

A₂₂ VE O₁ TİPİ ŞAP VİRÜSÜ AŞI SUŞLARININ 146S 12S PARTİKÜLERİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ^(*)

Production of monoclonal antibodies against 146S and 12S particles of A₂₂ and O₁ types vaccine strains of FMDV

S. İsmet GÜRHAN^(**) Burhan GÜRHAN^(**) Gülhan AYNAGÖZ^(**)
Nilay ÜNAL^(**) Gülnur ÜNVER^(**) Sinan AKTAŞ^(**)

ÖZET

Şap hastalığına yönelik serolojik ve immunolojik testlerde kullanmak üzere, Türkiye'de uygulanan şap virüsü aşı suşlarının (O₁ Man 69 ve A₂₂ Mah 65) 146S ve 12S partiküllerine karşı monoklonal antikorlar üretildi.

Burada, standard immunizasyon protokoluna göre immunize edilen Balb/c farelerin dalak hücreleri ile NSO myelome hücrelerine PEG4000 varlığında fuzyon uygulandı. Oluşan hibridoma kolonileri indirekt ELISA yöntemi ile kontrol edildi. Seçilen pozitif klonlar in vitro çoğaltıldı. Sonuçta A₂₂ Mah65 ve O₁ Man69 şap virüsü suşlarının 146S ve 12S partiküllerine karşı monoklonal antikor salgılayan toplam 170 adet hibridoma klonu, (12 adet A₂₂ 146S, 10 adet A₂₂ 12S, 17 adet O₁ 146S ve 113 adet O₁ 12S) elde edildi ve sıvı azot içerisinde (-196°C)de dondurularak stoklandı.

SUMMARY

The aim of this study is to produce mAbs against 146S and 12S particles of FMDV vaccine strains (A₂₂Mah 65 and O₁ Man 69) to be used in serological and immunological tests for FMD.

The spleen cells of Balb/c mice, immunized in accordance with the stan-

* Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) desteği ile gerçekleştirilmiştir.

**Şap Enstitüsü P.K. 714 06044 ANKARA

dard immunization protocol and NSO mouse myeloma cells were fused in the presence of PEG 4000 as fusing agent. Hybridoma colonies were screened for antigen specificity by indirect enzymelinked immunosorbant assay (ELISA). Selected positive clones were produced in vitro. As a result, totally 170 MAb producing hybridoma clones against 146S and 12S particles of A₂₂Mah 65 and O₁Man 69 (12 for A₂₂ 146S, 10 for A₂₂ 12S, 17 for O₁ Man 69 146S and 113 for O₁Man 69 12S) were produced and stored in liquid nitrogen (-196°C)

GİRİŞ

Monoklonal antikor (Mab) üretimi teknolojisi Köhler ve Milstein'in 1975'de, hücre fuzyonu tekniklerinin, önceden belirlenmiş bir antijenik determinatına karşı spesifik antikor üretiminde kullanılabileceğini bildirmeleri ile başlamıştır. Bu araştırmacılar, aynı antijene karşı farklı antikorlar üreten farklı hibrid suşlarının elde edilmesinin mümkün olduğunu da göstermişlerdir. Sonraki yıllarda bu temelden hareket edilerek pek çok antijene karşı Mab üretilmiştir.

Şap viruslarına karşı spesifik Mab üretimi ilk olarak 1982 de tanımlanmıştır(18). Bu Mab'lar teşhis amaçlı kullanılabileceği gibi antijenik varyasyonların belirlenmesi ve aşuların potens tayini gibi amaçlarla da kullanılmaya başlanılmıştır (6,24,25,30).

Doku kültürlerinde üretilen şap viruslarının tam virionu viral RNA'yı içerir ve 146Spartikülü olarak tanımlanır. 146S partikülleri kimyasal ve fiziksel faktörler (ısı, pH, hücresele proteolitik enzimler, vb.) ile 12S partiküllerine dönüşebilirler. 12S partikülleri sadece internal kapsid protein VP4'ü içerir (29). Bu özellik, inaktif aşı hazırlanmasında ve muhafazasında stabil pH ve ısının önemini göstermektedir.

Diğer pek çok şap virusu suşu arasında O₁Mansia 1969 suşuna karşı da çeşitli Mab'ların üretildiği bildirilmiştir, ancak henüz A₂₂Mahmatlı 1965'e karşı hazırlanmış Mab tanımlanmamıştır (8).

Bu araştırma ile Ankara Şap Enstitüsü'nün aşı suşu olan O₁Manisa 1969 ve A₂₂Mahmatlı 1964'ün 146S ve 12S partiküllerine karşı Mab salgılayan hibridoma hücre kültürlerinin elde edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Virus: A₂₂ Mahmatlı 65 ve O₁ Manisa 69 virus suşları BHK21 monolayer hücre kültürlerinde roller sistemde çoğaltıldı.

146S antijenlerinin purifikasyonu: Şap virus suşlarının 146S partikülleri sucrose density gradient ile purifiye edildi (9).

12S antijenlerinin hazırlanması: Bu amaçla 146S partiküllerinin düşük pH değerlerinde parçalanması özelliğinden yararlanılarak Crowter'in (Crowter, J.R., 1987) bildirdiği yöntem uygulandı.

Fare: Immunizasyon ve makrofaj kültürü hazırlanması amacıyla Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan Balb/c fareler kullanıldı.

Myeloma Hücreleri: NSO myeloma hücreleri IAH (Institute of Animal Health), Pirbright, İngiltere'den temin edildi. Fuzyonda kullanılmadan önce bakteriyel ve mikoplazmal kontaminasyonlar yönünden sterilite testleri ile 8-Azaguanin'e dirençlilik, selektif vasata duyarlılık kontrolleri yapıldı. 8-Azaguanin'e dirençlilik kontrolü %0.5; 1.0; 1.5 ve 2.0 oranlarında 8-Azaguanin (Sigma, A.B.D.) içeren üretme vasatında canlılık ve üremenin incelenmesi ile gerçekleştirildi.

Selektif vasata duyarlılık kontrolü: Bu amaçla selektif ve nonselektif (kontrol) vasatlarda 10⁻⁸ dilusyonda hazırlanan myeloma hücre kültürleri 1 hafta süre ile %5 CO₂ 37°C ortamda inkube edildi ve günlük kontrollerle hücre ölümleri, kontrol karşısında gözlendi.

Myeloma hücreleri fuzyondan 7 gün önce sıvı azottan çıkartılarak 3-4 pasaj ile stasyonier kültürlerde 25,75 ve 150 cm² yüzeyli polipropilen kültür kaplarında çoğaltıldı. Fuzyon günü aktif üreme fazında olmalarına özen gösterildi.

Serum: Üretme ve selektif vasatların hazırlanmasında değişen oranlarda (%2,5-10) fetal dana serumu (FBS), fuzyon sonrası selektif vasatlarda ayrıca %10 oranında at serumu (HS) kullanıldı. Serumlar kullanılmadan önce 56°C de 30 dakika bekletilerek inaktive edildi.

Araştırmanın ilk aşamasında farklı seri numaralı serum numuneleri arasından en uygun olanının seçimi için şu testler uygulandı:

a.Sterilite: İnaktive edilmemiş serum numuneleri bakteriyel ve mikoplazmal kontaminasyonlar yönünden kontrol edildi.

b.Cloning efficiency: Bu amaçla üretme vasatına %10 ve 20 oranında ilave edilen serumun, "dilution plating" tekniği ile 96 gözlü doku kültürü kaplarında

hazırlanan Myeloma hücrelerinin tek hücreden koloni oluşturmalarına etkisi karşılaştırmalı olarak incelendi ve en yüksek değeri veren serum numuneleri ayrıldı (21).

c.Dalak hücre kültürüne etkisi:Bu amaçla 1 adet Balb/c fareden hazırlanan dalak hücre kültürü %10 ve 20 serumlu üretim vasatlarında 7 gün süre ile %5 CO₂ 37°C de inkube edildi ve günlük kontrollerle hücrelerin canlılıklarını devam ettirme süreleri incelendi.

Vasatlar:

a)Serumsuz vasat: DMEM/F12 nutrient mixture (Sigma, A.B.D.) veya RPMI 1640 (GIBCO A.B.D.)

b)Üretim Vasatı: Myeloma hücre kültürü için DMEM/F12 (%10 FBS, %1 8-Azaguanine), hibridoma hücre kültürleri için DMEM/F12 (%10 FBS, 1 mM HEPES) veya RPMI 1640 (%10 FBS).

c)Monoklonal antikor üretimi amacıyla hibridoma hücre kültürlerinin hacim büyütülerek üretilmesinde DMEM/F12 (%7.5-2.5 FBS)

d)HAT Selektif Vasat: DMEM/F12(%10 F, %10 HS, 1mM HEPES; 1x10⁻⁴M hypoxanthine (H), 4x10⁻⁷M aminopterin (A)1, 6x10⁻⁵M thymidine (T) veya RPMI 1640 (%10FBS, %10HS, 1x10⁻⁴M H. 4x10⁻⁷M A, 1.6x10⁻⁵ M T)

e)HT selektif vasat: HAT selektif vasatından aminopterin çıkartılarak hazırlandı.

f)Hibridoma hücrelerinin dondurma vasatı: Bu amaçla %90 FBS ve %10 DMSO (dimethyl sulphoxide) kullanıldı.

Dondurma vasatı dışındaki tüm vasatlarda kullanılacakları zaman %1 gentamicin sol (5 µg/ml) ilave edildi.

Polyethyleneglycole (PEG): Bu amaçla 1 gr PEG 4000 (Merck Almanya) 1 ml PBS (Dulbecco's phosphat buffered salin) ile karıştırılarak 1atm'de 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanıldı.

Dalak hücre kültürü (feeder-layer): Bu amaçla immunize edilmemiş bir adet Balb/c fare omurganın dislokasyonu ile öldürüldükten sonra dalağı steril olarak alındı. 5 cm çaplı petri kutusundaki tel süzgeçten ezilerek PBS yardımı ile hücrelerin ayrılması sağlandı. Santrifugasyon tekniği ile iki kez PBS ile yıkandı ve pelet üretim vasatı içerisinde homojenize edildi. Canlılık, yoğunluk ve sterilitte kontrolleri yapıldıktan sonra 4°C'de muhafaza edildi. Fuzyon ya da klonlamada kullanılmadan bir gün önce üretim vasatı içerisinde 1-5x10⁻⁴ hücre olacak şekilde

dilue edilerek kültür kaplarına taksim edildi ve %5 CO₂ 37°C'de inkubasyona bırakıldı.

İmmunizasyon: Her inokulasyonda A(A₂₂ Mah.65) 146S ve A 12S antijenleri 40 µg/fare, O(O₁ Man.69) 146S ve O 12S antijenleri 50 µg/fare olarak kullanıldı. Her antijen için 3 kez inokulasyon yapıldı. Birinci inokulasyon eşit hacimde Freund's complete adjuvant ile antijen karışımı (0.2 ml/fare) subcutan yolla uygulandı, 3 hafta sonra ikinci ve bir hafta sonra üçüncü inokulasyonlar adjuvan ilave edilmeksizin 0.2 ml/fare intraperitoneal olarak verildi. Her antijen için 4 fare kullanıldı.

Fuzyon: Üçüncü immünizasyonu izleyen ikinci ve üçüncü günlerde gerçekleştirildi. Fuzyon işlemi Butchaiah ve Rao (Butchaiah, G., Rao, B.U., 1989) nun bildirdiği şekilde uygulandı. Fuzyon sonrası HAT selektif vasat içinde hazırlanan hücre suspansiyonu feeder layer içeren ya da içermeyen 96 gözlü kültür kaplarına (50 µg/göz) ve 24 gözlü kültür kaplarına 0.5 ml/göz taksim edildikten sonra %5 CO₂ 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Her fuzyonda selektif vasatı kontrol amacı ile en az 4 adet göze sadece myeloma hücresi konuldu. İlk üç fuzyondan sonra hibridoma oluşumu için sadece 24 gözlü kültür kapları kullanıldı. Fuzyonu izleyen dördüncü günden başlayarak hibridoma oluşumunu saptamak üzere tüm gözler her gün incelendi. Fuzyonun dördüncü ve yedinci gününde tüm gözler HAT selektif vasat ilave edildi, daha sonra haftada iki kez HT selektif vasat ile vasat değiştirildi. Onbeşinci günden başlayarak bu amaçla sadece üretim vasatı kullanıldı.

Fuzyonu izleyen 2-4 hafta içerisinde hibridoma oluşan gözler işaretlendi ve %40-60 oranında yüzeyi kapladıkları zaman vasat numuneleri antikor varlığı yönünden test edildi.

Hibridoma Kültürlerinin Klonlanması: Test sonucu antikor salgılayan hibridomaları içerdiği belirlenen gözler dilüsyon tekniği ile feeder layer içeren ya da içermeyen 96 gözlü kültür kaplarında klonlandı (19). Tek hücreden oluşan koloni veren gözler Mab varlığı yönünden test edildi ve pozitif yanıt içeren gözler daha sonra sırasıyla 24 gözlü, 25 cm² ve 75 cm² yüzeyli kültür kaplarında pasajlandı.

Hibridoma Kültürlerinin Dondurularak Saklanması: Klonlamadan sonra 24 gözlü ve 25 cm² yüzeyli kültür kaplarında üreyen hibridoma hücreleri ... dan önce dondurma vasatı içinde 2-4 ampul, -196°C'de stoklandı.

Bu işlem in vitro üretimin ileriki safhalarında da yinelenmiştir.

İndirekt ELISA: Monoklonal antikor salgılayan hibridomaların belirlenmesi amacı ile spot test şeklinde uygulandı (18). Bu amaçla Nunc immunoplatelere, solid fazda antijen (146S veya 12S) karbonat-bicarbonat buffer, pH 9.6 içerisinde 40 µg/ml dilüe edildi. Bir gece 4°C'de inkubasyondan sonra PBS/T20/BSA (%0.5 Tween 20 ve %3 sığır serum albumin içeren PBS) (pH 7.4) ile 5 kez yıkandı ve 50 µg/ml hibridoma vasatı ilave edilerek 37°C'de 2 saat inkube edildi. PBS ile yıkanan gözlere daha sonra peroxidase ile konjuge edilmiş tavşan anti-mouse IgG (Sigma, A.B.D.) ile tekrar 2 saat 37°C'de inkube edildi ve yıkandıktan sonra diamine/hydrogene peroxide substrate ilave edildi (100 µl/göz). Reaksiyon 15 dakika sonra 100 µl/göz 1 M H₂SO₄ ilavesi ile durduruldu ve 492 nm dalga boyunda (spektrofotometrede) absorbans ölçüldü. Negatif kontrol olarak myeloma hücrelerinin kullanılmış vasatı, immunize edilmemiş fare kan serumu ve üretme vasatı, pozitif kontrol olarak immun fare kan serumu kullanıldı.

Değerlendirmede negatif kontrollerin ortalamasının üzerindeki değerler pozitif kabul edildi. İndirekt ELISA ilk hibridoma klonu için değişik safhalarda en az üç kez tekrarlandı.

Monoklonal Antikor Üretimi: Bu amaçla 25 cm² yüzeyli kültür kaplarında üretilen hibridoma hücreleri 75 ve 150 cm² yüzeyli flasklarda çoğaltıldı ve 100-150 ml hacime ulaştıklarında hücre üremesinin başlamasına kadar 4-5 gün 37°C'de bekletildi. Daha sonra kültürler, klarifikasyona kadar 4°C'de bekletildiler. In vitro Mab üretiminde vasattaki FBS oranı kademeli olarak %2.5'a kadar azaltıldı.

Monoklonal Antikorların Klarifikasyonu: Bu amaçla 4°C'de muhafaza edilen hibridoma vasat sıvıları 3000 rpm 30 dakika santrifüj edildikten sonra 0.45 µm membran filtrelerden süzüldü ve 40-50 ml hacimlerde taksim edilerek -20°C'de muhafaza edildi.

Monoklonal Antikorların Purifikasyonu: -20°C'den çıkartılarak oda ısısında çözdürülen hibridoma kültür vasatları, 10 mM sodyum fosfat buffer (pH 6.8) kullanılarak 20x1 cm lik hydroxylapatite (Bio-Rad HT) kolonundan 30 ml/saat hızla geçilerek Ig ler fraksiyone edildi. IgG fraksiyonların yeri 280 nm dalga boyunda belirlendi ve bu fraksiyonlar toplanarak -20°C'de muhafaza edildi (28). IgG miktarı OD (optik denstite) : 1.33 formülüne göre mg/ml olarak belirlendi (1). Fraksiyonlar %0.01 NaN₃ ilave edildikten sonra +4°C'de stoklandı.

BULGULAR

1. Anti-O₁ Man 69 146S antijen Mab salgılayan hibridoma oluşumu için bir gün ara ile gerçekleştirilen iki fuzyon işleminden de olumlu sonuç alınırken anti-A₂₂Mah65 146S ve 12S ile anti-O₁ Man 69 12S antijen Mab için bazı sorunlarla karşılaşıldı. Anti-A₂₂Mah65 146S ve 12S'in ilk fuzyonlarını takiben prokaryotların oluştuğu gözlemlendi. Bu, antikör salgılamayan hücreler selektif vasat içerisinde 20-30 gün kadar canlılıklarını devam ettirmelerine rağmen herhangi bir mitoz belirtisi göstermedi (Tablo 1). Anti-O₁ Man 69 146S antijen Mab üretimi için yapılan fuzyonda ise hibridoma oluşumu oranı (fusion frequency) beklenenden çok daha düşük (%3.1) oldu (Tablo 2).

2. İlk üç fuzyonda 96 gözlü mikropate'lerde hibridoma oluşumu oranının 24 gözlü kültür kaplarına oranla dikkati çekecek kadar düşük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle sonraki çalışmalarda sadece 24 gözlü kültür kapları kullanıldı.

3. Hibridoma oluşumu ile feeder-layer kullanımı arasında önemli bir ilişki gözlemlenmedi. Aynı şekilde Mab salgılayan hibridoma kolonilerinin saptanmasından sonra yapılan klonlama işlemlerinde anti-146S Mab salgılayan hibridoma klonlarının eldesinde herhangi bir problemle karşılaşmadı. Tek koloni oluşumu ve çoğalması feeder-layer varlığına bağlı olmaksızın gerçekleşti. Oysa anti-12S Mab salgılayan hibridomalar klonlamaları sırasında ancak feeder-layer varlığında üretilebildi. Aynı özellik bu hibridomaların -196°C'den çıkartılmasından sonra da gözlemlendi.

4. Fuzyon sonrası 24 gözlü kültür kaplarında hibridoma hücresi oluşumu oranı (hibridoma görülen gözler/fuzyonda kullanılan immun B-hücresi sayısı) ve indirekt ELISA ile antiviral Mab salgıladığı tesbit edilen hibridoma hücresi içeren gözlerin oranı her fuzyonda değişiklik gösterdi. (Tablo 2)

5. Sonuçta anti-A₂₂Mah65 146S Mab salgılayan 12, anti-A₂₂Mah65 12S Mab salgılayan 10, anti-O₁ Man69 146S antijen Mab salgılayan 17 ve anti-O₁ Man69 12S antijen salgılayan Mab salgılayan 131 adet hibridoma suşu elde edilerek -196°C ve stoklandı. İmmunizasyonda kullanılan antijen ve her fuzyonda elde edilen hibridoma kolonileri sayısı ile indirekt ELISA sonucu Mab pozitif bulunan hibridoma koloni sayısı Tablo-2'de gösterildi.

6. HPHT chromatografi sonucu purifiye edilen Mab'ların 1.9-2.5 mg/ml IgG içerdiği belirlendi.

Tablo 1. Antijen tiplerine göre fuzyon başarısı

Fuzyon Sonuçları						
Antijen	Fuzyon Sayısı	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	Oran
A ₂₂ Mah65/146S	4	-	-	+	+	2/4
A ₂₂ Mah65/12S	2	+	+			2/2
O ₁ Man69/146S	4	+	-	-	-	1/4
O ₁ Man69/12S	3	-	+	-		1/3
TOPLAM	13					6/13

Tablo: 2. Fuzyonun değerlendirilmesi.

- (1) Hibridoma içeren gözler x 100/toplam göz sayısı,
- (2) Mab + gözler x 100/hibridoma oluşan gözler,
- (3) Mab + göz sayısı x 100/dalak hücresi sayısı

Antigen	Fuzyon	Dalak Hücresi	Hibridoma + gözler	%1	Mab + gözler	%2	Mab + klonlar	Fuzyon başarı%3
A ₂₂ Mah65/146S	2	2x10 ⁸	117	60	11	34	12	6x10 ⁴
A ₂₂ Mah65/126S	2	1x10 ⁸	216	90	142	65.7	102	1x10 ⁷
O ₁ Mah69/146S	2	2x10 ⁸	14	7.1	7	50	17	3.5x10 ⁻⁵
O ₁ Mah69/126S	1	1x10 ⁸	3	3.1	3	100	131	15x10 ⁻¹

TARTIŞMA VE SONUÇ

Hibridoma teknolojisinin temel prensibi, hibridizasyondan sonra antikor salgılayan hibridoma ya da hibridomaların klonlanarak çoğaltılması ve böylece tek bir antijenik determinanta karşı fazla miktarda antikor üretilmesidir. Genel anlamda kolay olmakla beraber uygulamanın çeşitli basamaklarında problemlerle karşılaşmaktadır.

Öncelikle, myeloma hücrelerinin antikor salgılamayan, kontaminasyonlarından ari ve HAT selektif vasata duyarlı olması gerekir (22). NSO myeloma hücresi, NS1 myeloma hücrelerinin bir türevi olup antikor salgılamadığı bildirilmiştir (7). Bakteriyel ve mikropasmlal kontaminantları içermediği araştırmanın ilk aşamasında doğrulanmıştır. Ticari FBS'ların ancak % 10'nun fuzyon için uygun olduğu bilinmektedir (3). Bu çalışmada da fare dalak hücrelerinin canlılıklarının devamına etkisi ve en yüksek "cloning efficiency" değeri tesbit edilen serum numunesi seçilmiş ve araştırmanın sonuna kadar aynı seri kullanılmıştır.

Fuzyondan hemen sonra ve klonlama aşamasında peritoneal makrofaj, dalak hücre kültürü, 3T3 fibroblast cell-line gibi feeder-layer kullanımı önerilmektedir (2,4,5,12,19). Ancak yapılan karşılaştırmalı çalışmalar bunun her zaman gerekli olmadığını ortaya çıkarmıştır (10). Bu çalışmada fuzyon sonrası hibridoma oluşumunda dalak makrofaj hücre kültürünün belirgin bir etkisi görülmemiş ise de bazı hibridomaların gerek klonlamaları gerekse sıvı azottan çıkartılıp üretilmeleri aşamasında feeder-layer'e bağımlı oldukları gözlenmiştir.

Fuzyon sonrası hibridoma oluşumunu ve sonraki ilk klonlamada Mab salgılayan hibridoma içeren klonların oluşum oranlarını etkileyen pekçok faktör vardır. Feeder-layer olarak aktive edilmiş periferik kan hücreleri (PBC) kullanıldığında % 10 hibridoma oluştuğu, bu hibridomaların 10^{-4} ünün Mab salgıladığı buna karşılık aktive edilmemiş PBC ile bu oranın 10^{-8} olduğu bildirilmektedir (31). Ayrıca selektif vasat olarak HAT yerine AAT (adenine, aminopterin, tyhmidine) kullanıldığında hibridoma oluşumunun %60 arttığı, Balb/c yerine immunuzasyonda RBF/Dn kullanılmasının daha olumlu sonuç verdiği de bildirilmiştir (2). Klonlama yönteminin etkisi de önemlidir. Dilüsyon yöntemi ile klonlama %9.55 başarı sağlanırken yumuşak agar teknolojisinde bu oran %50'ye kadar yükseldebilmektedir (15). Ancak, yumuşak agarda klonlamadan sonra hücre kolonisinin Mab pozitif olduğunun saptanabilmesi için tekrar sıvı

vasat içerisinde çoğaltılması gerekmektedir.

Mab salgılayan hibridomaların belirlenmesinde genel prensip olarak en duyarlı ve pratik test uygulanır. Şap virusleri ile çalışmada ELISA kısa sürede çok sayıda örneği tarama olanağı sağladığı için tercih edilen yöntemdir. Ancak, yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, Mab'ların sadece indirekt ELISA'da farklı değerlerde de olsa, belirlenebildiğini göstermiştir (20). Bu çalışmada da amaç sadece Mab salgılayan hibridoma hücre kültürlerini belirlemek olduğu için spot test olarak indirekt ELISA uygulanmıştır.

Her ne kadar in vitro hibridoma kültürlerinin de FBS'dan kaynaklanan Ig kontaminasyonu riski var ise de sorun, serumsuz vasat kullanımı ile çözümlenmiştir ve %80 oranında saf Mab ürettiği bildirilmektedir (3,11,23). Son yıllarda güçlenen, deneme hayvanı kullanımına karşı etik direnişlerin de yönlendirmesi ile Mab üretimi için çeşitli in vitro sistemler geliştirilmektedir (13,16,17,26,27). In vitro Mab üretiminin en pratik yolu stasyonerya da karıştırmalı sistemlerde hacim büyütme yöntemidir (10,11). Bu çalışmada da stasyonerya kültürlerde Mab üretimi yöntemi kullanılmıştır.

Üretilen Mab'lar klarifikasyon sonrası belirli amaçlarda kullanılabilirler; çok yönlü kullanılabilmesi için purifiye edilmeleri önerilmektedir (1). Ascitic sıvısının purifikasyonu için en başarılı yöntem Staph.aureus Protein A affinity chromatography'dir (14). Hibridoma kültür sıvısının purifikasyonu için ise en uygun yöntem olarak hydroxyapatite chromatography (HPHT) önerilmektedir (1,23). HPHT'den sonra Protein A affinity chromatography uygulamasının ise daha saf IgG eldesi sağladığı bildirilmektedir (23). Bu çalışmada IgG'ler HPHT kromatografi ile purifiye edildi. Mab'ların sonraki kullanımlarından önce amaca göre Protein A affinity kromatografi ile bir kez daha purifiye edilmesinde yarar vardır.

Bu araştırma ile Mab eldesi tekniği Şap Enstitüsü'nde uygulamaya konulmuştur. Ancak elde edilen hibridomaların ve Mab'ların çeşitli testlerde kullanılabilmesi için dikkate karakterize edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla çalışmalara başlanılmıştır.

TEŞEKKÜR

ELISA uygulamaları için laboratuvar olanaklarından yararlanmamızı sağlayan tüm Seroloji Laboratuvarı elamanlarına, teknik yardımlarından dolayı A. Ayhan'a ve desteklerinden dolayı Enstitüsü Müdürlüğü ve TAGEM'e teşekkür ederiz.

LİTERATÜR

1. Antibodies, A Laboratory Manual, Eds. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Lab. Perss. ISBN-D-87969-374-6, 1988.
2. Art to Science (in Tissue Culture). Vol.3. No 3 Sep 1984 (Newsletter of High Clone Laboratories) Taggart Hybridoma Technology (THT™) revolutionizes hybridoma research.
3. Bolton, B.J., Morssi, C.B., and Mowles, J.M. (1993) Longterm cultures and cell-lines, Methds. Imm. Analys, 3:103-120.
4. Butchaiah, G., Rao, B.V. (1989): Hibridoma cell-lines secreting Mabs to FMDV type Asia.I Acta Virol. 33:121-130.
5. Butcher, R.N., Obi. T.U. and Mc Cullough. K.C. (1991): Rapid isolation of Monoclonal hybridoma cultures by a "Fusion-cloning" method: The requirement for aminopterin. Biologicals, 19: 171-175.
6. Crowter, J.R. (1993): The use of Mabs in the molecular typing of animal viruses. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 12 (2): 369-383.
7. Crowter, J.R. and Sammuel, A. (1987): Monoclonal antibodies and FMD. Rep. Sess. Res. Gr. Stand. Tech. Comm. EC. Cont. FMD. Lyons, France, FAO, Rome, App 13,88-102.
8. Crowter, J.R. and Sammuel, A. (1990): Monoclonal antibodies and FMD. Eur. Comm. Cont. FMD. Res. Gr. Stand. Tech Comm. Lindholm.
9. Doel T. and Mowat, G.N. (1985): An International collaborative study on FMD assay methods. 2. Quantification of 146S particles. J. Biol. Stand. 13:335-344.
10. Fazekas, S.and Scheidegger . D. (1980) : Production of Mabs:Strategy and Tactics. J.Imm. Meths:35:1-21
11. Galfre, G. and Milstein. C. (1982) : Preparation of Mabs: Strategies and

procedures, Proc. Symp. Properties of The Mabs produced by hybridoma technology and their application to the study of diseases, Singapour 19-23. Oct. 1981. UNDP/ World Bank/ WHO , Geneva , Switzerland.

12. Gupta, R.K. Misra, C.N. Gupta. C. K. and Saxena. S.(1991): Growth of allogenic hybridoma cells in non-histocompatible mice with the help of Ehrlich-Letter ascites tumor cells. *Biologicals*. 18:243-245

13. Jaspert, R., Geske. T. , Teichmann. A. , Kaßner, Y. , Kerzchmar. K. , L'Age-Stehr, J (1995) : Laboratory scale production af Mabs in a tumbling chamber, *J. Immunol, Methds.*, 178: 77-87

14. Jiskoot, W. , Bloemendal. M., Haeringen. B. , Grondelle., Beuvery E.C., Herron. J. and Crommelin, J.A. (1991) : Non-random confirmation of mouse IgG₂a Mab at low pH. *Eur.J. Biochm.* 201:223-232

15. Köhler, G., Milstein, M. (1975) :Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497

16. Lu, G.Z., Thompson, B.G., Suresh, M.R. and Murray, R.G. (1995): Cultivation of hybridoma cells in an inclined bioreactor, *Biotech and Bioeng*, 45(2) : 176-186

17. Marx, U. , Merz, W. , Koch, S. , Nagel, A. , Schlöf M. , Schlag, P.M. Liebricn, W. , Lübbe. L. , von Baehr.R. (1994): Cultivation of hybridomas, human cancer and human primary cells using the miniaturized hollow fibre bioreactor TECHNOMOUSE. *Anim.Cell. Tech: Basic and Applied Aspects*.Vol,6.Proc.6th.Int.Meeting on the JAACT, Nagoya, Japan, Nov. 1993,171-175.

18. Mc.Cullough,K.C. and Butcher., R(1982) Monoclonal antibodies against FMDV 146S and 12S particles.; *Arch.Virol*.74:1-9.

19. Mc.Cullough, K.C., Butcher.R.and Parkinson,D (1983). Hybridoma cell-lines secreting MAbs against FMDV.II. Cloning conditions.*J.Biol.Stand*.II: 183-194.

20. Mc.Cullough, K.C.,Crowther, J.P.and Butcher, R.N.(1985): Alteration in antibody reactivity with FMDV 146S antigen before and after binding to a solid phase or complexing with specific antibody .*J.Imm. Mth*.82:91-100

21. Michael, M.G.(1987) : Chinese hamster ovary cells. *Meths. Enzym*, 151:3-

tion of Mabs in Cell Biology, Biochemistry and Immunology (Ed), J.W. Goding, Acad. Press, London. 1983

23. Rosevear, A. and Lambe, C. (1988) : Downstream processing of animal cell culture products. Recent developments. Anim. Cell. Biotech., 3: 397-440.

24. Samuel, A.R., Knowles, N.J., Samuel, G.D. and Crowther, J.R. (1991) : Evaluation of a trapping ELISA and for the differentiation of FMDV strains using MAb. Biological, 19 : 299-310

25. Samuel, A.R., Ouldrige, E.J., Arrowsmith, A.E., Kitching, R.P. and Knowles, N.J. (1990) : Antigenic analysis of serotype O FMDV isolates from Middle East, 1981 to 1988. Vaccine, 8: 390-396

26. Shen, B., Greenfield, P. and Reid, S. (1994) : Calcium alginate immobilized hybridomas grown using a fluidized -bed perfusion system with a protein-free medium. Cytotechnology 14, 109-117

27. Shirai, Y., Yamaguchi, M., Kobayashi, A., Nishi, A., Nakamura, H. and Murakami, H. (1994) : Change in growth kinetics of hybridoma cells entrapped in collagen gel effects by alkaline supply. Cytotechnology, 4: 129-146

28. Smith, G.J., McFarland, R.D., Reisner, H.M. and Hudson, G.S. (1984) : Lymphoblastoid cell-produced immunoglobulins: Purification from culture medium by hydroxylapatite chromatography, Anal. Biochem., 141: 432-436

29. Twomey, T., France, L.L., Hassard, S., Burrage, T.G., Newman, J.F. and Brown, F. (1995) : Characterization of an acid-resistant mutant of FMDV. Virology, 206: 69-75.

30. Van Maanen, C. and Terpstra, C. (1991) : Quantification of intact I46S FMD antigen for vaccine production by a DAS-ELISA using Mabs. Rep. Europ. Comm. Cont. FMD. Sess. Res. Gr. Stand. Tech. Comm., Lindholm., Denmark, 1990, App. II

31. Westerwoudt, R.J. (1986) : Factors affecting production of MAb. Methods. Enzym. 121: 3-18