de Abs	360nm'de Abs	PITC/BSA mol oranı
İşaretlenen : 0.5 mg BSA	1	0	0	
İşaretleme reaktifi : PITC	2	0	0	
PITC/BSA mol oranı : 300	3	0	0	
	4	0	0	
Toplam hacim 500 µl	5	0,05	0,03	2
	6	0,376	0,368	
Reaksiyon sıcaklığı: oda sıcaklığı	7	1,908	1,804	18
	8	0,589	0,543	13
	9	0,144	0,112	4
Reaksiyon süresi : 1 gece	10	0,086	0,059	2
	11	0,061	0,037	2
	12	0,051	0,026	1
	13	0	0	
	14	0	0	



Şekil 4.25 Deneme 6P Fraksiyonları



Şekil 4.26 Deneme 6P PITC-BSA (TRES)



Şekil 4.27 Deneme 6P PITC-BSA (FL)

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada Fluoresein izotiyosiyanatın (FITC) BSA örneklerine tiyoüre bağı oluşumu ile kovalent olarak bağlanması sağlandı. Reaksiyon 37 °C, 42 °C ve oda sıcaklığında farklı süreler bekletilerek gerçekleştirildi. FTIC/BSA mol oranının bağlanmaya etkisi incelendi. Reaksiyon içeriği jel filtrasyon ile fraksiyonlara ayrıldı. Fraksiyonlarda A₂₈₀ ve A₄₉₅ değerleri ölçüldü ve grafikler ile sonuçlar kıyaslandı.

Alınan anti-CD 4 antikor örneği antikor haricinde bulundurduğu proteinleri uzaklaştırmak amacıyla "protein A" kolonu ile saflaştırıldı. Anti-CD 4 antikoru FITC ile işaretlendi. Jel filtrasyon ile elde edilen fraksiyonlardan oluşturulan havuz örneği liyofilizatör ile derişiklendirildi. Sonuçta elde edilen işaretli antikorun "flow-cytometry" kullanılarak lenfositlere bağlanması gözlendi, işaretli antikorun hücre yüzeyine bağlanmadığı sonucu alındı.

Anti-CD 8 antikor örneği saflaştırma ön işlemleri yapılmadan FITC ile işaretlendi. Bağlanmamış FITC bulundurmadığı düşünölen işaretli antikorun, jel filtrasyon fraksiyonlarından elde edilen havuz örneği "flow-cytometry" de denendi. Bu denemede anti-CD 8 antikorlarının hücre yüzeylerine bağlandığı göröldü.

BSA örnekleri farklı reaktif/BSA mol oranları uygulanarak, oda sıcaklığında 1 gece bekleme ile gerçekleşen reaksiyon sonucu pirenil izotiyosiyanat (PITC) ile işaretlendi. Tiyoüre bağı oluşumu ile gerçekleşen işaretleme reaksiyonu çözeltisi jel filtrasyon ile fraksiyonlara ayrıldı ve böylece bağlanmamış pirenil izotiyosiyanat uzaklaştırıldı. Seçilen fraksiyonlardan oluşturulan havuz örneklerinin A₂₈₀ ve A₃₆₀ değerleri belirlendi. "Time Master" spektroförometre ile fluoresans bozunma grafikleri (Decay) alındı ve fluoresans ömrü değerleri hesaplandı. Ayrıca örneklerin zaman-ayırımı fluoresans spektrumları (TRES) de elde edildi. Anti CD 8 antikorlarının da pirenil izotiyosiyanat ile işaretleme yapıldı aynı fluoresans aleti ile sonuçlar incelendi.

Bu pratik çalışmalar, gerçekleştirilen işaretleme reaksiyonlarının incelenmesi ve fluoresans sonuçlarının kıyaslanması yanında biyokimya alanında yeni bir tekniğin kullanılması konusunda fayda sağladı.

KAYNAKLAR

- Andrade. W.N., Jonsthon. M.G., High. J.B., (1998), "The Relationship of Blood Lymphocytes to the Recirculating Lymphocyte Pool", *Blood*, 91: 1653-1661.
- Barber. E.K., Dasgupta. J., Schlossman. S.F., Trevillyan. J.M., Rudd. C.A., (1989), "The CD 4 and CD 8 Antigens are Coupled to a Protein-Tyrosine Kinase p56^{lck} That Phosphorylates the CD 3 Complex", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 3277-3281.
- Bikoue. A., George. F., Poncelet. P., Mutin. M., Janossi. G., Sampol. J., (1996), "Quantitative Analysis of Leukocyte Membrane Antigen Expression: Normal Adult Values", *Cytometry*, 26: 137-147.
- Bouzigue.M., Pichon.V., Hennion.M., (1999), "Class-Selective Immunosorbent for Trace-Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Complex Sample Matrices, Used in Off-Line Procedure or On-line Coupled with Liquid Chromatography/Fluorescence and Diode Array Detections in Series", *Environ.Sci.Technol.*,33:1916-1925.
- Coons.A.H., (1956), "Histochemistry with Label Antibody", *International.Rev.Cytol.*, 5:1-23.
- Csortos.C., Matko.J., Erdodi.F., Pal.G., (1990), "Reaction of the Catalytic Subunits of Protein Phosphatase-1 and 2A with Inhibitor-1 and 2: A Fluorescent Study with Sulfhydryl-Specific Pyrene Maleimide", *Biochemical and Biophysical Research Communication* , 169:559-564.
- Demchenko,A.P., (2000), *Fluorescence Probes in Molecular and Cellular Biophysics*, Lecture 1, TÜBİTAK, Marmara Research Center, Gebze.
- Der-Balian.G.P., Kameda.N.,Rowley.G.L., (1988), "Fluorescein Labeling of Fab' While Single Thiol", *Analytical Biochemistry* , 173:59-63.
- Frank. G.D., Parnes.J.R., (1998), "The Level of CD 4 Surface Protein Influences T Cell Selection in the Thymus", *The Journal of Immunology*, 160: 634-642.
- Hemmilä.I., (1985), "Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays", *Clm.Chem.*, 33(3):359-370
- Imaizumi.M., Harada.M., Sisido.M., (1995), "Fluorescence Behavior of Pyrenyl Groups Bound to Anti-Pyrenyl Antibody", *J.Phys.Chem.*99:3810-3814.
- Karşıluyan.H., Hemmilä.I., Takalo.H., Toivonen.A., Pettersson.K., Lövgren.T., Mukkala.V.M., (1997), "Influence of Coupling Method on the Luminescence Properties, Coupling Efficiency, and Binding Affinity of Antibodies Labeled with Europium(III) Chelates", *Bioconjugate Chem.*, 8:71-75.
- Knopp.J., Weber.G., (1967), "Fluorescence Depolarization Measurements on Pyrene Butyric-Bovine Serum Albumin Conjugates", *The Journal of Biological Chemistry.*, 242:1353-1359.
- Knopp.J., Weber.G., (1969), "Fluorescence Polarization of Pyrenebutyric-Bovine Serum Albumin and Pyrenebutyric-Human Macroglobulin Conjugates", *The Journal of Biological Chemistry*, 244:6309-6315.
- Kranz.D.M., Herron.J.N., Voss.E.W., (1982), "Mechanisms of Ligand Binding by Monoclonal Anti-Fluorescyl Antibodies", *The Journal of Biological Chemistry*, 257:6987-6995.

- Lakowich, J.R., (1986), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Chapter 1, Plenum Press, New York.
- Little, M.J., Paquette, D.M., Harvey, M.N., Banks, P.R., (1997), "Single-Label Fluorescent Derivatization of Peptides", *Analytica Chimica Acta*, 339:279-288.
- Micheel, B., Jantscheff, P., Böttger, V., Scharfe, G., Kaiser, G., Stolley, P., Karawajew, L., (1988), "The production and Radioimmunoassay Application of Monoclonal Antibodies to Fluorescein Isothiocyanate", 111:89-94.
- McClure, M. O., Sattentau, Q.J., Weiss, R.A., Beverley, P.C.L., Hearn, J.P., Fitzgerald, A. K., Zuckerman, A.J., (1987), "HIV Infection of Primate Lymphocytes and Conservation of the CD 4 Receptor", *Nature*, 330:487-489.
- McDevitt, H.O., Peters, J.H., Pollard, L.W., Harter, J.G., Coons, A.H., (1962), "Purification and Analysis of Fluorescein-Labeled Antisera by Column Chromatography", *J. Immunol.*, 90:634-642.
- Mukkala, V.M., (1993), *Development of Stable, Photoluminescent Europium (III) and Terbium(III) Chelates Suitable as Markers in Bioaffinity Assays; Their Synthesis and Luminescence Properties*, Department of Chemistry University of Turku, Finland.
- Noble, A., Pestano, G.A., Cantor, H., (1998), "Suppression of Immune Responses by CD 8 Cells. 1. Superantigen-Activated CD 8 Cells Induce Unidirectional Fas-Mediated Apoptosis of Antigen-Activated CD 4 Cells", *The Journal of Immunology*, 159: 559-565.
- Prince, H.E., York, J., Kuttner, D.K., (1994), "Reduction of Escapee Formation in Flow Cytometric Analysis of Lymphocyte Subsets", *Journal of Immunological Methods*, 177: 165-173.
- Reif, O.W., Lausch, R., Scheper, T., Freitag, R., (1994), "Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Protein G as an Affinity Ligand in Affinity/Immuncapillary Electrophoresis with Fluorescence Detection", *Anal. Chem.*, 66:4027-4033.
- Rowley, G.L., Henriksson, T., Louie, A., Nguyen, P.H., Kramer, M., Der-Balian, G., Kameda, M., (1987), "Sensitive Fluoroimmunoassays for Ferritin and IgE", *Clinical Chemistry*, 33:1563-1565.
- Sattentau, Q.J., Dalglish, A.G., Weiss, R.A., Beverley, P.C.L., (1986), "Epitopes of the CD 4 Antigen and HIV Infection", *Science*, 234: 1120-1127.
- Siemiarczuk, A., (2000), *Fluorescence Probes in Molecular and Cellular Biophysics*, Lecture 1, TÜBİTAK, Marmara Research Center, Gebze.
- Soini, E., Hemmilä, I., (1979), "Fluoroimmunoassay: Present Status and Key Problems" *Clin. Chem.*, 25(3):353-361.
- Telser, J., Cruickshank, A.K., Morrison, L.E., Netzel, T.L., Chan, Chi-kin, (1989), "DNA Duplexes Covalently Labeled at Two Sites: Synthesis and Characterization by Steady-State and Time-Resolved Optical Spectroscopies", *J. Am. Chem. Soc.*, 111:7226-7232.
- The, T.H., Feltkamp, T.E.W., (1970), "Conjugation of Fluorescein Isothiocyanate to Antibodies", *Immunology*, 18: 865-873.
-

Tsuchida. M., Konishi. M., Jojima. K., Naito. K., Fujikura. Y., Fukumoto. T., (1994), "Analysis of Cell Surfaces Antigens on Glucocorticoid-Treated Rat Thymocytes with Monoclonal Antibodies", Immunology Letters, 39: 209-217.

Veillette. A., Bookman. M.A., Horak.E.V., Samelson. M.E., Bolen. J.B., (1989), "Signal Transduction Through the CD 4 Receptor Involves the Activation of the Internal Membrane Tyrosine-Protein Kinase p56^{lck}", Nature, 338: 257-259.

Weltman.J.K., Szaro.R.P., Frackelton.A.R., Dowben.R.M., (1973), "N-(3-Pyrene) Maleimide:a Long Lifetime Fluorescent Sulfhydryl Reagent", The Journal of Biological Chemistry, 248:3173-3177.

White. D.W., Harty. J.T., (1998), "Perforin-Deficient CD 8⁺ T Cells Provide Immunity to Listeria Monocytogenes by a Mechanism That is Independent of CD 95 and IFN- γ but Requires TNF- α ¹", The Journal of Immunology, 160: 898-905.

Yılmaz. T.M., Deniz. G., (1999), Flow Cytometry ve Tıpta Kullanımı, İstanbul.



ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 11.07.1969
Doğum yeri İstanbul
Lise 1987-1990 İstanbul Vefa Lisesi
Lisans 1991-1997 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
Yüksek Lisans 1997-2001 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programı
Çalıştığı Kurumlar
1999-Devam Ediyor YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMAN İZLENİM BİRİMİ