





ELISA SİSTEMİNDE PROTEİN-İNORGANİK HİBRİT KONJUGATIN KULLANILABİLİRLİĞİ

Murat EKREMOĞLU¹ , Cevahir ALTINKAYNAK^{2,*} 

¹ Altınbaş Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 34147 İstanbul, Türkiye

² Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Avanos Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, 50500, Nevşehir, Türkiye

ÖZET

Enzim bağlı immünosorbent analizinde (ELISA); hedef molekülleri yüksek hassasiyet ve seçicilikle tespit etmek için fonksiyonel moleküllerin mikro plaka üzerindeki immobilizasyon verimlerinin artırılması ve sinyal-gürültü oranının yükseltilmesi önemlidir. Bu amaçla konvansiyonel immobilizasyon yöntemleri kullanılarak antikorla fonksiyonelleştirilmiş malzemeler yüksek enzim kapasitesi ile dikkate değer sinyal artışına neden olabilir. Son yıllarda farklı bir enzim immobilizasyon yöntemi olan protein/enzim ve $Cu_3(PO_4)_2$ içeren hibrit yapılar hiyerarşik mikro yapılara sahip olmaları ve geniş aktif yüzey alanları oluşturmaları neticesinde içeriğindeki protein yapıları moleküllerin serbest formuna göre daha yüksek katalitik aktivite gösterebilmektedir.

Bu çalışma kapsamında; protein-inorganik hibrit yapı sentez metodu kullanılarak enzimi, antikor ve $Cu_3(PO_4)_2$ 'in hepsi bir arada olacak şekilde antikorla fonksiyonelleştirilmiş hibrit konjugat sistemleri sentezlenmiş, oluşan yapıların karakterizasyonları SEM, EDX, XRD ve FTIR analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmalar sonucu elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, hibrit nano yapı 183,5 EU/mg peroksidaz aktivitesi gösterirken serbest HRP enzimi 59,01 EU/mg aktivite göstermiştir. TNF-alfa'ya spesifik çeşitli antikorlar kullanılarak hazırlanan hibrit konjugat yapılar 5-1000 $\mu g mL^{-1}$ aralığındaki konsantrasyonlarda kullanılarak ELISA sistemindeki performansı ölçülmüştür. Çoklu organik molekül içeren hibrit konjugat yapının ELISA sistemindeki performansı diğer yapılara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu metod; ELISA'da antikorların enzimle işaretlenmesi yöntemi yerine geçebilecek pratik olarak uygulanabilirliği kanıtlanmış bir uygulamadır.

Anahtar Kelimeler: Hibrit konjugat, protein-inorganik hibrit yapı, ELISA

USABILITY OF PROTEIN-INORGANIC HYBRID CONJUGATE IN ELISA SYSTEM

ABSTRACT

In the Enzyme-linked immunosorbent assay method (ELISA), it is important to increase the immobilization efficiency of the functional molecules on the microplate and increase the signal-to-noise ratio in order to detect the target molecules with high sensitivity and selectivity. For this purpose, antibody functionalized materials can generate remarkable signal amplification with high enzyme capacity by using conventional immobilization methods. Recently, hybrid structures containing protein/enzyme and $Cu_3(PO_4)_2$, which is a different enzyme immobilization method, have higher catalytic activity compared to the free form of protein-containing molecules as they have hierarchical microstructures and form large active surface areas. In this study; using protein-inorganic hybrid structure synthesis method, hybrid functionalized conjugate systems with enzyme, antibody and $Cu_3(PO_4)_2$ were synthesized all together and characterization of the resulting structures was performed by SEM, EDX, XRD and FTIR analysis. When the findings obtained from the researches were evaluated, the hybrid nano structure showed 183.5 EU/mg peroxidase activity and free HRP enzyme showed 59.01 EU/mg activity. The performance of the ELISA system was measured using hybrid conjugate constructs prepared using various TNF-alpha specific antibodies at a concentration of 5-1000 $\mu g mL^{-1}$. The performance of hybrid conjugate structure containing multiple organic molecules in ELISA system was higher than other structures. This method is a highly practical method that can replace enzyme-labeled antibody method in ELISA.

Keywords Hybrid conjugate, Protein-inorganic hybrid structure, ELISA

*Sorumlu Yazar: caltinkaynak@nevsehir.edu.tr

Geliş: 09.08.2019 Yayın: 30.07.2020

1. GİRİŐ

ELISA; Engvall ve Perlmann tarafından 1971 yılında geliştirilmiş günümüzde kantitatif analiz alanında sıklıkla kullanılan hassas, seçici, basit ve çok sayıda numuneyi hızlı ve aynı anda analiz edebilen immüendiagnostik bir tekniktir [1, 2, 3]. Serolojik testlerde enzimlerin yüksek katalitik aktivitesinden faydalanılarak sinyal çoğalması yoluyla hedef molekülün (antijen) iz miktarının tespitinde kullanılır [4]. Gelişiminden bu yana ELISA, gıda endüstrisindeki uygulamalarda, serolojik kan testlerinde ve toksikolojide sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur. Geleneksel ELISA tekniğinde, kaplama reaktiflerinin (yani antijen veya antikor) eklenmesi esas olarak moleküller ile mikro plaka yüzeyi arasındaki elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlere dayanmaktadır. Küçük moleküllerin ELISA plakasına bağlanma yetenekleriyle sonuçlanan zayıf etkileşimler nispeten düşüktür ve ELISA test performansının üzerine azaltıcı etkileri olduğu tespit edilmiştir [5,6]. Bu nedenlerden dolayı hedef molekülleri yüksek hassasiyet ve seçicilikle tespit etmek için fonksiyonel moleküllerin mikro plaka üzerindeki immobilizasyon verimlerinin artırılması ve sinyal-gürültü oranının yükseltilmesi önem arz etmektedir.

Tekniğin pratik uygulamalarında enzim-substrat etkileşimi, enzimatik aktivite, inkübasyon koşulları, yalancı pozitif ve konjugat gibi bir dizi değişken parametre analiz sonucunu etkilemektedir [7]. Tüm faktörler arasında enzimle işaretli antikor (konjugat) bu tekniğin kritik reaktifidir. Konvansiyonel enzim işaretli antikor nispeten düşük bir duyarlılığa sahiptir ve glutaraldehit yöntemi ve periodat yöntemi [8] dahil olmak üzere ana hazırlama yöntemleri nispeten karmaşık ve verimsizdir. Bu, sebeple bu durumu iyileştirmek için yeni enzim-antikor konjugat sistemlerine gereksinim olduğu açıktır. Örneğin; Speroni ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada antikor kaplı manyetik mikropartikülleri ELISA test sisteminde kullanarak gıdalardaki alerjen maddelerin hassas tespitini gerçekleştirmişlerdir [9]. Enzim-yüklü nanomateryal ile işaretlenmiş antikorlar yüksek enzim kapasitesine sahiptirler ve analizlerde dikkate değer sinyal amplifikasyonu oluşturmaktadır [10, 11, 2]. Bununla birlikte antikorla fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküllerin hazırlanması sırasında konvansiyonel immobilizasyon yöntemleri kullanılmakta, bu da çoğu zaman enzimin stabilitesinde artışa neden olurken aktivitesinde de düşüşe neden olmaktadır [7, 2].

Son birkaç yıldır, farklı ve yeni bir enzim immobilizasyon yaklaşımı protein-inorganik hibrit yapı metodu kullanılarak enzimlerin aktivitesinin ve kararlılığının yükseltilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla bazı protein / enzim ve metal iyonlarının (özellikle Cu^{2+}) inkübasyonu ile hibrit yapıların sentezi literatürde rapor edilmiştir [12]. Bu yöntemde inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonu ve organik bileşen olarak çeşitli protein ve enzimler kullanılarak nano yapraklardan oluşan mikrometre boyutlu protein-inorganik hibrit yapıların oluşumu gösterilmiştir [13]. Bu yöntemle immobilize edilmiş enzimlerin kararlılıklarının ve aktivitelerinin serbest enzimlere göre yüksek olduğu bilinmektedir [12, 14-18]. Protein ve $Cu_3(P0_4)_2$ içeren protein-inorganik hibrit yapılar; hazırlanması kolay, farklı hiyerarşık mikro yapıları olması, geniş aktif yüzey alanlarına sahip olmaları ve birçok antikor ve enzim ile çok zorlanmadan etkileşebilmeleri nedeniyle oldukça ilgi çekmektedirler. Ayrıca enzim-inorganik hibrit bileşimi serbest formun katalitik aktivitesini artırmanın yanı sıra stabilizeyi de olumlu yönde etkilemektedir [2, 12, 19-23]. Tüm bu özellikleri sebebiyle farklı biyomoleküllerin belirlenmesinde kullanılabilir yapıları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [13, 17, 24, 25]. Hibrit fonksiyonel materyaller, çok sayıda tanıma molekülünün, örneğin antikorların, enzimlerin ya da organik tanıma moleküllerinin immobilizasyonunu kolaylaştıran yüzey-hacim oranına sahip olduklarından, bu malzemeler yaygın olarak glukoz [20], H_2O_2 [19], küçük organik moleküller [17], hatta bakterilerin (örneğin, *Escherichia coli*) [2] tespiti ve ayrıca bileşiklerin etkileşim yeteneğini geliştirmek için kullanılmıştır.

Bu çalışma kapsamında; protein-inorganik hibrit yapı sentez teknolojisi kullanılarak antikorla fonksiyonelleştirilmiş hibrit konjugat sistemleri (HK) optimum koşullarda sentezlenmiş, oluşan yapılar Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) yardımıyla görüntülenmiş ve yapının karakterizasyonları Enerji Dağılımlı X-ışınları (EDX), X-ışını Kırınımı (XRD) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

(FTIR) analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Ardından hibrit konjugat yapının ELISA sisteminde çalışabilirliği TNF- α ve TNF- α 'ya spesifik çeşitli antikolar kullanılarak test edilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasallar-

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), İnflksimab (Ab₁: Remicade® ve Ab₂: Remsima®) Adalimumab (Ab₃:Humira®), at turpu peroksidaz enzimi (HRP), bovine serum albümin, NaH₂PO₄, CuSO₄.5H₂O, etanol, fosforik asit, coomassie brilliant blue G-250, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, HCl, NaOH, Sukroz, H₂SO₄, Tween 20, TMB Sigma-Aldrich' ten temin edilmiştir.

2.2. Hibrit Konjugatın Hazırlanması

Hibrit konjugat (HK) sentezinde; Zare ve ark. tarafından rapor edilen protein-inorganik hibrit yapı sentez metodu bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır [12]. Sentez için öncelikle 120 mM konsantrasyonda stok CuSO₄.5H₂O ve 0.01 M PBS (pH 7.4) özeltileri hazırlanmıştır. Ardından 4 farklı tüpte hibrit konjugat sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez sırasında farklı konsantrasyonlarda protein içeren (HRP, Ab₁, Ab₂, Ab₃) fosfat tampon (pH 7.4) üzerine stok bakır çözeltilisinden 0.8 mM konsantrasyon olacak şekilde ilave edilmiştir. Karışım 30 s vortekslenmiş ve +4°C'de 72 h boyunca el değmeden inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerin dibinde oluşan mavi renkli pellet 5000 g'de 10 dk santrifüj sonrası toplanmış, 3 defa saf suda yıkanıp ve 30°C'de etüvde kurutulularak sonraki uygulamalar için saklanmıştır. Süpernatanta protein tayini yapılmıştır.

Sentezi yapılan HK yapılarının son konsantrasyonları şu şekildedir;

HK-1: 0,00125 mg mL⁻¹ Ab₁, Ab₂, Ab₃ (1:1:1) karışımı, 0,02 mg mL⁻¹ HRP, 0.8 mM CuSO₄

HK-2: 0,00125 mg mL⁻¹ Ab₁, 0,02 mg mL⁻¹ HRP, 0.8 mM CuSO₄

HK-3: 0,00125 mg mL⁻¹ Ab₂, 0,02 mg mL⁻¹ HRP, 0.8 mM CuSO₄

HK-4: 0,00125 mg mL⁻¹ Ab₃, 0,02 mg mL⁻¹ HRP, 0.8 mM CuSO₄

Blank: Protein/Enzim içermeyen hibrit yapı (0.8 mM CuSO₄)

2.3. Hibrit Konjugatın Karakterizasyonu

HK yapı morfolojisi SEM ile görüntülenmiştir. Hibrit yapının EDX ölçümleri ile elementel analizi yapılmış, yapıdaki Cu metalinin varlığı tespit edilmiştir. Sentezlenen hibrit yapının kristal yapısı XRD ile kimyasal yapısı ise FTIR ile aydınlatılmıştır.

2.4. Direkt ELISA Yönteminde Hibrit Konjugatın Test Edilmesi

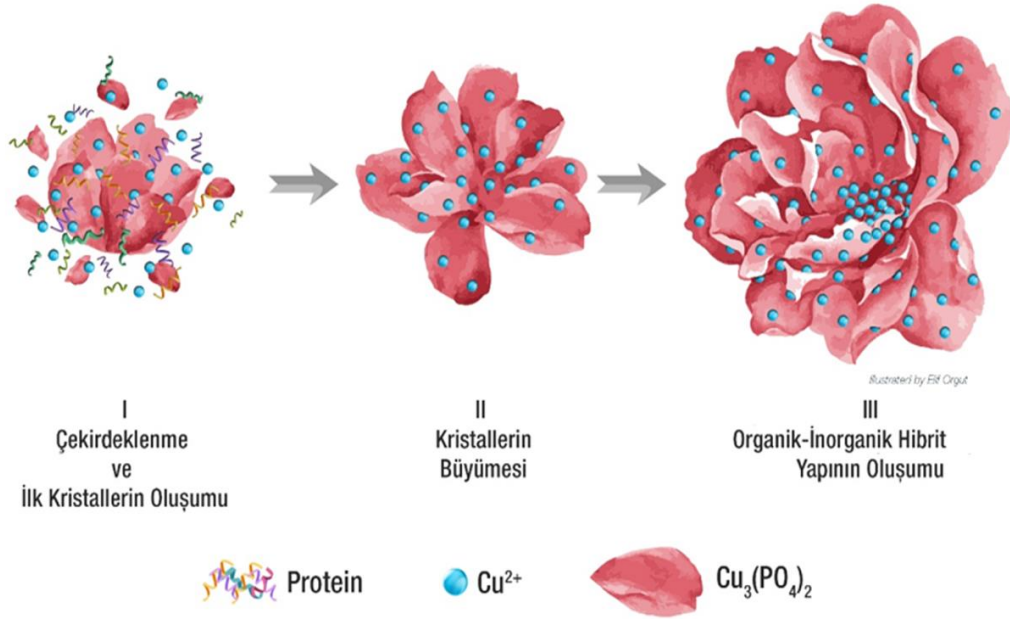
Plastik kuyucuklar; TNF- α içeren, 50-100 μ g protein/plak ve 40 μ g şeker/plak konsantrasyonu şeklinde 0,05 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6,8 kaplama solüsyonu ile her kuyuda 100 μ l hacim olacak şekilde kaplanmıştır. Plak üzeri seal ile kapatılmış ve +4 °C' de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün plak +4 °C' den çıkarılmış, 1 saat oda sıcaklığında bekletilmıştir. Yıkama tamponuyla (PBS-%0,5 Tween 20) 100 μ l/kuyu olacak şekilde 3 defa yıkanmıştır. Plak içi havlu kâğıda hızlıca vurularak kurutulmuştur. 200 μ l/kuyu olacak şekilde bloklama ajanı (0.01 M PBS-%1 BSA) eklenmiş ve üzeri kapatıldıktan sonra 30 dk 37 °C' de ardından 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre bitiminde plak içi aspire edilmiştir. Ardından hibrit konjugatın 5-1000 μ g mL⁻¹ konsantrasyon aralığında fosfat tampon içerisinde stok çözeltileri hazırlanmış ve 100 μ l/kuyu olacak şekilde kuyucuklara dağılmıştır. 30 ve 60 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübasyon süresi bitiminde yıkama tamponu ile 100 μ l/kuyu olacak şekilde 3 defa yıkanmıştır. Plak içi havlu kâğıda hızlıca vurularak kurutulmuştur. TMB Substrat 100 μ l/kuyu olacak şekilde eklenip, 10-15 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 M H₂SO₄ özeltilisinden 50 μ l/kuyu olacak şekilde ilave edilmiş ve 450 nm'de okuma yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Hibrit Konjugatın Morfolojisi ve Karakterizasyonu

Hibrit konjugat yapılar materyal ve yöntemde anlatıldığı şekilde sentezlenmiştir. HK sentezinde organik bileşen olarak HRP enzimi yanında hem ayrı ayrı hem de birlikte bir havuz oluşturacak şekilde anti-TNF antikorlar (Ab_1 , Ab_2 , Ab_3) kullanılırken inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonları kullanılmıştır. Bu yöntem de çiçek benzeri morfoloji gösteren HK yapıların iskeleti, fosfat tamponu ile Cu^{2+} nin oluşturduğu yapıyla proteinlerin kompleks oluşturması esasına dayanarak örülür. Şekil 1.' de gösterildiği gibi ilk olarak birincil bakır fosfat kristalleri oluşur. Bu aşamada protein molekülleri baskın olarak Cu^{2+} iyonları ile özellikle protein omurgasındaki amin gruplarının koordinasyonu sayesinde kompleksler oluştururlar. Oluşan bu kompleksler bakır fosfat birincil kristallerin çekirdeklenme alanları haline gelir. İkincil büyüme aşamasında, protein molekülleri ve primer kristaller iri topraklar haline gelir. Bakır fosfat kristallerinin kinetik olarak kontrolü agregatların yüzeyindeki bireysel bakır bağlayıcı bölgelerden kaynaklanır bu da ayrı ayrı yaprakların oluşmasına neden olur.

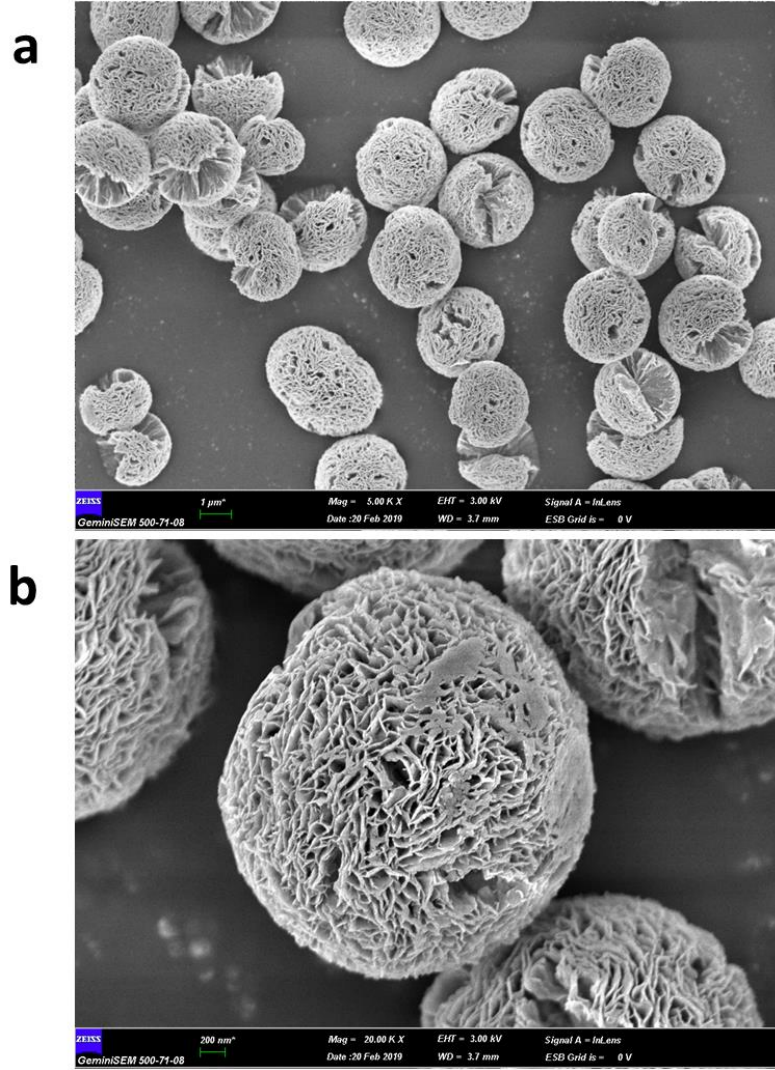
Son aşamada anizotropik büyüme dallı ve çiçek benzeri bir yapının oluşması ile sonuçlanır. Bu büyüme sürecinde, protein yaprak iskeletinin oluşturulması için bakır fosfat kristalleri çekirdeklenmeyi indüklemekte ve yaprakları birbirine bağlamak için bir “tutkal” olarak görev yapmaktadır. Nano boyuttaki bu yaprak şekilli yapılar bir araya gelerek birbirine bağlanırlar ve çiçek benzeri şekillere sahip yapılar oluştururlar. Bu nedenle sentezlenen yapılar ilk defa Zare ve ark. [12] tarafından “çiçek benzeri hibrit nano yapı-*Nanoflower*” olarak adlandırılmıştır.



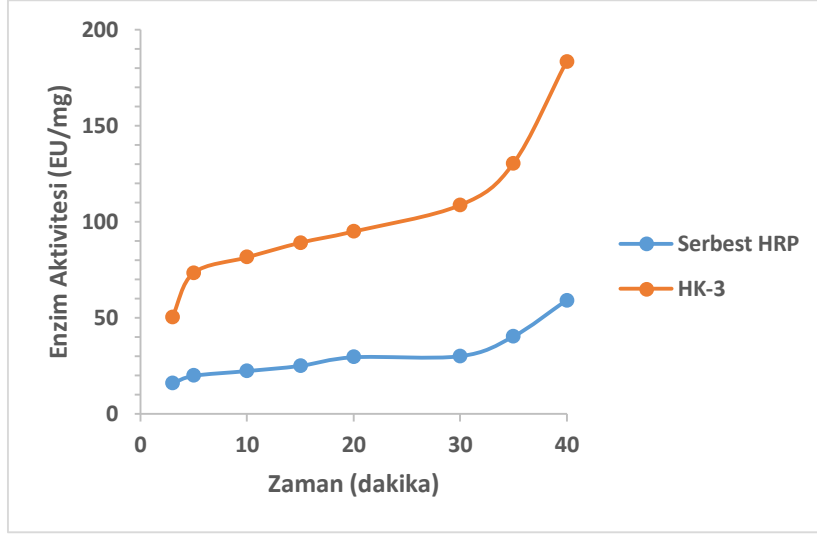
Şekil 1. Çiçek benzeri hibrit konjugat yapıların oluşum mekanizması. Cu^{2+} iyonları (Mavi renkli) protein yapılı enzim ve antikorların (kırmızı renkli) amin gruplarına bağlanmaktadır.

HK yapılarının enkapsüle ettiği antikor/enzim miktarı sentez sonrasında süpernatanta kantitatif protein tayini yapılmasıyla belirlenmiştir. Protein tayini sonucunda ortama ilave edilen protein yapılı bileşenlerin tamamının hibrit yapı içerisinde enkapsüle olduğu tespit edilmiştir. Şekil 2' de görüldüğü üzere pH 7.4'te gerçekleştirilen sentezde elde edilen yapı morfolojisi küre şeklinde, büyük ve yaprakları sıkı paketlenmiş haldedir. Ayrıca 2-3 μm boyutunda düzgün ve homojen çiçek benzeri yapı görünmektedir. Ortama organik molekül ilave edilmediğinde çiçek benzeri hibrit yapı oluşmamaktadır. Sentezde kullanılan bu yöntem yeni bir enzim immobilizasyon yöntemidir. Nanomalzemelerin enzim

immobilizasyonların da kullanılması; malzemelerin boyutunun ve şeklinin kolayca kontrol edilebilmesi, geniş yüzey alanı oluşturması ve malzemelerin yüzeyine enzimlerin kolaylıkla bağlanması gibi avantajlar sunmaktadır. Yöntemde geniş yüzey alanına sahip nano malzemelere çok miktarda enzimin/antikorun bağlanması sağlanarak yüksek katalitik aktivite ve kararlılık göstermesi hedeflenmiştir. HK yapısında yer alan HRP enziminin aktivitesinin ve kararlılığının serbest formuna göre dikkat çekici ölçüde arttığı önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır^{16,20}. Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre HK-3 (183,5 EU/mg) ve serbest HRP (59,01 EU/mg) enziminin aktivitesi karşılaştırılmış ve hibrit yapının gösterdiği aktivite Şekil 3’ de görüldüğü üzere serbest forma göre 3 kat daha yüksek bulunmuştur. Hibrit yapının stabilitesi 15 güne kadar kontrol edilmiş olup ilk sergilenen peroksidaz aktivitesi %15 oranında azalma göstermiştir. Sentezlenen protein-inorganik hibrit yapıların aktivitelerinin artmasının, muhtemel sebepleri şu şekildedir: (1) oluşan yapıların yüksek yüzey alanına sahip olması önemli bir kütle transfer sınırlaması oluşturmaz, (2) nano ölçekte hapsedilmiş enzim moleküllerinin kooperatif etkisi ve (3) enzimin yapısında metal iyonu içermesidir. Şekil 2 (b) incelendiğinde porlu yüzey alanına sahip olan HK yapılarında HRP/Ab₂’nin aminoasit rezidüleri ve Cu iyonu arasında oluşan kooperatif etki ile yapının stabilitesi ve katalitik aktivitesi artmaktadır [26].

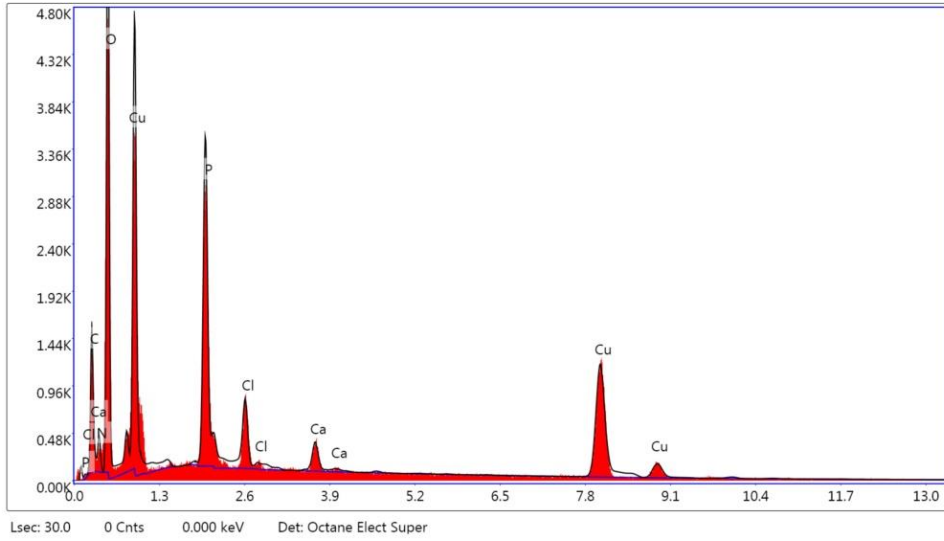


Şekil 2. İnfliksimab (Ab₂) ve HRP enzimi içeren hibrit konjugatın (HK-3) SEM görüntüsü (a) 5.00 K.X büyütme (b) 20.00 K.X büyütme



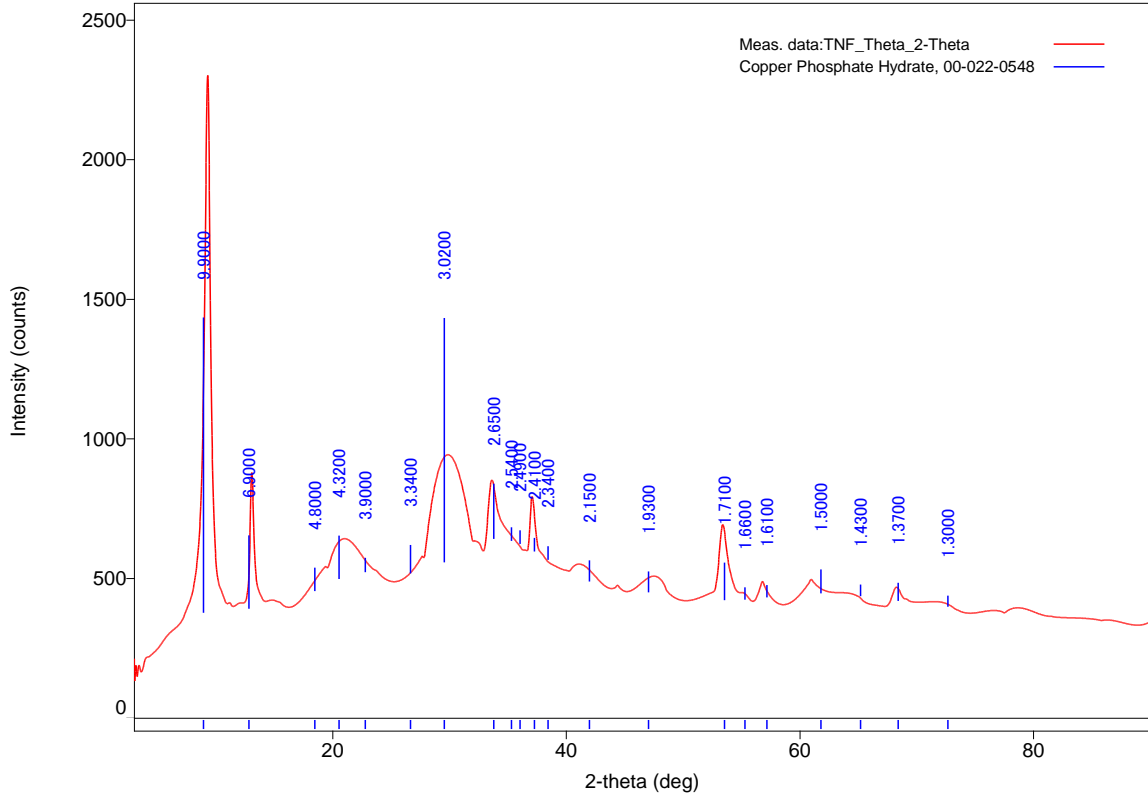
Şekil 3. HK-3 ve serbest HRP enziminin aktivite karşılaştırması

Sentezlenen HK-3 yapısındaki bakır metalinin varlığı EDX tekniği ile analiz edilmiştir. Şekil 4’ te verilen EDX spektrumundan Cu metaline karşılık gelen pikler açıkça görülmektedir. Hibrit nano yapı sentezinin, karakterizasyonunun yapıldığı diğer çalışmalarda da kristal yapı içerisindeki elementler görüntülenmiştir [2, 12, 21].



Şekil 4. İnfliksimab (Ab₂) ve HRP enzimi içeren hibrit konjugatın (HK-3) EDX sonucu

Şekil 5’te görüldüğü üzere, XRD spektrumu ile hibrit konjugat yapı karakterize edilmiştir. Hibrit yapının pik pozisyonları ve şiddetleri verilen XRD spektrumunda (Şekil 5) görülmektedir ve Cu₃(PO₄) nano kristallerin kırınım pikleri JCPDS kart (00-022-0548) ile uyum içindedir.



Şekil 5. HK-3 yapısının XRD spektrumu. (JCPDS card no: 00-022-0548, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

Serbest Ab_2 , HRP enzimi ve HK-3 yapısı hakkında bilgi sahibi olmak ve hibrit yapı formuna geçildiğinde serbest yapıda meydana gelen değişiklikleri incelemek için FTIR spektrum analizi yapılmıştır. Serbest HRP, serbest Ab_2 ve HK-3 yapısının karakteristik pikleri sırasıyla Şekil 6 (a), (b) ve (c)'de verilen FTIR spektrumunda gösterilmiştir. Şekil 6'da serbest formda $\sim 570 \text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 620 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen O=P-O grubu frekansı immobilize edilmiş yapıda Şekil 3.6 (c)'de görüldüğü üzere $\sim 550\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ 'deki frekanslarına kayma göstermiştir. Serbest HRP protein iskelet yapısında yer alan peptit bağının C=O titreşimi, N-H bükülmesi ve C-N titreşimi ile amit I bandı $\sim 1656 \text{ cm}^{-1}$ ve amid II bandı ise $\sim 1546 \text{ cm}^{-1}$ da pik vermiştir. ~ 990 , ~ 1075 ve $\sim 1146 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar P=O grubuna spesifiktir ve HK-3 yapısında gerilim azalarak tek bir bant olarak $\sim 990\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$ frekans aralığına kaymıştır. $-\text{NH}_2$ grubunun titreşim bandı serbest HRP enziminde $\sim 1634 \text{ cm}^{-1}$ iken hibrit yapıda kayma göstererek $\sim 1400\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$ titreşim aralığında görünmektedir. $\sim 3000\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında yer alan bantlar $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarına aittir, serbest HRP ve Ab_2 molekülünde bu bantlar şiddetli iken hibrit yapıda daha zayıf olarak görülmüştür.

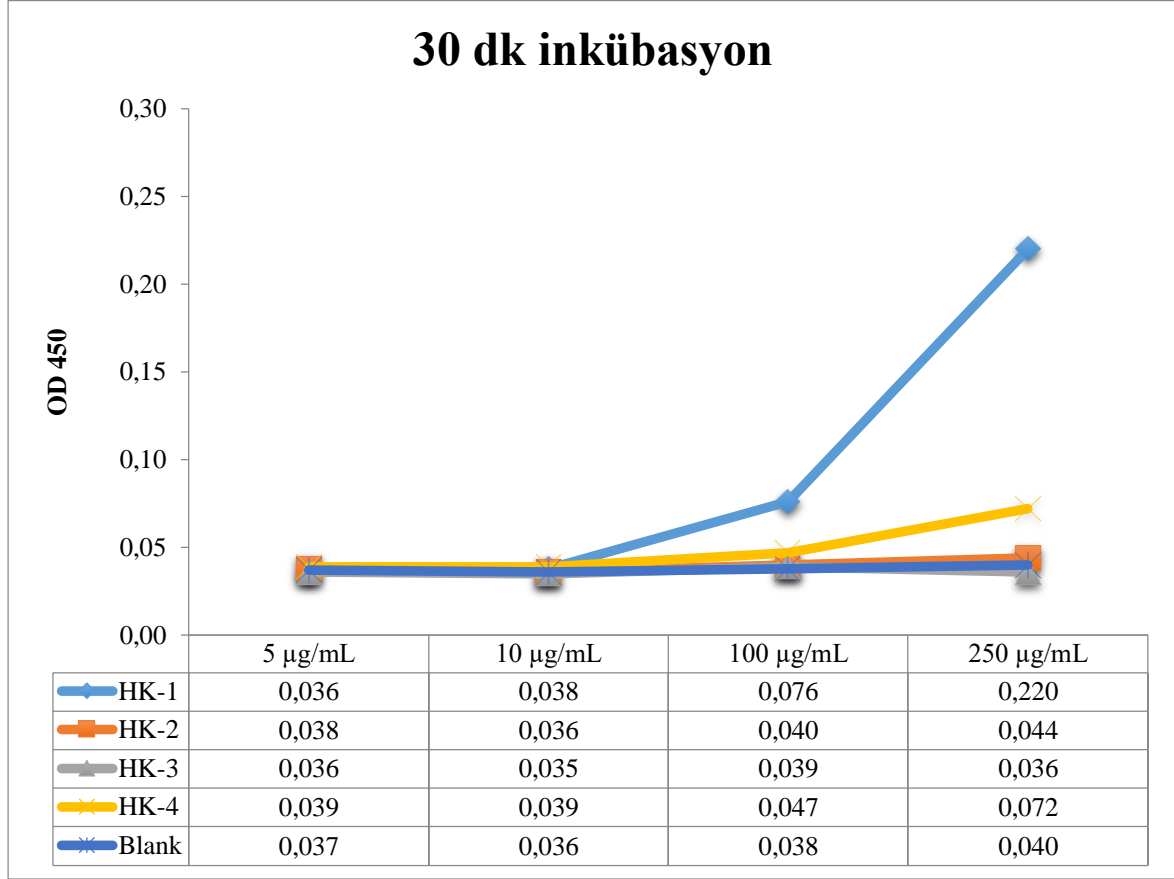


Şekil 6. (a) Serbest HRP (b) Serbest Ab₂ ve (c) HK-3 yapısının FTIR spektrumu

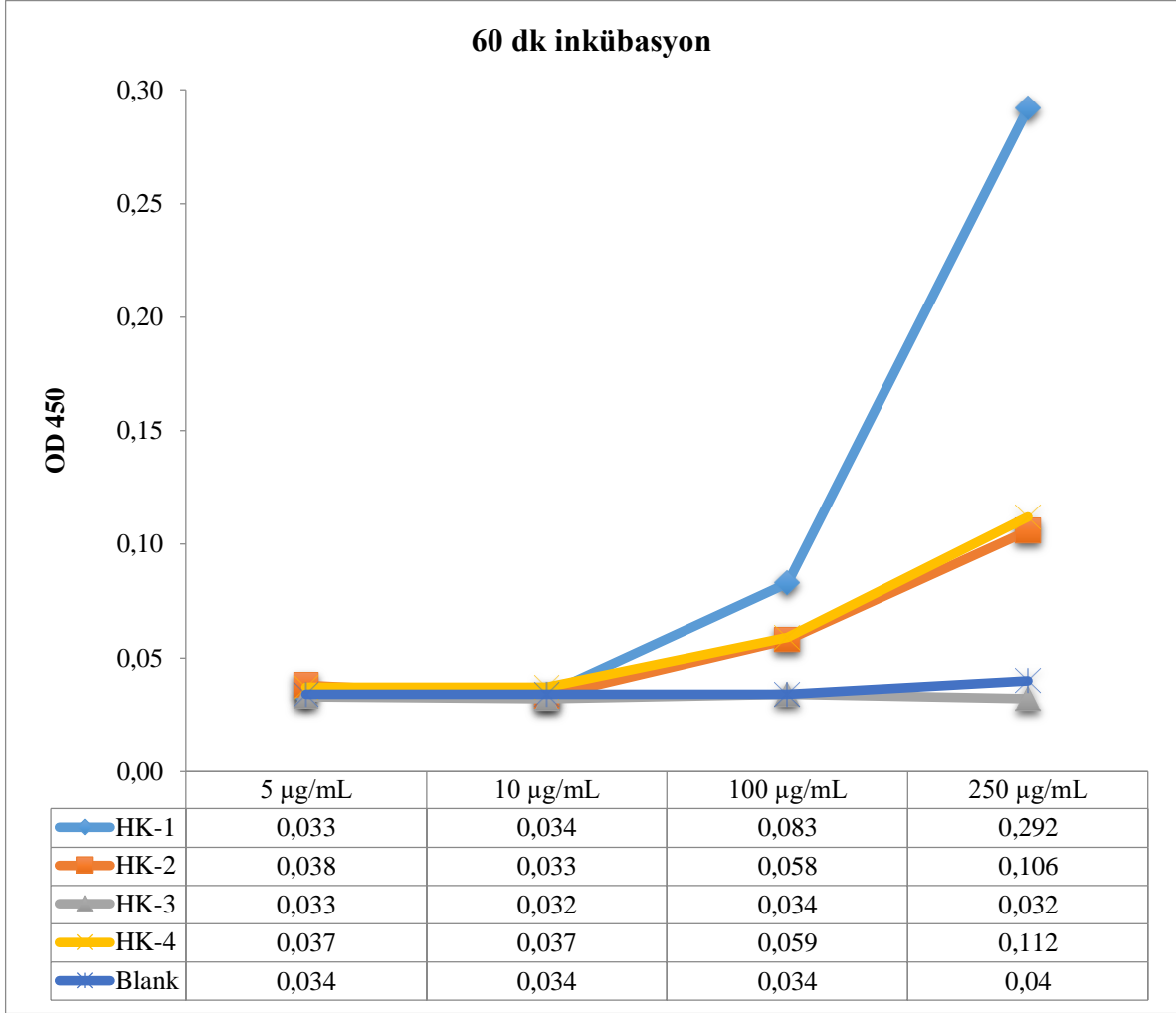
3.2. Hibrit Konjugatın Direkt ELISA Yöntemindeki Performansı

Hibrit konjugat temelli ELISA sisteminde TNF- α kaplanmış plak kullanılmıştır. Sentezlenen dört farklı hibrit konjugat 5-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında performans tespiti amacıyla ilave edilmiş ve bağlanma düzeyleri 450 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür. İlk olarak TNF- α kaplı plak üzerine 5-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında sentezlenen HK türleri ilave edilip 30 dk inkübasyon sonrası elde edilen absorbans değerleri ölçülmüştür (Şekil 7). 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda ilave edilen HK değerlerinde farklılık gözlenmezken 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda ilave edilen HK-1 (Ab₁, Ab₂, Ab₃ (1:1:1) değerinde artış gözlenerek sırasıyla 0,076 ve 0,220 absorbans yanıt vermiştir. İnkübasyon süresi 30 dk'dan 60 dk'ya çıkarıldığında üçlü antikor türü içeren HK-1 yapısında 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda benzer yanıt alınırken 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda absorbans değeri artarak 0.292 absorbansa çıkmıştır. Şekil 7 ve Şekil 8 incelendiğinde HK-1 yapısı hem 30 dk hem de 60 dk inkübasyon sonucunda diğer HK türlerine göre daha yüksek absorbans yanıtı vermiştir. HK yapılarının içerisinde eş miktarda yani 0,02 mg mL⁻¹ konsantrasyonda HRP enzimi yer almaktadır. Oysa antikor miktarları ve içerikleri farklıdır. HK-2, HK-3 ve HK-4 içerisinde 0,00125 mg mL⁻¹ konsantrasyonda sırasıyla Ab₁, Ab₂ ve Ab₃ antikorları mevcuttur. HK-1 yapısında ise her bir antikor 0,000417 mg mL⁻¹ konsantrasyonda yapının içerisinde olmak üzere diğer yapılara göre 3 kat daha az bulunmaktadır. Buna rağmen fazla sayıda organik molekül içeren hibrit konjugatın (HK-1) ELISA sistemindeki performansı daha yüksektir.

ELISA performansına hibrit yapı iskeletini oluşturan Cu₃(PO₄) nano kristallerin etkisi olup olmadığının gözlenmesi amacıyla Blank=protein içermeyen hibrit yapı (0.8 mM CuSO₄)'nın absorbans değerleri de kontrol edilmiştir. Şekil 7 ve 8'de görüldüğü gibi hem konsantrasyon hemde inkübasyon süresi artırılmasına rağmen protein içermeyen hibrit yapının eşik değeri düşük bulunmuştur.

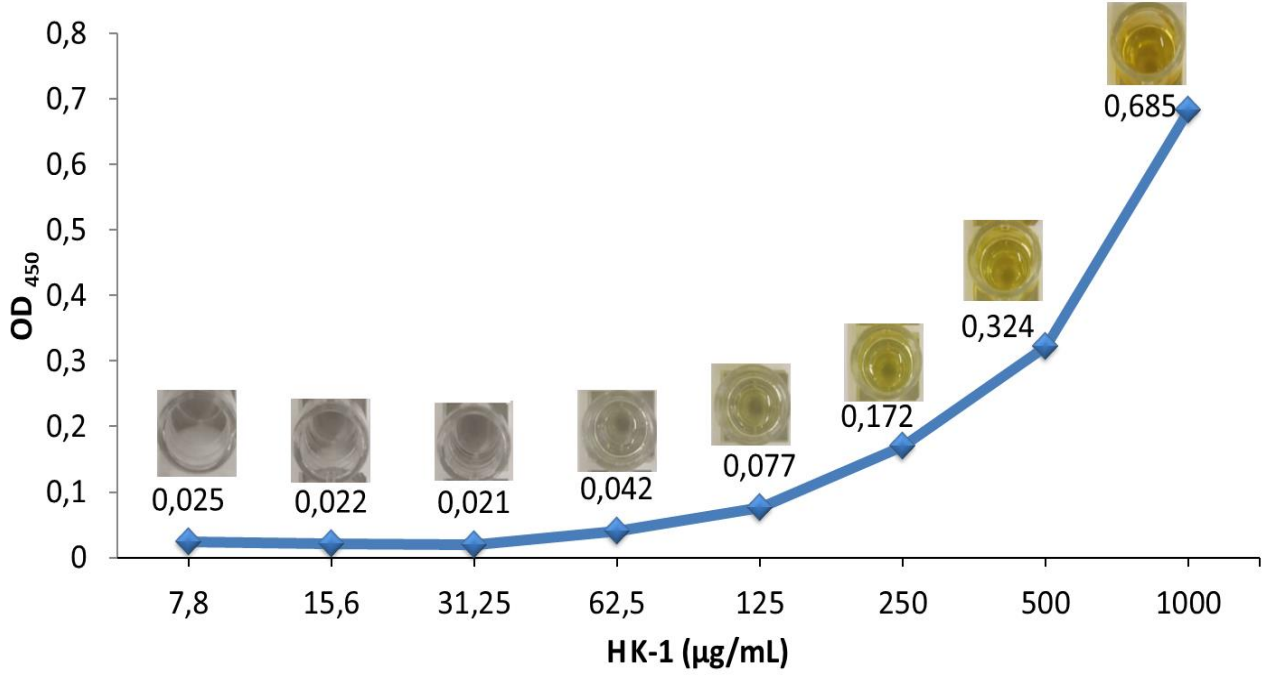


Şekil 7. Direkt ELISA yönteminde farklı konsantrasyonlarda HK kullanılarak 30 dk'lık inkübasyon sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri



Şekil 8. Direkt ELISA yönteminde farklı konsantrasyonlarda HK kullanılarak 60 dk'lık inkübasyon sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri

ELISA sisteminde; HK-1 yapısının konsantrasyonu $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ değerine kadar artırıldıktan sonra elde edilmiş absorbans değerleri Şekil 9'da gösterilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere $7,8-1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki konsantrasyonda kullanılan Ab_1 , Ab_2 ve Ab_3 antikollarını içeren hibrit konjugat 30 dk inkübasyon sonucunda 450 nm 'de $0,685$ absorbans yanıtı vermiştir.



Şekil 9. Direkt ELISA yönteminde farklı konsantrasyonlarda HK-1 kullanılarak 30 dk'lık inkübasyon sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ilk defa tek bir basamakta HRP enzimi ile birlikte tekli/çoklu antikor bağlanmış hibrit konjugat yapılar sentezlenmiş, karakterizasyonu yapılmış ve direkt ELISA sisteminde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Konvansiyonel enzim immobilizasyon yöntemlerinde enzimin stabilitesi artmasına rağmen çoğunlukla enzimatik aktivitesi düşmektedir [27]. Protein-inorganik hibrit yapı yönteminde ise enzimin hem stabilitesi hem de aktivitesi artmaktadır [28]. Bu çalışmada ise hibrit nano yapı içerisinde yer alan HRP enziminin hem stabilitesi hem de enzimatik aktivitesi artmıştır. Sentezlenen HK-3 183,5 EU/mg aktivite gösterirken ve serbest HRP enzimi 59,01 EU/mg aktivite göstermektedir. Ayrıca 15 güne kadar sadece %15 oranında bir aktivite kaybı yaşanmaktadır. Konvansiyonel ELISA yönteminde kullanılan HRP ile işaretlenmiş antikorların enzim ile işaretlenmesi için öncelikle HRP'nin aktive edilerek proteinlerle bağlanması sağlanmalıdır. Bu amaçla enzime bağlı antikor bazlı ELISA yönteminde kullanılan antikorun işaretlenmesi ayrı bir deneysel prosedür olup, hem zaman kaybı oluşturmakta hem de uzmanlık gerektirmektedir. İşaretleme basamaklarında organik solventler kullanılması sebebiyle kullanılan yöntem ELISA sisteminde düşük duyarlılığa neden olmaktadır. Bu çalışmada tanımlanan hibrit konjugat sayesinde konvansiyonel yöntemlerde bir gereklilik olan enzimle işaretleme basamağı ortadan kaldırılmış olup her antikorun ELISA sisteminde ön işlemlere tabi tutulmadan direkt kullanılabilmesi bir forma indirgenmiştir. Uygulanan yöntem sonucunda hibrit konjugatın ELISA sisteminde pratik olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. HK yapılarının içerdiği antikor miktarları ve türleri birbirinden farklı olarak test edildiğinde Ab₁, Ab₂ ve Ab₃ antikorlarını içeren HK-1 yapısının ELISA sistemindeki performansı HK-2, HK-3 ve HK-4 ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç çoklu organik yapıların hibrit konjugat içerisinde etkin bir şekilde fonksiyonunu gerçekleştirdiğini kanıtlamaktadır. Bu metot ELISA'da enzimle işaretli antikor yöntemi yerine pratik olarak geçebilecek önemli bir potansiyel yöntem özelliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874 (1971).
- [2] Wei T, Du D, Zhu M.-J, Lin Y, Dai Z. An Improved Ultrasensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Hydrangea-Like Antibody-Enzyme-Inorganic Three-in-One Nanocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 6329–6335 (2016).
- [3] Ram J, Nakane P, Rawlinson D, Pierce G. Enzyme labelled antibodies for ultrastructural studies. *Fed Proc* 25, (1966).
- [4] Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br. J. Hosp. Med. Lond. Engl.* 2005 77, C98-101 (2016).
- [5] Ball JM, Henry NL, Montelaro RC, Newman MJA. versatile synthetic peptide-based ELISA for identifying antibody epitopes. *J. Immunol. Methods* 171, 37–44 (1994).
- [6] Stearns NA, Zhou S, Petri M, Binder SR, Pisetsky DS. The Use of Poly-L-Lysine as a Capture Agent to Enhance the Detection of Antinuclear Antibodies by ELISA. *PLOS ONE* 11, e0161818 (2016).
- [7] Tong S, Ren B, Zheng Z, Shen H, Bao G, Tiny Grains Give Huge Gains: Nanocrystal-Based Signal Amplification for Biomolecule Detection - ACS Nano (ACS Publications). Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn400733t>. (Accessed: 11th May 2019)
- [8] Jeanson A, Cloes JM, Bouchet M, Rentier B. Comparison of conjugation procedures for the preparation of monoclonal antibody-enzyme conjugates. *J. Immunol. Methods* 111, 261–270 (1988).
- [9] Speroni F, Elviri L, Careri M, Mangia A. Magnetic particles functionalized with PAMAM-dendrimers and antibodies: a new system for an ELISA method able to detect Ara h3/4 peanut allergen in foods. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3035–3042 (2010).
- [10] Lin H, Liu Y, Huo J, Zhang A, Pan Y, Bai H, Jiao Z, Fang T, Wang X, Cai Y, Wang Q, Zhang Y, Qian X. Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Strategy Using Graphene Oxide Sheets and Gold Nanoparticles Functionalized with Different Antibody Types - Analytical Chemistry (ACS Publications). Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac401075u>. (Accessed: 11th May 2019)
- [11] Qu Z, Xu H, Xu P, Chen K, Mu R, Fu J, Gu H. Ultrasensitive ELISA Using Enzyme-Loaded Nanospherical Brushes as Labels. *Anal. Chem.* 86, 9367–9371 (2014).
- [12] Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat. Nanotechnol.* 7, 428–432 (2012).
- [13] Altinkaynak C, Kocazorbaz E, Özdemir N, Zihnioglu F. Egg white hybrid nanoflower (EW-hNF) with biomimetic polyphenol oxidase reactivity: Synthesis, characterization and potential use in decolorization of synthetic dyes. *Int. J. Biol. Macromol.* 109, 205–211 (2018).
- [14] Shende P, Kasture P, Gaud RS. Nanoflowers: the future trend of nanotechnology for multi-applications. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 46, 413–422 (2018).

- [15] Lee SW, Cheon SA, Kim MI, Park TJ. Organic-inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *J. Nanobiotechnology* 13, 54 (2015).
- [16] Altinkaynak C, Tavlasoglu S, Özdemir N, Ocsoy I. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme Microb. Technol.* 93–94, 105–112 (2016).
- [17] Altinkaynak C, Yilmaz I, Koksal Z, Özdemir H, Ocsoy I, Özdemir N. Preparation of lactoperoxidase incorporated hybrid nanoflower and its excellent activity and stability. *Int. J. Biol. Macromol.* 84, 402–409 (2016).
- [18] Somturk B; Yilmaz I; Altinkaynak C, Karatepe A, Özdemir N, Ocsoy I. Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. *Enzyme Microb. Technol.* 86, 134–142 (2016).
- [19] Lin Z, Xiao Y, Yin Y, Hu W, Liu W, Yang H. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 10775–10782 (2014).
- [20] Sun J, Ge J, Liu W, Lan M, Zhang H, Wang P, Wang Y, Niu Z. Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale* 6, 255–262 (2014).
- [21] Wu Z, Li X, Li F, Yue H, He C, Xie F, Wang Z. Enantioselective transesterification of (R,S)-2-pentanol catalyzed by a new flower-like nanobioreactor. *RSC Adv.* 4, 33998–34002 (2014).
- [22] Zhang Y, Ge J, Liu Z. Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. *ACS Catal.* 5, 4503–4513 (2015).
- [23] Yin, Y.; Xiao, Y.; Lin, G.; Xiao, Q.; Lin, Z.; Cai, Z. An enzyme–inorganic hybrid nanoflower based immobilized enzyme reactor with enhanced enzymatic activity. *J. Mater. Chem. B* 3, 2295–2300 (2015).
- [24] Gulmez C, Altinkaynak C, Özdemir N, Atakisi O. Proteinase K hybrid nanoflowers (P-hNFs) as a novel nanobiocatalytic detergent additive. *Int. J. Biol. Macromol.* 119, 803–810 (2018).
- [25] Zhu L. *et al.* Rapid Detection of Phenol Using a Membrane Containing Laccase Nanoflowers. *Chem. – Asian J.* 8, 2358–2360 (2013).
- [26] Zeng J, Xia Y. Hybrid nanomaterials: Not just a pretty flower. *Nat. Nanotechnol.* 7, 415–416 (2012).
- [27] Lei Z, Gao C, Chen L, He Y, Ma W, Lin Z. Recent advances in biomolecule immobilization based on self-assembly: organic–inorganic hybrid nanoflowers and metal–organic frameworks as novel substrates. *J. Mater. Chem. B* 6, 1581–1594 (2018).
- [28] Wang R, Zhang Y, Lu D, Ge J, Liu Z, Zare RN. Functional protein–organic/inorganic hybrid nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* - Wiley Online Library. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wnan.1210>. (Accessed: 21st May 2019)