

ELISA TEKNİĞİNDE KULLANILACAK REAGENTLERİN HAZIRLANMASI

The preparation of reagents in Elisa techniques

Ragıp BAYRAKTAR*

Lale BAYRAKTAR***

Mehmet DAĞISTAN**

Osman DEMİRALAY**

ÖZET

Son zamanlarda soluble antijen veya antikorların enzim immunoassay ile solid faz hale getirilip teşhis edilmesinde büyük gelişmeler kaydedilmiştir.

Immunoassay, diğer immunokimyasal tekniklerin en önemlilerinden biri olup aynı zamanda diğer tekniklerden daha az komplike, daha kolay ve daha çabuktur. ELISA olarak bilinen enzim aracılığı ile antijen-antikor ölçülmesi tekniğine dayanan bu test Engvall ve arkadaşları, Van Weemen ile Schuurs tarafından bulunup geliştirilmiştir. (11,23)

ELISA yöntemi ile antikorların veya antijenlerin saptanmasında ortam ya antikor yada antijen ile kaplanarak duyarlaştırılır ve üzerine konan antijen veya antikor ile reaksiyona girer, üzerine ilave edilen enzim işaretli anti-immunoglobulin ve substrat ile renk değişimi şeklinde substratın parçalanma oranına göre test sonuçlandırılır ve mikropleytte oluşturulan bu reaksiyonda bir pleyt üzerinde çok sayıda numune işlenebilir. Biz bu araştırmada bu test için gerekli olan reagentleri, konjugeyt, substrat ve konjugasyon solüsyonları üretimi olarak ele alıp ürettik vede laboratuvarımıza göre test edip standardizasyonunu gerçekleştirdik.

* Etilik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü ANKARA

** Tav. Hast. Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü MANİSA

*** Koruma ve Kontrol Gn. Md. ANKARA

SUMMARY

The ELISA assay is an with antigen-antibody reaction system which uses an antibody coupled enzyme with the substrate in directly proportional to the amount of antibody or antigen present in the sample being tested.

Immunoassays are one of the most powerful of all immunochemical techniques. The next stage in the development of enzyme-immunoassays was the linkage of soluble antigens or antibody to an insoluble solid phase in a way in which the reactivity of the immunological component was retained. This was the basis for the techniques known ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) pioneered by Engvall and colleagues quick and easy, yielding information that would be difficult to determine by the other techniques. (11,23)

For this assay, a lot of diluents, buffers (coating, washing, substrate and conjugating buffers) antigens, conjugate, substrate and ext. are needed. In this study; these kind of solutions have been prepared, tested and standardized.

According to demand, the ELISA reagents will be dispatched to laboratory all over the country.

GİRİŞ

İmmunokimyasal tekniklerde işaretleme ve test teknikleri başlıca 3 safhada incelenirler; (32)

1. Floresan madde kullanılarak işaretleme, yani immunofluoresans tekniği (IFT)

2. Radyoizotop maddelerin işaretleyici olarak kullanıldığı testler, yani Radio immuno assay (RIA),

3. Enzimlerle işaretleme yöntemleri (EIA).

Son yıllarda immunoenzimatik reaksiyonlar diğer iki testin yerini almaktadır.. Bunun nedeni ELISA testinin bazı avantajlarıdır. Bunlar;

1. Çok küçük hacimlerde çalışması,
2. Sonuçların kantitatif olması,
3. Non-spesifik reaksiyonların azlığı,

4. İşaretli ajanların stabilitesinin daha fazla olması,
5. Enzim-substrat ilişkisinin sonuç reaksiyonu artırıp, çok küçük antijen miktarların (picogram) dahi tesbit edilebilmesi.
6. Sonucun gözle yada basit araçlarla okunabilmesi.

Bunun yanında her testte olduğu gibi EIA'da çözümlenmesi gereken bazı sorunlar bulunmaktadır. (11) Bunlar;

1. Solid faz immunoassay'e ilişkin olanlar:

- a. Çapraz reaksiyonların oluşumu,
- b. Yüksek duyarlılık,
- c. Antikor duyarlılığının sınırlılığı,
- d. Non-spesifik reaksiyonlar,
- e. Solid fazda yakalanmadaki değişiklikler,

2. Enzim immunoassay'e ilgili sorunlar:

- a. Konjugeyt ilavesinden sonra antikor duyarlılığının kaybı,
- b. Enzim substrat reaksiyonu değişikliği,
- c. Enzimatik aktivitenin inhibitörlere duyarlılığı,
- d. Endogen enzimatik aktivitenin varlığı,
- e. Substrat belirlenmesindeki sınır.

Solid fazda enzim işaretli antikorların fiziksel bağlanması ile enzim işaretli antikorlar arasında non-spesifik reaksiyonlar oluşmaktadır. Bu fiziksel bağlanmalar buffer'da bulunan jelatin gibi immunolojik olarak nötral proteinler, yıkama sıvıları ve deterjan kullanımı ile azaltılabilmekte veya elimine edilebilmektedir.(25,36)

Klinik marazi maddedeki bazı unsurlar (şüpheli veya hasta hayvan serumundaki) solid fazda kaplamak için kullanılan immunoglobulinlerin fc kısmına bağlanabildiği durumlarda non spesifik reaksiyonlar oluşabilir. Bu reaksiyonlar fc kısmı ile bağlanma yeteneğinde olan bakteri komponentleri yada marazi maddedeki rheumatoid faktörün varlığı nedeniyle meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar non-immum serum IgG veya non spesifik reaktantları nötralize etmek için reaksiyon karışımına fc fragmentlerinin ilavesi ile en aza indirilebilir. (25,36)

Dolayısıyla yaptığımız bu araştırmada İngiltere Weybridge ve Houghton ile Macaristan Phylaxia Enstitüleri Immunodiagnosis ve Biyokimya laboratuvarları ile literatürlerden faydalanılarak ELİSA testi için gerekli olan

reagentleri; Konjugeyt, substrat ve konjugasyon solüsyonları olarak 3 safhada ele alıp ürettik, test edip şu anda 4 hastalığa karşı (Newcastle, IB, IBD, AE) standardize ettik.

MATERYAL

A. ARAÇ-GEREÇ.

Ultrasantrifüj ve T21, T40 ile SW 40 Ti rotorları, Sephadex gel column, peristaltik pompa, ultraviyole gel column devamlı spektrofotometresi , fraksiyon kollektör, refraktometre, spektrofotometre, vortex mikser, manyetik karıştırıcı, soğutmalı santrifüj, hassas terazi, Ben-Marie cihazı, -70 °C lik deep-freeze, CO₂'li ve normal etüv, pH metre, sonikatör, otoklav, kuru sterilizatör, laminar flow kabin, buzdolabı, embriyolu SPF yumurta, IBV-M41 suşu, IBD-Paya, Lukert ve Chevillie suşu, AE-Calnek 1143 suşu, ND-Roakin suşu, doku kültürü cam ve disposable malzemeleri, diğer laboratuvar alet, araç ve cam malzeme leri.

B. KİMYASAL MALZEMELER

Sodyum sülfat, sodyum karbonat, sülfirik asit, sodyum hidroksit, sitrik asit, glutardialdehid, hidrojen peroksit, gliserin, Ortophenilen di amin, formaldehid, metanol, etanol, phenol red, Potasyum hidrojen fosfat, aseton, hidroklorik asit, MEM medium, TC vitaminleri, TPB, Newborn ve fetal sığır serumu, antibiyotik ve antimikotikler, sodyum meta periyodat, sodyum borhidrit, sodyum azid, sodyum asetat trihidrat, sodyum hidrojen karbonat, Ksilol, tri natrium citrat-dihidrat, Tween-20, TRIS, PEG-6000, Diethanolamin, 1, 1, 2 tri klor florethane, HRPO-Horse Radish Peroxidase, DMSO, Asetik asit, TNB, NaCl, KCl, NaHPO₄, MgCl₂, H₃BO₃, EDTA, K-Oxalate CaCl₂, Freund's adjuvant.

METOD ve BULGULAR

Bu araştırma 3 safhada gerçekleştirildi. I - Konjugeyt üretimi, II-Antijen ve antiserum üretimi, III-Solüsyonların hazırlanması ve standardizasyonu.

I- ELISA KONJUGEYT ÜRETİMİ:

a. Kimyasal metod ile kandan serum ayrılması, (Kochis metodu)

250 ml'lik santrifüj tüpünün içine 2 ml. % 20'lik di-Kalium oxalate-mono-hydrate solüsyonundan (Merck,cat.no: 5073) konup üzerine 200 ml. tavuk kanı alındı, kan santrifüj tüpüne alınırken devamlı karıştırıldı. Santrifüj tüpünün üzerini örtecek kadar Sep-Ar-Aid (Serva cat. no: 34878) yaklaşık 6-8 gr. konup 2080 rpm.' de (1000 g.force) 10 dk. santrifüj edilerek plazma ayrıldı. Tüpteki plazma bir beher içine pipet yardımıyla alındıktan sonra üzerine 1.22 ml. $2M CaCl_2 \cdot 4H_2O$ Kalsiyum klorid-tetrahydrate (Merck, cat. no: 2384) solüsyonundan ilave edilip, oda sıcaklığında pıhtılaşmaya terk edildi. Pıhtılaşma sertleşen serum +4°C 'ye kaldırıldı, ertesi gün bir baget yardımıyla parçalanıp süzgeç kağıdından süzülerek, IgG eldesi için presipitasyonda kullanacağımız saf berrak serum elde edildi. Bu metodla elde edilen serum çok berrak, saf olduğu gibi, diğer metodlara oranla % 100 daha fazla miktarda serum elde edilmektedir. (100 cc. kandan yaklaşık 76 cc. serum elde edilir.)

b. Sodyum Sülfat presipitasyon metodu ile Chicken IgG eldesi:

(1,11,13,36)

Yukarıda anlatıldığı şekilde kimyasal metodla elde edilen 100 ml. tavuk serumu bir beher içinde manyetik karıştırıcının üzerine kondu. Üzerine 18 gr. Sodyum sülfat-anhydrous extra pure (Merck cat. no: 6643) ilave edilip (final konsantrasyon % 18) eriyinceye kadar beklendi, tamamiyle eridikten sonra 1 saat süreyle karıştırıldı, daha sonra santrifüj tüpüne alınıp 4500 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi, süpernatant atılıp elde edilen pelet 50 ml. deionize suda eritilip üzerine 7 gr. Sodyum sülfat konarak (final konsantrasyon % 14) yukarıda anlatılan presipitasyon ve santrifüj işlemi aynen tekrarlandı. Süpernatant atılıp pelet 10 ml. deionize su ile homojenize edilip, S-300 Sephacryl gel column'dan geçirilip, otomatik fraksiyon kollektörde kaydedicisi IgG fonksiyonları toplamı ve UV-spektromonitöre göre pik görülen fraksiyonlardan IgG solüsyonları toplanıp tekrar final konsantrasyon % 18 olacak şekilde sodyum sülfat olacak şekilde Sodyum sülfat ilavesiyle presipite edilip santrifüj edildi ve elde edilen pelet 2 ml. Tris buffer + Na azide ile sulandırıldı. Bu sulandırılan IgG solüsyonu dializ tüpüne konup + 4°C' de 2 gün PBS'e karşı dializ edildi, dializ sonunda

saf Chicken IgG elde edilmiş oldu. Purity testi Hannover Veteriner Fakültesi Tavuk Kliniğinde yaptırılmıştır.

c. Rabbit anti chicken IgG eldesi: (11,12,13)

Yukarıda b paragrafında anlatıldığı şekilde elde edilen chicken IgG solüsyonu 1/2 oranında freund's adjuvant ile çift enjektör metodu ile karıştırılarak hemolize edildi. 1/2 oranında kullanılan freund's adjuvantın 1/5 kısmı complete, 4/5 kısmı incomplete olarak karıştırılıp kullanıldı. Bu homojenden tavşanlara 3 kere intradermal 1 ml. enjeksiyon yapıldı. Hayvanlara immunizasyon için her defasında 100 mg. protein (100 mg. IgG/1 ml) enjekte edildi. 14 gün sonra ikinci ve takip eden 14 gün sonra da 3. enjeksiyon yapıldı ve son enjeksiyondan 10 gün sonrada tavşanlardan (a) paragrafında anlatıldığı üzere kan alınıp K-oxalate CaCl₂ kimyasal metodu ile serum elde edildi. Daha sonra bu elde edilen serumdan Rabbit anti chicken IgG yukarıda (b) paragrafında anlatıldığı gibi presipitasyon metoduyla elde edildi, bu değer 50 mg protein/ml. olarak bulundu. Yalnız bu basamakta yapılan presipitasyonda presipitan madde olarak sodyum sülfat yerine Amonyum sülfat (Merck cat. no: 1216) kullanıldı. (14)

d. Horse Radish Peroxidase- HRPO enzimi ile IgG'nin işaretlenmesi: (4, 11, 22)

Sodyum periodate metodu ile Horse radish peroxidase enzimi kullanılarak anti chicken rabbit IgG'lerinin işaretlenip konjugeyt hazırlanması üç safhada yapıldı.

1. Enzimin aktive edilmesi:

4 mg. Horse Radish Peroxidase-HRPO (Sigma, type VI,RZ=3.0) tartılıp 1 ml. deionize suda eritildi. Buna 0.2 ml. taze hazırlanmış 100 mM NaIO₄ çözeltisinden konup, 20 dk. oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra solüsyon dializ tüpüne alınıp 1 gece +4 °C de sodyum acetate buffer'a karşı (pH= 4,4) manyetik karıştırıcı üzerinde dializ edildi.

2. Aktive edilen HRPO enzimi ile IgG konjugasyonu:

Dializ tüpündeki solüsyon küçük bir beherglasa alınıp 20 µl. 200 mM pH: 9.5 Karbonat buffer ilave edildi. (pembemsi-açık kahverenk oluşmalıdır, oluşmadığı taktirde 10-20 µl, daha ilave edilebilir.) Daha sonra ayrı bir tüpe

pH: 9.5, 10 mM Karbonat buffer'dan 1 ml. alınıp üzerine 8 mg. IgG ilave edildikten sonra iki solüsyon birbirine karıştırılıp, bu karışımın hacminin 1/6'sı oranında karışıma kuru Sephadex G-25 super fine (Pharmacia, cat.no: 17-0033-02) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde 3 saat karıştırıldı. Daha sonra bu karışım ucu cam yünü ile tıkanmış pastör pipetine kondu ve alt taraftan konjugeyt süzülerek toplandı.

3. Stabilizasyon:

Stabilizasyon için bu konjugeyte taze hazırlanmış Sodyum borhidrid, NaBH₄ (4mg/ml. distile su) solüsyonundan 1 ml. ilave edilip +4 °C'de 2 saat süreyle inkubasyona bırakılarak konjugyt elde edildi. Bundan sonra konjugeytin RZ değeri hesaplanıp $RZ = E405/E280 = 0.45$ bulundu. (konjugeytin RZ değeri IBS'ye göre 0.2-0.6 arasında olmalıdır.) Sonra konjugeyt küçük hacimlerde (10-20-50-100 µl.) buji tüplere taksim edilip, ELİSA testinde kullanılmak üzere -20°C'de deep-freeze'de veya 1/1 oranında pure glycerol ile karıştırılıp +2° ile +8°C'de saklandı.

II. ANTİJEN ve ANTİ SERUM ÜRETİMİ

a. Newcastle Hastalığı Antijen ve Antiserum Üretimi: Newcastle ELİSA antijeni Roakin suşunun 9 günlük SPF yumurtaların corio-allantoik boşluğuna inokule edilip, 48-52 saat sonra amnio-allantoik sıvının toplanması, 750 g. kuvvetle klarifiye edilmesi, daha sonra 150 dakika 52.000 g. çöktürme kuvvetinde virüsün çöktürülüp, orjinal hacmine göre 1:100 oranında konsantre edilip, daha sonra %30'luk sucrose cushion ile ultrasantifüjde Swing-out T-40 rotor kullanarak 80 dk. 131.000 g. çöktürme kuvvetinde purifiye edilmesiyle hazırlandı, elde edilen virüs -70 °C'de küçük hacimlere bölünüp saklandı. (29) Antiserum, canlı ND-LaSota suşu ile enfekte edilen SPF piliçlerden standart metodlara göre hazırlandı. Serum 56 °C'de 20 dk. inaktive edilip -70 °C'de 0.5 ml.'lik bujilerde saklandı. Serum dilüsyonu %0.05 oranında Tween-20 ilave edilmiş fosfat buffer saline (PBST) ile yapıldı. (29,35)

b. Avian Encephalomyelitis Hastalığı Antijen ve Antiserum Üretimi:

Canlı AE-Van Roekel suşunun 1000 EID50 dozda 6 günlük embriyolu SPF yumurtaların sarı kesesine inokule edilip, 12 gün inkubasyondan sonra embriyolar toplandı. Embriyolar homogenize edilip Trichloro-trifluoroethane ile ekstraksiyon edilip virüs %4'lük polyethylen glycol ile presipite edildi. Her embriyo için 0.5 ml. Tris-HCl-NaCl buffer kullanarak (0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH:8.0) resuspense edilen virüs aynı buffere karşı +4°C'de 72 saat dializ edildi. Daha sonra 100 g. kuvvetinde 10 dk. santrifüj edilip oluşan sediment uzaklaştırıldı. Üstteki sıvı ELİSA antijeni olarak -70 °C'de küçük volümler halinde saklandı. (26,35) AE-Calnek 1143 ile enfekte edilen SPF civcivlerde standart metodlara göre antiserum hazırlanıp, serumlar 56°C'de 20 dk. inaktive edilip, -70°C'de 0.5 ml.'lik bujilerde saklandı. Serum dilüsyonu %0.05 oranında Tween-20 ilave edilmiş fosfat buffer saline (PBST) ile yapıldı. (26,35)

c. Enfeksiyöz Bronşitis Hastalığı Antijen ve Antiserum Üretimi:

Enfeksiyöz Bronşitis ELİSA antijeni IB-M41 suşunun 9 günlük embriyolu SPF yumurtaların corio-allontik boşluğuna inokule edilip, 72 saat sonra corio-allantoik sıvının toplanması, düşük devirde klarifiye edilmesi ve daha sonra ultrasantrifüjde 1 saat 30.000 g. çöktürme hızında virusun çöktürülüp, orjinal hacmine göre 1/100 oranında konsantre edilmesiyle hazırlandı. Elde edilen virus -70 °C' de saklandı. HI testi için hazırlanan Phospholipase-C ile muamele edilmiş HI antijenide ELİSA testinde kullandığında olumlu sonuç alındı. (18,19,20,21,25,30,33,36) Antiserum, canlı IB-M41suşuyla enfekte edilen SPF civcivlerden standart metodlarla hazırlandı. Serum 56 °C'de 20 dak. inaktive edilip -70 °C'de 0.5 ml. lik bujilerde saklandı. Serum dilüsyonu % 0.05 oranında Tween-20 ilave edilmiş fosfat buffer saline (PBST) ile yapıldı. (18,19,20,21,25,30,33,36)

d. Enfeksiyöz Bursal (Gumboro) Hastalığı Antijen ve Antiserum Üretimi:

Enfeksiyöz Bursal hastalığı ELİSA antijeni doku kültürüne adapte IBD, Cheville, suşu ile civciv embriyo fibroblast doku kültüründen hazırlanan monolayerlerin enfekte edilip, yaygın CPE göstermesinden sonra doku kültürü mediumunun toplanıp önce düşük hızda klarifiye edilmesi, daha sonrada

ultrasantrifüjde 40.000 g. kuvvetle 2 saat santrifüje edilmesiyle virüsün çöktürülüp orjinal medium hacmine göre 1:100 oranında konsantre edilmesiyle hazırlandı. (24,25,30,31,33,36) Antiserum, canlı IBD-Paya suşuyla enfekte edilen SPF civcivlerden standart metodlarla hazırlandı. Serum 56 °C'de 20 dk.inaktive edilip - 70 °C'de 0.5 ml. lik bujilerde saklandı. Serum dilüsyonu % 0.05 oranında Tween-20 ilave edilmiş fosfat buffer saline (PBST) ile yapıldı. (24,25,30,31,33,36)

III.SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI VE STANDARDİZASYONU

ELİSA testinin yapılmasında kullanılan tüm solüsyonlar (konjugasyon, yıkama, konjugeyt ve serum dilüsyon solüsyonları, vd.) hazırlanıp, test için yardımcı olarak üzere standart hale getirilmiştir. (3,4,6,7,10,11,12,13,14,17, 22,25,27,32,33,34,35,36,37)

NTE-SODYUM KLORÜR-EDTA-TRIS BUFFER (PH=7,4)

NaCl	8.7 g
EDTA	0.372 g
TRIS	6.05 g

Üzeri 1000 ml. distile suya tamamlanacak, süzgeç kağıdından süzülecektir.

BBS-BORAT BUFFER (pH=8,4)

H3BO3	6.2 g. (0.1 M)
NaOH	1.1 g. (0.0275 M)
NaCl	7.85 g. (0.134 M)

Üzeri 1000 ml distile suyla tamamlanacak, süzgeç kağıdından süzülecek, istendiğinde % 0.5 Tween-80 konabilir.

SODYUM BOROHİDRİT SOLÜSYONU

Sodyum borohidrit	4 mg.
Distile su	1 ml.

SİTRAT BUFFER-SUBSTRAT BUFFER (pH=5,5)

Sodyum asetat trihidrit 1.36 g.

Sitrik asit 2.10 g.

Üzeri 100 ml. distile su ile tamamlanır ve pH 10 N NaOH ile 5,5'e ayarlanır, süzülür.

TBM SUBSTRAT SOLÜSYONU

3,3' 5,5'- Tetrametilbenzidin (TMB) 10 mg.

Dimetilsülfoxid (DMSO) 1 ml.

100 ml. substrat buffer içine, DMSO'da eritilmiş TMB'den 100 µl. ilave edilip, yavaşça karıştırılır ve üzerine % 30 H₂O₂ solüsyonundan 3,5 µl konur, derhal kullanılır.

YIKAMA SOLÜSYONU

Fosfat buffer saline veya Fizyolojik saline % 0.05 Tween 20 ilavesiyle hazırlanır.

TE-TRIS-EDTA BUFFER

Tris HCl 1.27 g. (10 mM)

EDTA 0.37 g. (1 mM)

Üzeri 1000 ml. ye deiyonize su ile tamamlanır, süzülür.

SUCROSE (66 %) STOK SOLÜSYONU (SUCROSE GRADİENT İÇİN)

Stok solüsyon % 66 olup bundan hazırlanacak olan sukroz solüsyon %'leri şöyledir.

60 % Sukroz 10 ml. % 66 + 1 ml. distile su

50 % Sukroz 10 ml. % 60 + 2 ml. distile su

40 % Sukroz 8 ml. % 60 + 4 ml. distile su

30 % Sukroz 6 ml. % 60 + 6 ml. distile su

20 % Sukroz 4 ml. % 60 + 8 ml. distile su

DİALİZ TÜPÜ HAZIRLAMA SOLÜSYONU

1. Na₂CO₃ 20 g.

EDTA 0.372 g.

Üzeri 1000 ml. distile suyla tamamlanır ve süzülür.

2. Dializ tüpleri değişik uzunluklarda kesilip birinci basamakta hazırlanan solüsyon içinde 10 dk. kaynatılır.

3. Deiyonize su ile çalkalanılır.

4. Deiyonize su ile 10 dk. tekrar kaynatılır.

5. Deiyonize su ile çalkalanılır.

6. 1000 ml. ye 0.372 g. EDTA ilave edilerek hazırlanacak 1 mM EDTA solüsyonunda +4 C' de saklanır.

OPD-SUBSTRAT ve SOLÜSYONUN HAZIRLANMASI

34 mg. OPD, 100 ml. sitrat buffer'a çözündürülür ve üzerine % 37'lik H₂O₂'den 20 µl. ilave edilip 10 dk. beklenerek aktivasyonu sağlanır. Bu solüsyon koyu renkli şişede hazırlanması hatta şişenin dışı alüminyum folye ile kaplanmalıdır.

BUFFER SALİNE (ph: 7,1 -7,2)

NaCl 8.50 g

KH₂PO₄ 0.68 g

NaOH 0.15 g

Üzeri 1000 ml. 'ye distile su ile tamamlanır, filtre edilir.

2,5M SÜLFİRİK ASİT SOLÜSYONU

Sülfirik Asit 134 ml.

Üzeri 1000 ml. 'ye distile su ile tamamlanır.

TARTIŞMA

Enstitümüz Türkiye'nin tüm tavuk aşılarının, serum ve biyolojik maddelerin üretilmesi ihtiyacına cevap vermek üzere kurulmuş ve bu konuda FAO ile ortak proje yürütmektedir. Enfeksiyöz hastalıkların tanısında direkt etken izolasyon ve identifikasyonu hızlı teşhise cevap vermemektedir. Bu yüzden değişik serolojik ve immunokimyasal testler günümüzde önem kazanmıştır. Dünyada hem tıp, hem de Veteriner tababette viral, bakteriyel ve paraziter hastalıkların peracute, acute ve kronik dönemlerinde teşhise olanak veren ve

yaygın şekilde kullanılmaya başlanan immunoenzimatik reaksiyonlardan olan ELISA testinin ülkemizde de tavuk hastalıklarının teşhisinde kullanılmasını sağlamak, test metodlarını ve test solüsyonlarını standardize etmek amacıyla yapılan bu araştırma başarı ile bitirilmiştir. ELISA testi çok duyarlı olduğundan nonspesifik reaksiyonların oluşmasını önlemek için testte kullanılan virusların purifikasyonu yapılmış, klinik marazi maddelerdeki bazı maddelerin solid fazda kaplamak için kullanılan antijen ve antikörlerin fc fragmentlerine bağlanarak oluşturduğu non-spesifik reaksiyonlarda test solüsyonlarına ilave edilen ve metod-bulgular bölümünde detayları açıklanan Tween-20 ile % 3 oranında Bovine Albumin, Fraction V katılması ile ortadan kaldırılmıştır. Konjugeyt hazırlanmasında kullanılan enzimin seçilmesinde de substrat spesifitesinin çok geniş olması, fiyatının ucuz olması ve bir çok substrat ile çok yoğun renk oluşturarak gözle okuma kolaylığı getirmesi nedeniyle Peroxidase enzimi kullanılmasına karar verilmiştir. Substrat seçiminde OPD-Ortho Penilen Diamin'in tercih edilmesi ise peroxidase enzimi ile reaksiyon veren substratların içinde en az düzeyde kanserojen olmasıdır. Enzim-Substrat reaksiyonu ortamdaki enzim miktarına bağlıdır. Bu enzim Substrat kombinasyonunun seçilmesindeki en önemli unsurlardan biri de ortamdaki tek bir peroxidase enzim molekülü 1 dakikada substratın 100.000 molekülü ile reaksiyon vererek gözle görülebilen bir ürün meydana getirmesidir ki bu büyütme çok küçük olan antijen miktarlarının "Picogram" bile ölçülmesini sağlamaktadır. (4,9,11,13,33,37)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçta üretilen konjugeytin RZ değeri $E405/E280=0.45$ bulunmuştur. Bu değer konjugeyt için istenilen RZ, 0,2-0,6 değerleri içindedir. Uygun konjugeyt dilüsyonumuz 1:1000 olarak bulunmuştur. Bitirdiğimiz diğer bir araştırma sonucuna göre de en iyi netice veren test metodlarında hazırlanması ve kullanılmaları standart hale getirilmiştir. Bu metodlar bu testi kullanacak olan bütün laboratuvarlara da büyük kolaylık sağlayacaktır. Diğer Enstitü ve teşhis laboratuvarlarında da ELISA testinin rutin hale getirilmesi, diğer tavuk ve hayvan hastalıklarının teşhisinde kullanılmaya başlanması ile araştırmacıların

başka hastalıklar içinde test metodlarını standardize etmeleri ülkemiz hayvancılığı ve Veteriner teşkilatımız için çok yararlı olacağı gibi modernizasyonumuz içinde gereklidir.

Enstitü ELISA ve Araştırma laboratuvarlarımız ayrıca öneri ve ülke isteklerine göre de diğer tavuk hastalıklarının bu test ile teşhisi için test metodlarını geliştirmeye ve standardize devam edecektir.

LİTERATÜR

1. ALLEN, J.C., KUNKEL, H.G. 1963: Production and purification of chicken Immunoglobulins. *Science*. 139: 229-241.
2. ASHORA, P., KROHN, K. 1986: Washing of ELISA plates with running tap water. *Journal of immunological Methods*. 88: 141-142.
3. AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T., GUESDON, J.L. 1978: Coupling of Enzymes to Antibodies and Antigens. *Scand. J. Immunol.* 8: 7-23.
4. BARBARA WILSON, M., NAKANE, P.K. 1978: Recent Developments in the periodate method of conjugating Horseradish Peroxidase (HRPO) to antibodies. *Immunofluorescence and related Staining Techniques*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. I: 215-234.
5. BENEDICT, A.A., BROWN, J.R., HERST, R.T. 1962: The temporal synthesis and some chromatographic and ultracentrifugal characteristic of chicken antibodies. *J. Exper. med.* 90: 399-411.
6. BRADFORD, M.M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
7. BOORSMA, D.M., STREEFKERT, J.G. 1978: Improved method for separation of peroxidase conjugates. *Immunofluorescence and related staining techniques*. Elsevier/North Holland Biomedical press. 225-235
8. CASE, J.T. and ARDANS, A.A. 1985: Non specific Reactions in an Enzyme Linked Immunosorbent Assay caused by binding of Immunoglobulins in situ to Egg-Propagated Infectious Bronchitis virus. *Avian Dis.* 30: 149-153.
9. DIETLIND, H., HERWART, A. 1986: Evolution of low molecular weight Immunoglobulins, *Dev. and Comp. Immunology*. 10: 379-380.

10. ENGVALL, E., CARLSSON, H.E. 1976: Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Methods in Enzymology*. 70: 419-438.
11. ENGVALL, E., CARLSSON, H.E. 1976: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA. First International symposium on Immunoenzymatic techniques INSERM Symposium No:2: 135-182.
12. HARLOW, E., LANE, D. 1988: Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. I: 319-359, 553-592.
13. HATFIELD POLYTECHNIC, Division of Biological and Environmental Sciences, 28-31 MARCH 1988. *Molecular Biology update in USA*. 125-142.
14. HEBERT, G.A., PATRICIA, L.P., PITTMAN, B. 1973: Determination of the optimal Ammonium Sulphate concentration for the fractionation of Rabbit Sheep, Horse and Goat Antisera. *Applied Micro. biology*. 25: 26-36
15. JENSENIUS, J.C., ANDERSEN, I., HAU, J., CRONE, M. and KOCH, C. 1981: Eggs: Conveniently packaged Antibodies. Methods for purification of YOLK IgG. *Journal of Immunological Methods*. 46: 63-68
16. LESLIE, G.A., CLEM, L.W. 1969: Phylogeny of Ig structure and function III. Ig of the chicken. *J. Exp. Med.* 130:1337-1339.
17. LOWRY, O.H. 1973: A simplified method for the Quantative Assay of small Amounts of Protein in Biologic Material. *Analytical Biochemistry*. 51:654-655.
18. MARQUARDT, W.W., SNYDER, D.B. and SCHLOTTHOBER, B.A. 1981: Detection and Quantification of Antibodies to Infectious Bronchitis virus by ELISA. *Avian Dis* 25:713-722.
19. MOCKETT, A.P.A. and DARBYSHIRE, J.H. 1981: Comparative studies with an ELISA for antibodies avian Infectious Bronchitis virus. *Avian Pathology*. 1: 10-10.
20. MOCKETT, A.P.A and COOK, J.K.A. 1986: The detection of specific IgM to Infectious Bronchitis virus in chicken serum using an ELISA. *Avian Path.* 15: 437-446.
21. MONREAL, G., BAUER, H.J., and WIEGMANN, J. 1985: Comparison of the inhibition test and Agar gel precipitation test for detection of antibodies to Avian Infectious Bronchitis virus. *avian Pathology*. 14: 421-431.
22. NAKANA, P.K., KAWAOI, A. 1974: Peroxidase-labeled Antibody a new method of conjugation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 22:

1084-1091.

23. NANDAPALAN, N., WILCOX, G.E., PENHALE, W.J. 1983: Production of antisera to the heavy chains of chicken immunoglobulins. *Br. Vet. J.* 139: 501-506.

24. NICHOLAS, R.A.J., REED, N.E., WOOD, G.W., HEBERT, C.N., MUSKETT, J.C., THORNTON, D.H. 1985: Detection of antibodies against infectious bursal disease virus: a comparison of three serological methods. *Res. in. vet. Science.* 38: 189-192.

25. PHYLAXIA Veterinary Research Institute, Hungary. 1987: Viral products methods booklet. 30-78.

26. SMART, I.J., and GRIX, D.C. 1985: Measurement of Antibodies to Infectious Avian Encephelomyelitis virus by ELISA. *Avian Pathology.* 14: 341-352.

27. SPECTOR, T. 1978: Refinement of the Coomassie Blue method of Protein Quantitation. *Analytical Biochemistry* 86: 142-146.

28. SYNDER, D.B., MARQUART, W.W., MALLINSON, E.T., ALLEN, D.A. SAVAGE, P.K. 1985: An Enzyme linked immunosorbent assay method for the simultaneous measurement of antibody titer to multiple viral, bacterial or protein antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 9: 303-317.

29. SNYDER, D.B., MARQUART, W.W., MALLINSON, E.T., RUSSEK, L. 1982: Rapid Serological Profiling by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. I. Measurement of Antibody Activity Titer Against Newcastle Disease Virus in a single serum dilution. *Avian Dis.* 27: 161-170.

30. SNYDER, D.B., MARQUART, W.W., MALLINSON, E.T., SAVAGE, P.K. and ALLEN, D.C. 1985: Rapid Serological Profiling by Enzyme Linked immunosorbent Assay. III. Simultaneous measurement of Antibody titers to Infectious Bronchitis, Infectious Bursal Disease and Newcastle Viruses in a single serum dilution. *Avian Dis.* 28: 12-24.

31. SNYDER, D.B., MARQUART, W.W., MALLINSON, E.T., RUSSEK-COHEN, E., SAVAGE, P.K. and ALLEN, D.C. 1985: Rapid Serological Profiling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

IV: Association of Infectious Bursal Disease Serology with Broiler Flock Performance. *Avian Dis.* 30: 139-148.

32. VILLEGAS, P. 1987: Application of ELISA. *Avian virus disease, Labo-*

ratory of Veterinary Medicine, University of Georgia. 48-51.

33. VOLLER,A. BIDWEL,D.E and BARTLETT,A. 1979: Types of Assay and the applications of ELISA. The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 1. st. Edition,The Zoological Society of London. 3-8, 10-58.

34.VOLLER,A. BIDWEL,D.E and BARTLETT,A. 1976: Microplate Enzyme Immunoassays for the Immunodiagnosis of virus infections. Manual of Clinical Immunology. 69: 506-512.

35. VUNAKIS, H.V., LANGONE, J.J. 1980: Production of reagent antibodies. Immunochemical Techniques. Methods in Enzymology. 70: 120-141.

36. WEYBRIDGE Central Veterinary Laboratory, U.K. 1988: Viral Products Control Section Method Sheets. 3-70.

37. WILSON, M.B. and NAKANE, P.K., 1978: Recent developments in the periodate method of conjugating Horse Radish Peroxidase (HRPO) to antibodies. Immunofluorescence and related staining techniques. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 225-235.