

**ŞAP AŞISI ÜRETİMİNDE KULLANILAN 146 S TESTİNE
ALTERNATİF KROMATOĞRAFİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD AS
AN ALTERNATIVE TO THE 146 S TEST USED IN FMD
VACCINE PRODUCTION**

ALİ DEMİRTAŞ

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

ALİ DEMİRTAŞ' in hazırladığı "Şap Aşısı Üretiminde Kullanılan 146 S Testine Alternatif Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehlika PULAT
Başkan



Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Üye (Danışman)



Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

40.107/2015


ALİ DEMİRTAŞ

ÖZET

ŞAP AŞISI ÜRETİMİNDE KULLANILAN 146-S TESTİNE ALTERNATİF KROMATOĞRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

ALİ DEMİRTAŞ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Temmuz 2015, 99 sayfa

Şap hastalığı, çift tırnaklı hayvanlarda görülen, ekonomik açıdan büyük bir öneme sahip olan viral ve çok bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalığın Türkiye gibi endemik olarak seyrettiği ülkelerde, coğrafi ve ekonomik koşullardan dolayı hastalıkla mücadelede koruyucu aşı uygulamalarının büyük önemi bulunmaktadır. Kullanılan aşılar 146 S partikülü olarak adlandırılan tam virüs partikülü konsantrasyonuna göre formüle edilmektedir. Etkin koruma sağlayan ve kazançlı bir aşı üretimi için uygun dozda formülasyon çok önemlidir. Yeterli miktarda antijen içermeyen aşılar hayvanlarda istenilen düzeyde koruma oluşturamamakta; ya da aşı içerisine daha fazla antijen konularak aşı maliyeti gereksiz yere artırılmaktadır. Standart sapması ve hata olasılığı düşük, güvenilirliği yüksek bir test yöntemi ile en uygun aşı formülasyonu gerçekleştirilebilir.

Bu çalışma ile Şap Enstitüsünde viral antijen miktarının tespiti amacıyla rutin olarak kullanılmakta olan 146 S testine alternatif olarak veya onunla birlikte kullanılacak kromatografik bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada iyon değişim kromatografisinin kullanımına yer verilmiş ve şap virüsünün izoelektrik pH değerine uygun olan ticari kolonlar kullanılmıştır. Kolon matriksi güçlü katyonik yapıya sahip, anyon değiştirici Q Sepharose XL

matriksidir. Aynı matrikse sahip HiPrep Q XL 16/10 ve HiTrap Q XL 5 mL kolonları ile FPLC (Fast protein liquid chromatography) cihazında metot belirleme çalışmaları yapılmış olup, sonraki deneylerde daha hızlı ve uygun sonuç veren HiTrap Q XL 5 mL kolonu kullanılmıştır. Elüent olarak 20 mM Tris-HCL + 1 M NaCl (pH 7,5) tamponu kullanılmıştır. UV dedektör dalga boyu 254 nm değerinde daha düzgün kromatogramlar elde edilmiştir. Deneylerde akış hızı 5 mL/dk seviyelerine kadar çıkartılmıştır. Başarılı bir şekilde ayrımı yapılan piklerden fraksiyonlar toplanmış ve RT-PCR, ELISA, CFT testleri yardımı ile kromatogramdaki 146 S antijenini içeren pik belirlenmiştir. Devam eden çalışmalarda nükleaz enzimi ile muamele edilmiş numuneler ile de çalışılmış olup konakçı hücre DNA'sının 146 S pikine bir etkisi olmadığı görülmüştür. Kromatogramdaki pikler Unicorn Manager 5.11 programı ile analiz edilmiş ve pik alanları hesaplanmıştır. Daha sonra hesaplanan 146 S piki alan değeri ile numunelerin 146 S değerleri grafiğe geçirilmiş ve regresyon analizi Microsoft Excel yardımı ile yapılmış olup, yüksek R^2 değerleri (0,97- 0,98) elde edilmiştir. Farklı derişimlerde numuneler ile deneyler yapılarak test yönteminin doğrusallığı değerlendirilmiş ve yapılan regresyon analizi sonucuna göre 0,97-0,99 R^2 değerleri elde edilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmanın neticesinde; iyon değişim kromatografisi yöntemi kullanılarak, FPLC cihazında, Q Sepharose XL kolonları ile şap virüsünün başarılı bir şekilde ayrımı yapılmıştır. Bu kapsamda geliştirilen test yönteminin Şap Enstitüsü'nde kullanılan 146 S testine alternatif olabilecek, tekrarlanabilir analiz sonuçlarının elde edilebileceği, kolay ve kısa sürede uygulanabilen geçerli bir test yöntemi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Şap Hastalığı, 146 S testi, İyon değişim kromatografisi, FPLC, Şap virüsü.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD AS AN ALTERNATIVE TO THE 146 S TEST USED IN FMD VACCINE PRODUCTION

ALİ DEMİRTAŞ

Master, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

July 2015, 99 pages

Foot and mouth disease (FMD), which is common among double-hoofed animals, is a viral and very contagious disease having a major importance in economic terms. Seen in countries as Turkey, where the disease is endemic, preventive vaccination is of great importance in the fight against the disease due to the geographical and economic conditions. Vaccinations used are formulated according to the whole virus particle concentration called 146 S. The formulation of vaccine production in proper dosage providing effective protection is very important as well as being lucrative. Vaccines which do not contain enough antigens are either unable to generate a sufficient amount of the desired level of protection on animals; or increase the cost unnecessarily by enabling the producer to put more antigen into vaccine. The optimal vaccine formulation whose standard deviation and the error probability is low, can be performed via high reliability testing method.

With the help of this study, it is tried to develop a chromatographic method for the purpose of being used as an alternative to or together with the 146 S test, which is used to determine the amount of viral antigen in the Foot and Mouth Disease Institute as a routine. For this purpose, the uses of ion exchange chromatography

studies were included. Commercial columns which are suitable for isoelectric pH of Foot and Mouth virus were used. A strong cationic matrix structure of the anion exchanger Q Sepharose XL was selected as column matrix. The same matrix with HiPrep Q XL 16/10 and HiTrap Q XL 5 mL column in FPLC (fast protein liquid chromatography) was used to determine the method which will be followed. By taking into account the results, the subsequent experiments were done with HiTrap Q XL 5 mL column which gives more fast and relevant results 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl (pH 7.5) buffer was selected as the eluent. More smooth chromatograms were obtained in the case of 254 nm UV detector wavelength. In the experiments, a flow rate was increased until the level 5 mL/min. Successfully-separated fractions of the peak were pooled and by means of RT-PCR, ELISA, and CFT tests the peak containing 146 S antigen was determined. Following studies were carried out in samples treated with nuclease enzyme with host cell DNA and it was shown to have no effect on the 146 S peak. Unicorn peaks in the chromatogram were analyzed by Manager 5.11 software, the areas of 146 S peaks were calculated. Then, the calculated peak areas was plotted versus 146 S values obtained from 146 S test and regression analysis was performed by using Microsoft Excel, subsequently high R^2 values (0,97-0,98) were obtained. Verification of the testing method was evaluated via the experiments with different concentrations of the samples and 0.97 to 0.99 R^2 values were obtained by regression analysis.

As a result of study performed; the successful separation of Foot and Mouth virus was realized in the FPLC device with Q Sepharose XL column by using ion exchange chromatography. In this context, it was concluded that the developed test method may be considered as an alternative to the 146 S test used at FMD Institute. It can be used as a valid test method which can be applied easily and quickly by giving reproducible results.

Keywords: Foot and mouth disease (FMD), 146 S test, Ion exchange chromatography, FPLC, Foot and Mouth virus (FMDV).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında tecrübesi ve bilgisiyle bana yön veren, desteğini, güler yüzünü ve özellikle de sabrını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU' na,

Biyomühendislik Bölümünde yüksek lisans eğitimi almamda desteği ve emeği bulunan, kendisini rahmetle andığım ve unutmayacağım Prof. Dr. Abdurrahman TANYOLAÇ' a

Çalışmamdaki deneylerimin büyük bir kısmını gerçekleştirdiğim Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarının olanaklarını esirgemeyen Prof. Dr. Adil DENİZLİ' ye

Tez çalışmam süresince Şap Enstitüsünün olanaklarının kullanılmasını sağlayan eski ve yeni Enstitü yönetim kadrosuna, çalışmamda kullandığım antijenlerin üretilmesinde emeği geçen tüm Şap Enstitüsü çalışanlarına,

Kimya Bölümü, Biyokimya Laboratuvarında FPLC cihazı ile yaptığım deneylerinde bana cihaz kullanımını öğreten, yardımlarını ve tecrübesini esirgemeyen .Doç.Dr. Nilay BERELİ' ye

Tez çalışma konusunun belirlenmesinde ve tez aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana destek veren Gencay ERGİN' e, çalışmada bulunan analitik testlerin yapılmasında ve değerlendirilmesinde yardımcı olan Dr. Ünal PARLAK, Dr. Can ÇOKÇALIŞKAN' a, çalışmanın başında yaptığım HPLC deneylerinde bana yardım eden Damla ÇETİN' e, deneylerde kullandığım tampon çözeltilerinin hazırlanmasında yardım eden Mustafa ÖZYİĞİT' e,

İsmini saymadığım ama yardımı ve emeği geçen diğer tüm hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışması süresince de moral desteği veren AİLEM'e,

ve

Yüksek lisans eğitimimi yapmam için bana cesaret ve azim veren, yüksek lisans eğitimi ve tez esnasında fedakarlığını hiç esirgemeyen, desteğini yürekten hissettiğim sevgili eşim Zeynep DEMİRTAŞ' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. TEMEL BİLGİLER	4
2.1. Şap Hastalığı	4
2.1.1. Şap virüsünün genel özellikleri	4
2.1.2. Şap hastalığının ekonomik önemi	7
2.1.3. Endüstriyel şap aşısı üretim prosesi	8
2.2. Şap Virüsünün Tayininde Kullanılan Test yöntemleri.....	10
2.2.1. Geleneksel yöntemler.....	10
2.2.2. Yeni nesil yöntemler.....	13
2.3. Kromatografi.....	15
2.3.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	16
2.3.2. İyon değişim kromatografisi.....	17
2.3.2.1. İyon değiştirici matrisler	21
2.4. Kromatografi Yönteminin Kullanıldığı Analiz Cihazları.....	23
2.4.1. HPLC cihazı ve kolonları.....	23
2.4.2. FPLC cihazı ve kolonları.....	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	34
3.1. Deneylerde Kullanılacak Virüs Antijeni Numunelerinin Hazırlanması.....	34
3.1.1. Şap virüsünün üretilmesi.....	34

3.1.2. Şap virüsünün inaktivasyonu.....	35
3.1.3. Virüs antijeninin deriştirme işleml.....	36
3.1.4. Antijenin polietilen glikol (PEG) ile saflaştırılması.....	37
3.2. HPLC ile Nucleosil C18 Kolonunda Yapılan Deneyler.....	37
3.3. FPLC Cihazında Q Sepharose XL Kolonları Yapılan Deneyler.....	40
3.3.1 Q Sepharose XL kolonları ile yapılan deney metodunun belirlenmesi çalışmaları.....	44
3.3.2. HiPrep Q XL 16/10 kolonu ile yapılan deneyler.....	45
3.3.2.1. O tipi antijen deneyleri.....	45
3.3.2.2. A tipi antijen deneyleri.....	45
3.3.3. HiTrap Q XL kolonu ile yapılan deneyler.....	46
3.3.3.1. O tipi antijen deneyleri.....	46
3.3.3.2. A tipi antijen deneyleri.....	46
3.3.4. Nükleaz enzimi ile muamele sonrası yapılan deneyler.....	47
3.3.5. Farklı antijen derişimlerinde yapılan deneyler.....	48
3.4. Uygulanan Analitik Yöntemler.....	49
3.4.1. 146 S partikül miktarının belirlenmesi	49
3.4.2. RT-PCR Testi.....	50
3.4.3. ELISA testi.....	51
3.4.4. Antijenik titrenin belirlenmesi (CFT).....	52
3.4.5. Toplam protein miktarının belirlenmesi.....	53
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI	58
4.1 Yöntem Seçim ve Nedeni.....	58
4.1.1. Seçilen yöntem için metot belirlenmesi	60
4.2. 146 S Antijeni Pikinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	65
4.2.1. PCR ve ELISA analizleri.....	65
4.2.2. Nükleaz enzimli deney analizleri.....	70
4.2.3. ELISA analiz sonuçlarının değerlendirilmesi.....	74
4.2.4. Sukroz Gradyent (146 S testi) analizleri.....	75

4.2.5. CFT analizleri	75
4.3. Tespit Edilen 146-S Pikinden Miktar Tayini	76
4.3.1. Kromatografi deney sonuçlarından 146-S piki alanın hesaplanması.....	76
4.3.2. Sukroz Gradient yöntemi sonuçları ile hesaplanan pik alanlarının regresyon analizi ile değerlendirilmesi.....	80
4.3.3. Pik alanından 146-S antijeni miktarı hesaplanması.....	83
4.4. Elde Edilen Yeni Kromatografik Test Yönteminin Doğrusallığının Değerlendirilmesi	84
4.4.1. Farklı antijen derişimlerinde yapılan deneylerin Regresyon analizi sonuçları.....	84
4.5. Elde Edilen Sonuçların Tartışılması.....	89
5. GENEL SONUÇLAR	92
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Şap virusu kapsit yapısı ve viral proteinlerinin şematik gösterimi	5
Şekil 2.2. Şap virusunun X ışını kristalografisi ile elde edilmiş yapısı	6
Şekil 2.3. VP1 kapsit proteininin integrin reseptörlerine bağlanması	6
Şekil 2.4. Şap aşısı üretim prosesi.....	9
Şekil 2.5. Kolon materyalinin dengelenmesi	19
Şekil 2.6. Örneğin yüklenmesi ve adsorsiyonu	19
Şekil 2.7. Moleküllerin elüsyonu	20
Şekil 2.8. Kolon materyalinin temizlenmesi ve rejenerasyonu.....	20
Şekil 2.9. İyon değiştirici matriks tipleri	22
Şekil 2.10. HPLC sistemini oluşturan ekipmanlar.....	25
Şekil 2.11. Değişik boyutlardaki HPLC kolon örnekleri.....	26
Şekil 2.12. FPLC sistemini oluşturan ekipmanlar.....	28
Şekil 2.13. FPLC kolon örnekleri (GE Healthcare).....	30
Şekil 2.10. Agaroz tipi jellerin (a) moleküler ve (b) jel yapısı.....	31
Şekil 2.11. Polistiren/divinil benzen polimerinden oluşturulmuş küresel matriksin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	32
Şekil 3.1. Çapraz akış filtrasyon sistemi ve filtre kaseti.....	37
Şekil 3.2. 1. Numune kromatogramı (A tipi, 146 S testi pikinden toplanmış)...	38
Şekil 3.3. 2.Numune kromatogramı (A tipi, (PEGA-11/08) 146 S değeri 35,3 µg/mL).....	39
Şekil 3.4. 3. Numune kromatogramı (O tipi, (PEGO-11/06) 146 S değeri 15,3 µg/mL).....	39
Şekil 3.5. Deneylerde kullanılan FPLC cihazı (AKTAFPLC, GE Healthcare)...	41
Şekil 3.6. Deneylerde kullanılan HiPrep Q XL 16/10 kolonu (GE Healthcare)..	42
Şekil 3.7. Deneylerde kullanılan HiTrap Q XL 5 mL kolonu (GE Healthcare)...	43
Şekil 3.8. 146 S tayini absorbans grafiği örneği.....	50
Şekil 4.1. Şap virusu kapsit yapısı ve viral proteinlerinin şematik gösterimi.....	59
Şekil 4.2. HiTrap Q XL kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B Tamponu: 1 M NaCl , lineer gradient, 280 nm dalga boyu).....	61

Şekil 4.3. HiTrap Q XL kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B tamponu: 0,5 M NaCl, lineer gradient, 280 nm dalga boyu).....	62
Şekil 4.4. HiTrap Q XL kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B tamponu: 1 M NaCl, basamaklı gradient, 254 nm dalga boyu).....	62
Şekil 4.5. HiPrep Q XL 16/10 kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B Tamponu: 1 M NaCl, lineer gradient, 254 nm dalga boyu).....	63
Şekil 4.6. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4047 kodlu deney sonucu (iki basamaklı gradient elüsyon 2. pik çatallanmış).....	64
Şekil 4.7. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 8003 kodlu deney sonucu (üç basamaklı gradient elüsyon, pikler ayrılmış). Akış hızı 5 mL/dk).....	65
Şekil 4.8. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4004 kodlu deney sonucu.....	68
Şekil 4.9. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4008 kodlu deney sonucu.....	69
Şekil 4.10. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4009 kodlu deney sonucu.....	70
Şekil 4.11. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4031 kodlu deney sonucu.....	71
Şekil 4.12. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4037 kodlu deney sonucu.....	71
Şekil 4.13. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4039 kodlu deney sonucu.....	72
Şekil 4.14. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 7003 kodlu deney sonucu (3 basamaklı gradient elüsyon metodu).....	73
Şekil 4.15. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 9001 kodlu deney sonucu (3 basamaklı gradient elüsyon, 0,5 mL enjeksiyon).....	74
Şekil 4.16. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 8041 kodlu deney sonucu.....	76
Şekil 4.17. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4005 kodlu deney sonucu.....	77
Şekil 4.18. O tipi antijen için 3. pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.....	81
Şekil 4.19. A tipi antijen için 3. Pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.....	82
Şekil 4.20. A tipi antijen farklı derişimler için 3. pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.....	85
Şekil 4.21. O tipi antijen farklı derişimler için 3. Pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.....	86
Şekil 4.22. O tipi farklı seri antijen (PEGO-13/06) farklı derişimler için 3. Pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.....	87
Şekil 4.23. O tipi farklı seri antijen (SOV24) farklı derişimler için 3. Pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. İyon-değiştirici matriks örnekleri.....	23
Çizelge 3.1. Yapılan deneylerde kullanılan antijen ve değerleri	48
Çizelge 3.2. Çalışmada yapılan 1. aşama deneyler listesi.....	54
Çizelge 3.3. Çalışmada yapılan 2. aşama deneyler listesi	56
Çizelge 4.1. Şap virüsü yapısal proteinlerinin fiziko-kimyasal özellikleri	59
Çizelge 4.2. RT-PCR ve ELISA sonuçları	67
Çizelge 4.3. Şekil 4.15' de gösterilen kromatogramın pik analiz çıktıları	76
Çizelge 4.4. Şekil 4.16' da gösterilen kromatogramın pik analiz çıktıları.....	77
Çizelge 4.5. İki basamaklı gradient metodu deneyleri pik alanları.....	78
Çizelge 4.6. Üç basamaklı gradient metodu deneyleri pik alanları	79
Çizelge 4.7. O tipi antijen numunesi deneyleri grafik verileri.....	80
Çizelge 4.8. A tipi antijen numunesi deneyleri grafik verileri.....	82
Çizelge 4.9. O tipi antijen için hesaplanan 146 S değerleri.....	83
Çizelge 4.10. A tipi antijen için hesaplanan 146 S değerleri.....	83
Çizelge 4.11. A tipi antijen numunesi farklı derişim deneyleri grafik verileri....	85
Çizelge 4.12. O tipi antijen numunesi farklı derişim deneyleri grafik verileri...	86
Çizelge 4.13. O tipi farklı seri antijen numunesi farklı derişim deneyleri grafik verileri.....	87
Çizelge 4.14. O tipi farklı konsantre antijen numunesi farklı derişim deneyleri grafik verileri.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

nm	:	Nanometre
kDa	:	Kilodalton
µg	:	Mikrogram
Da	:	Dalton
α _v β ₃	:	İntegrin reseptör
mM	:	mmol/L
dk	:	dakika
µm	:	mikrometre
Pa	:	Pascal
µ	:	mikron
MPa	:	mega pascal
µS/cm	:	mikrosiemens (iletkenlik)
U	:	Ünite (Unit)
pmol	:	Pikomol
Ct	:	Threshold cycle (ısı döngüsü)
mAU	:	mili amper unit

Kısaltmalar

146 S	:	Şap virüsü tam partikülü
VP1-4	:	Viral protein 1-4
RNA	:	Ribonükleik asit
UV	:	Ultraviyole
HIC	:	Hydrophobic Interaction Chromatography
RPC	:	Reversed Phase Chromatography
FPLC	:	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
RT-PCR	:	Revers Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA	:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

CFT	:	Komplement fiksasyon testi (Complement fixation test)
P1-3	:	Polipeptit 1-3
RGD	:	Arjinin-glisin-aspartik asit (Arg-Gly-Asp)
BHK	:	Baby Hamster Kidney
CPE	:	Sitopatik etki (Cytopathic effect)
FMDV	:	Foot and Mouth Disease Virus (Şap Virüsü)
OIE	:	Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (Office International des Épizooties)
BEI	:	Binary ethylene imine
PFU	:	Plak oluşturan birim (Plaque-forming unit)
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskobu
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
DLS	:	Analitik Ultrasantrifüj ve Dinamik Işık Saçılımı
TLC	:	Thin Layer Chromatography
GC	:	Gas Chromatography
IEC	:	Ion Exchange Chromatography
SEC	:	Size Exclusion Chromatography
BSL	:	Bio Safety Level
VKL	:	Virüs Kültürü Laboratuvarı
HKL	:	Hücre Kültürü Laboratuvarı
MOI	:	Multiplicity of infection
ET	:	Enfektif Titre
PEG	:	Polietilen Glikol
DEPC	:	Deethylpyrocarbonate
OD	:	Optik yoğunluk
BCA	:	Bicinchoninic acid
BSA	:	Bovine Serum Albumin
PK	:	Pozitif kontrol
NK	:	Negatif Kontrol
NEG	:	Negatif

1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Şap hastalığı ülkeler arası canlı hayvan ve hayvansal ürün ticaretini olumsuz yönde etkileyen, büyük ekonomik kayıplara neden olan, çift tırnaklı hayvanlarda görülen akut ve çok bulaşıcı, viral bir hastalıktır. Hastalığın etkeni *Picornaviridia* ailesinden *Aphthoviruslar* grubuna dahil zarsız bir virüs olup tek zincirli RNA taşır. Şap virüsünün O, A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 ve Asia 1 olmak üzere 7 adet farklı serotipi bulunmakta olup, serotipler arasında çapraz koruma mümkün değildir. Her serotipin çok sayıda alt tipleri vardır. Virüs, 8.500 nükleotide sahip, zarf taşımayan, kübik simetrik ve yaklaşık 30 nm büyüklüğünde viral RNA'yı çevreleyen bir kapsite sahiptir [1]. Kapsit, glikoprotein yapısında olup VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak isimlendirilen 4 büyük proteininin 60 kopyasından oluşmaktadır [2]. Viral RNA ile onu çevreleyen kapsit yapısının molekül ağırlığı 8.000 kDa olup, virüsün sedimentasyon hızından dolayı 146 S partikülü olarak isimlendirilmektedir.

Hastalıkla mücadelede ülkelerin coğrafi ve sosyo-ekonomik durumlarına göre çeşitli kontrol stratejileri geliştirilmiştir. Hastalığın endemik olarak görüldüğü ülkemizde coğrafi ve ekonomik koşullardan dolayı eradikasyonu mümkün olmamaktadır. Hastalığın kontrolü için koruyucu aşılama stratejisi uygulanmaktadır. Günümüzde Şap aşısı antijeni çoğunlukla süspanse BHK-21 hücrelerinden üretilir. Üretilen aşı virüsü filtrasyon teknikleri kullanılarak steril bir şekilde inaktivasyona alınır. İnaktif antijenler ultrafiltrasyon metodu ile konsantre edildikten sonra bir dizi saflaştırma işlemine tabi tutulup formüle edilinceye kadar +4°C'de depolanırlar. Depolanmış olan antijenler, adjuvan madde ile formüle edilirler ve son ürün olarak aşı şişelerine taksim edilerek piyasaya sürülürler [3].

Aşı hazırlama aşamasında antijen-adjuvan formülasyonu çok önemlidir. Uygun dozda formülasyon için karışıma giren antijen sıvısının içerdiği antijen miktarının doğru bilinmesi gerekir. Aksi halde yeterli miktarda antijen içermeyen aşılar hayvanlarda istenilen düzeyde koruma oluşturmaz. Bu durumun tersi olarak aşı formülasyonu içerisine fazla antijen konulması durumunda ise maliyetler gereksiz yere artar, verim düşer. Sonuç olarak antijen miktarının tayini kritik bir parametredir. Virüsler için miktar tayini yapmak, hücre ve bakterilere nazaran daha zordur. Bu nedenle miktar tespiti için genellikle bazı dolaylı virolojik testler (plak test, komplement fiksasyon testi, hemaglutinasyon inhibisyon testi vb.)

kullanılmaktadır. Ancak bu testlerde genel olarak virüs miktarından değil, seçilen aktivite için belirlenen virüs titresinden söz edilir. Bununla birlikte araştırma-analiz çalışmalarında ultrasantrifüj metodu da miktar tespiti için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Dünyada ve ülkemizde Şap virüsü 146 S partikül miktarının belirlenmesi amacıyla sukroz yoğunluk gradient santrifügasyon yöntemi ve sürekli akış UV spektrofotometrenin bir arada kullanıldığı bir test (146 S testi) başarıyla uygulanmaktadır. Aslında bir saflaştırma metodu olan bu testte, proteinler ultrasantrifüje tabi tutularak molekül ağırlıklarına göre kendi yoğunluğuyla aynı değerdeki sukroz çözeltisi içerisinde tabakalar halinde ayrışırlar. Numune içerisindeki 146 S miktarı µg/mL cinsinden ifade edilir. 146 S testi yüksek hassasiyette olmakla birlikte, standart sapmasının yüksek olması, manipülasyon sırasında tecrübeye dayalı iş gücü gerektirmesi ve otomasyon sisteminin olmayışı gibi dezavantajlara sahiptir. Bu durum büyük aşı üreticileri için doğrudan ekonomik kayıp anlamına gelmektedir. Bu nedenle araştırmacılar virüs miktarının tespiti amacıyla daha spesifik ve hassas sonuçlar veren, standart sapması düşük, kolay uygulanabilir ve operatör değişiminden etkilenmeyen yeni bir yöntem geliştirmek için yoğun çaba göstermektedirler [4]. Spitteler ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada jel filtrasyon (Size Exclusion Chromatography) kromatografisi kullanılmıştır [4].

Kromatografi, ayrılacak olan bileşenlerin iki faz arasında dağıldığı fiziksel ve/veya kimyasal bir ayırma metodudur. Bu fazlardan bir tanesi geniş yüzey alanlı sabit bir yatak (durgun faz), diğeri ise sabit yatak boyunca değişik hızlarda hareket eden (hareketli faz) bir gaz veya sıvıdır. Kromatografide kullanılan yöntemler ise biyomoleküllerin farklı özelliklerinden yararlanmaya yönelik olarak seçilir. Örneğin, biyomoleküllerin saflaştırılmasında moleküllerin büyüklüklerinden (jel filtrasyon), hidrofobisitelerinden (HIC veya RPC), moleküllerin net elektriksel yüklerinden (iyon değişim kromatografisi) veya biyolojik aktivitelerinden (affinite kromatografisi) yararlanılabilir [5].

Sunulan tez çalışması kapsamında, Şap Enstitüsünde viral antijen miktarının tespiti amacıyla rutin olarak kullanılmakta olan 146 S testine alternatif olacak veya onunla birlikte kullanılabilecek kromatografik bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Spitteler ve arkadaşları [4] tarafından yapılan çalışma temel alınmış,

ancak farklı bir kromatografik yöntemin (iyon değişim kromatografisi) araştırılması öngörölmüştür.

İyon değişim kromatografisi ile proteinler iyonik yüklerine göre birbirinden ayrılırlar. Ayrılmanın temeli, çözelti içerisinde bulunan yüklü moleküller ile kolon matriksine kovalent olarak bağlı bulunan zıt yüklü moleküller arasında, geri dönüşümlü bir adsorbsiyonun oluşmasına dayanır. Bu nedenle, iyon değişim kromatografisinin temeli, zıt yüklü partiküller arasındaki çekime dayanmaktadır [5]. İyon değişim kromatografisi oldukça geniş bir uygulama alanına sahip, yüksek çözünürlüklü, yüksek kapasiteli ve uygulaması basit bir yöntemdir. Bunların yanı sıra, yöntemin kontrol edilebilir olması da başarılı bir şekilde uygulanmasının temel nedenlerindedir.

Gerçekleştirilecek çalışmanın neticesinde; Şap Enstitüsünde yapılan 146 S testinde karşılaşılan problemlerin büyük ölçüde aşılacağı, yani tekrarlanabilir analiz sonuçlarının elde edilebileceği, uygulama hatalarına izin vermeyen, standart sapması düşük, kolay ve kısa sürede uygulanabilen kromatografik bir yöntem geliştirilmesi öngörölmüştür. Ayrıca geliştirilecek yöntemin halihazırda Şap Enstitüsü antijen saflaştırma prosesinde bulunmayan ve bu prosese son aşama olarak eklenmesi düşünülen kromatografik yöntem için örnek teşkil edeceği düşünülmüştür.

Yapılan çalışmada Şap Enstitüsü üretim prosesinden alınmış inaktif antijenler kullanılmıştır. Şap virüsünün fiziko-kimyasal yapısının araştırılmasından sonra uygun olan iyon değişim kolonları satın alınmıştır. Q Sepharose XL katyonik kolon materyaline sahip anyon değiştirici kolonlar ile ayırım metodu geliştirilmiştir. Tüm çalışmalar FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Numunelerdeki proteinlerin ayırımından sonra RT-PCR (Revers Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), CFT (Complement fixation test) testleri yardımı ile elde edilen kromatogramlardaki 146 S antijeni piki tespit edilmiştir. Daha sonra 146 S pik alanlarından hesaplanan değerler, Şap Enstitüsünde yapılan 146 S test sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

Bu bölümde yapılan çalışma ile ilgili literatür bilgilerine yer verilmiştir. Bu kapsamda ilk olarak şap hastalığı, şap virüsü ve şap aşısı üretim prosesi hakkında bilgiler sunulmuştur. Daha sonra şap virüsü miktar tayininde kullanılan test yöntemleri ile ilgili açıklamalar yapılmış, devamında çalışmanın temelini oluşturan kromatografik teknikler hakkında bilgi verilmiştir. Son olarak da kromatografi yöntemi ile analiz veya ayırım yapan, HPLC ve çalışmanın büyük kısmında kullanılan FPLC cihazları ve kolonları ile ilgili açıklamalar yapılmıştır.

2.1. Şap Hastalığı

Şap hastalığı, Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE, Office International des Epizooties) salgın hayvan hastalıkları listesinde bulunan ve uluslararası hayvan ve hayvansal ürün ticaretinde en önemli kısıtlama nedeni olarak kabul edilen bir hastalıktır [6].

Şap hastalığı, sığır, koyun, keçi, domuz gibi çiftlik hayvanlarının yanı sıra 70 kadar yabani hayvan türünde de görülen oldukça bulaşıcı viral bir hastalıktır. Hastalık, yüksek ateş ve topallık ile karakterize olup özellikle dil, damak, meme ve koroner bölgelerde vezikül oluşumu gözlenmektedir [7].

Şap hastalığının, süt ve et veriminde azalma, genç hayvanlarda yüksek mortalite, yavru atma nedeni ile üretkenlikte düşüş, kronik enfekte ve verimsiz hayvanların itlafı gibi olumsuz etkileri mevcuttur. Ayrıca üretici gelirlerinde azalma gibi yerel etkilerinin yanında iç pazarda hayvansal ürünlerin azalmasına bağlı olarak fiyat artışı ve eşdeğer ürün temini ihtiyacının ortaya çıkışı, ambargo nedeni ile ihracat kaybı, eradikasyon politikası nedeni ile itlaftan doğan dolaylı masraflar gibi ulusal düzeyde ekonomik etkileri de bulunmaktadır [8]. Virüsün yayılma hızı ve virüsün antijenik kimliğini değiştirebilme kabiliyeti ülkelerin et ve süt endüstrileri için endişe verici durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır [9].

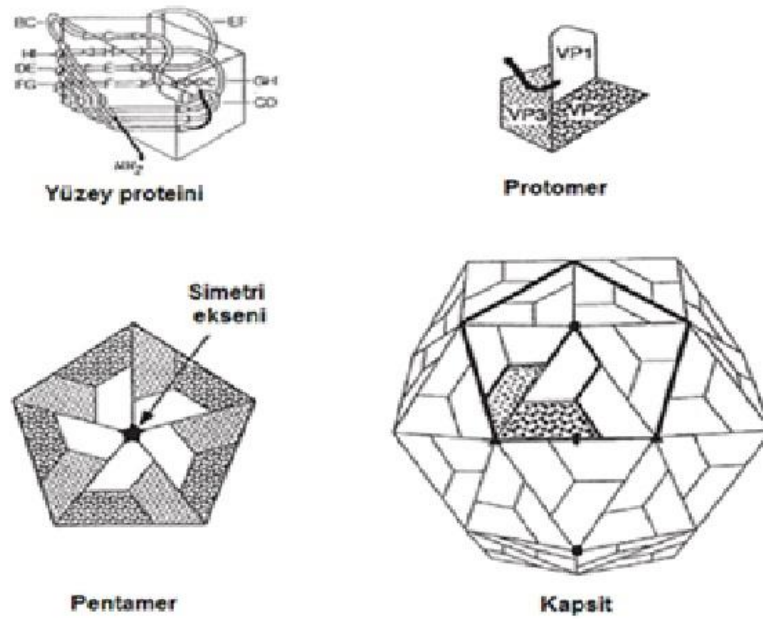
2.1.1. Şap virüsünün genel özellikleri

Şap hastalığının etkeni *picornaviridae* familyasının *aftovirus* cinsinde yer alan "Foot and Mouth Disease Virus" (FMDV)'dir. Etken, pozitif polariteli, tek iplikçikli ve

8.500 nükleotide sahip bir RNA virüsü olup zarf içermeyen kübik simetrik ve yaklaşık 30 nm büyüklüğünde viral RNA'yı çevreleyen bir kapsite sahiptir [10].

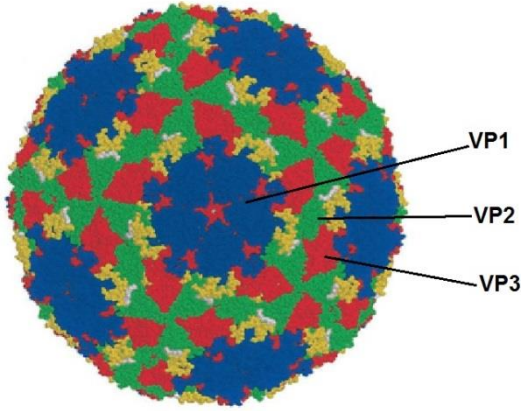
Şap virüsü genomu, yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlayan tek bir polipeptitten oluşmuştur. Bu polipeptit 3 parçadan meydana gelmiştir. Bunlardan P1 bölgesi yapısal (kapsit) proteinlerin sentezinde, P2 ve P3 bölgeleri ise replikasyonda görevli proteinlerin sentezinde rol oynarlar. Kapsit, glikoprotein yapısında olup VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak isimlendirilen 4 büyük proteininin 60 kopyasından oluşmaktadır. Replikasyon sırasında VP2 ve VP4 proteinleri VP0 adı verilen proteinin otokatalitik yolla ayrışmasıyla meydana gelir. VP1, VP2 ve VP3 her biri yaklaşık olarak 24.000 Da molekül ağırlığına sahip olup kapsitin dış yüzeyinde yer alırken VP4 ise 8.000 Da ağırlığında olup kapsitin iç yüzeyinde yer alır [2].

Konak hücrede viral protein sentezi sırasında VP0, VP1 ve VP3 viral proteinleri asimetric olarak bir araya gelerek protomerleri, bu protomerlerin 5 tanesi bir araya gelerek ise pentamer adı verilen yapıyı oluştururlar. 12 pentamer de bir araya gelerek yeni sentezlenen RNA molekülü ile birleşir ve tam virüs partikülünü oluştururlar [11]. Şekil 2.1.'de şap virüsü kapsit yapısı ve viral proteinlerinin şematik gösterimi sunulmuştur.



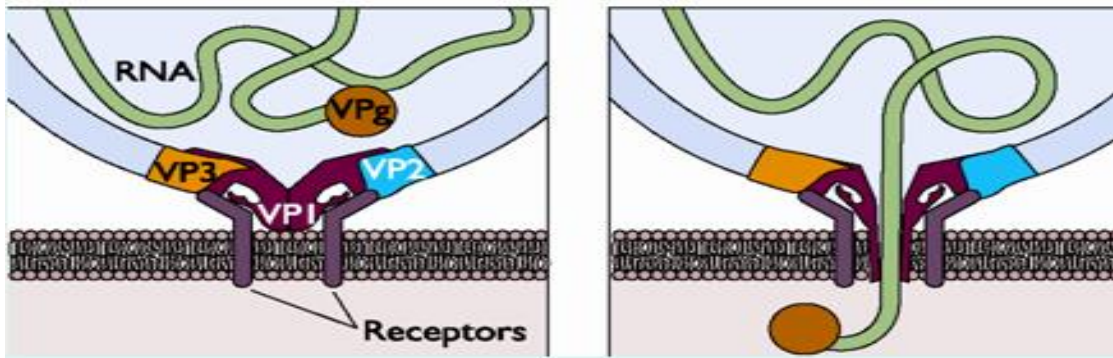
Şekil 2.1. Şap virüsü kapsit yapısı ve viral proteinlerinin şematik gösterimi [12].

VP1 proteini 140-160 residüleri arasında yer alan "Site A" veya "GH loop"u olarak bilinen bir bölge taşımaktadır. Bu bölge antijenik olarak oldukça değişken özellikte olup konak organizmada nötralizan antikörlerin oluşumunda, dolayısıyla immunolojik yanıtın şekillenmesinde rol oynar. Ayrıca bu bölgede bulunan oldukça esnek Arg-Gly-Asp (RGD) bölgesi ile virüslerin konak hücrelere adsorbsiyonu ve penetrasyonunda rol oynar. O1 BFS tipi şap virüsünün X ışını kristalografisi ile elde edilmiş yapısı Şekil 2.2.'de görülmektedir [2].



Şekil 2.2. Şap virüsünün X ışını kristalografisi ile elde edilmiş yapısı.

Şap virusu sahip olduğu RGD dizisi ile konak hücre yüzeyinde bulunan $\alpha_v\beta_3$ integrin reseptörleri vasıtasıyla bağlantı kurarak hücreye tutunmaktadır. Bu proteinin tahribi virüsün enfektivitesinde önemli ölçüde azalmaya neden olmaktadır [13]. Şekil 2.3.'te VP1 kapsit proteini ile integrin reseptörünün etkileşimi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3. VP1 kapsit proteininin integrin reseptörlerine bağlanması.

Virus replikasyonu konak hücrenin sitoplazması içerisinde meydana gelir. Diğer *Picornaviruslar* gibi etkenin virulansına bağlı olarak 4–6 saat gibi kısa inkübasyon

periyodundan sonra yeni virionlar şekillenmeye başlar. Virus replikasyonu sonucunda konak hücrelerde “cytopathic effect (CPE)” olarak isimlendirilen bir dizi patolojik değişimler meydana gelir. Bu değişimler, hücrelerin küreselleşmesi, hücre membranında dejenerasyonlar ve son olarak hücrenin erimesi (lisis) ile sonuçlanan biyokimyasal olaylardır [14].

Picornaviruslarla yapılan çalışmalarda her bir inkübasyon periyodundan sonra her bir hücreden yaklaşık olarak 50.000 yeni viral partikülün sentezlendiği ve viral genomdaki letal mutasyonlardan dolayı bunların ancak %0,1-2'sinin infektif özellikte olduğu bildirilmiştir [1].

Şap virusu, virüsün sedimentasyon hızı ve özelliklerine göre belirlenmiş 4 adet antijenik bileşenden oluşmaktadır. Bunlar;

- 146 S partikülü: RNA ile onu çevreleyen kapsit proteinlerinin her birinin 60 kopyasından oluşan ve molekül ağırlığı 8.000 kDa olan tam virion,
- 75 S partikülü: Boş kapsit proteini olarak bilinen VP0, VP1 ve VP3 proteinlerinin 60 kopyasından oluşur,
- 12 S partikülü: VP1-3 proteinlerinin oluşturduğu pentamerik yapı,
- 3,8 S partikülü: Molekül ağırlığı 56 kDa olan RNA polimeraz'dır [15].

Şap virüsünün antijenik yapıları birbirlerinden farklı olan ve birbirlerine karşı çapraz koruma göstermeyen 7 ayrı serotipi mevcuttur. Bunlar O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 ve ASIA-1'dir. Ayrıca her bir serotip kendi içerisinde antijenik varyasyon gösteren alt tiplerden oluşmaktadır [16].

2.1.2. Şap hastalığının ekonomik önemi

Şap hastalığı Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE)'nin A grubu listesinde yer almaktadır. Bu nedenle canlı hayvan ve hayvansal ürünler ile ilgili uluslararası ticarete en önemli kısıtlayıcı hastalık sınıfını oluşturmaktadır [17].

Hastalığın lokal ve uluslararası boyutta önemli etkileri aşağıda belirtilmiştir:

Lokal boyutta;

- Süt endüstrisinde %25'e varan verim kayıpları,

- Besi hayvanlarının büyüme hızında %10–20 oranında azalma,
- Sığır ve bufalolarda enfeksiyonu izleyen ilk bir ay içerisinde %60–70 oranında geçici iş gücü kayıpları,
- Üreme veriminde %10'lara varan kayıplar,
- Genç hayvanlarda (özellikle kuzu ve domuz yavrularında) yüksek mortalite,
- Kronik enfekte hayvanların verim kayıpları,
- Çiftliklerde sürü geliştirme programlarının uygulanamaması,

Uluslararası boyutta;

- Besi hayvancılığının zarar görmesi ve iç pazarın isteklerini karşılayamaması sonucu alternatif ürünlerin fiyat artışları ve ithalat giderleri,
- Uluslararası ticarete uygulanan ambargolar nedeniyle meydana gelen ihracat kayıpları [8].

2.1.3. Endüstriyel şap aşısı üretim prosesi

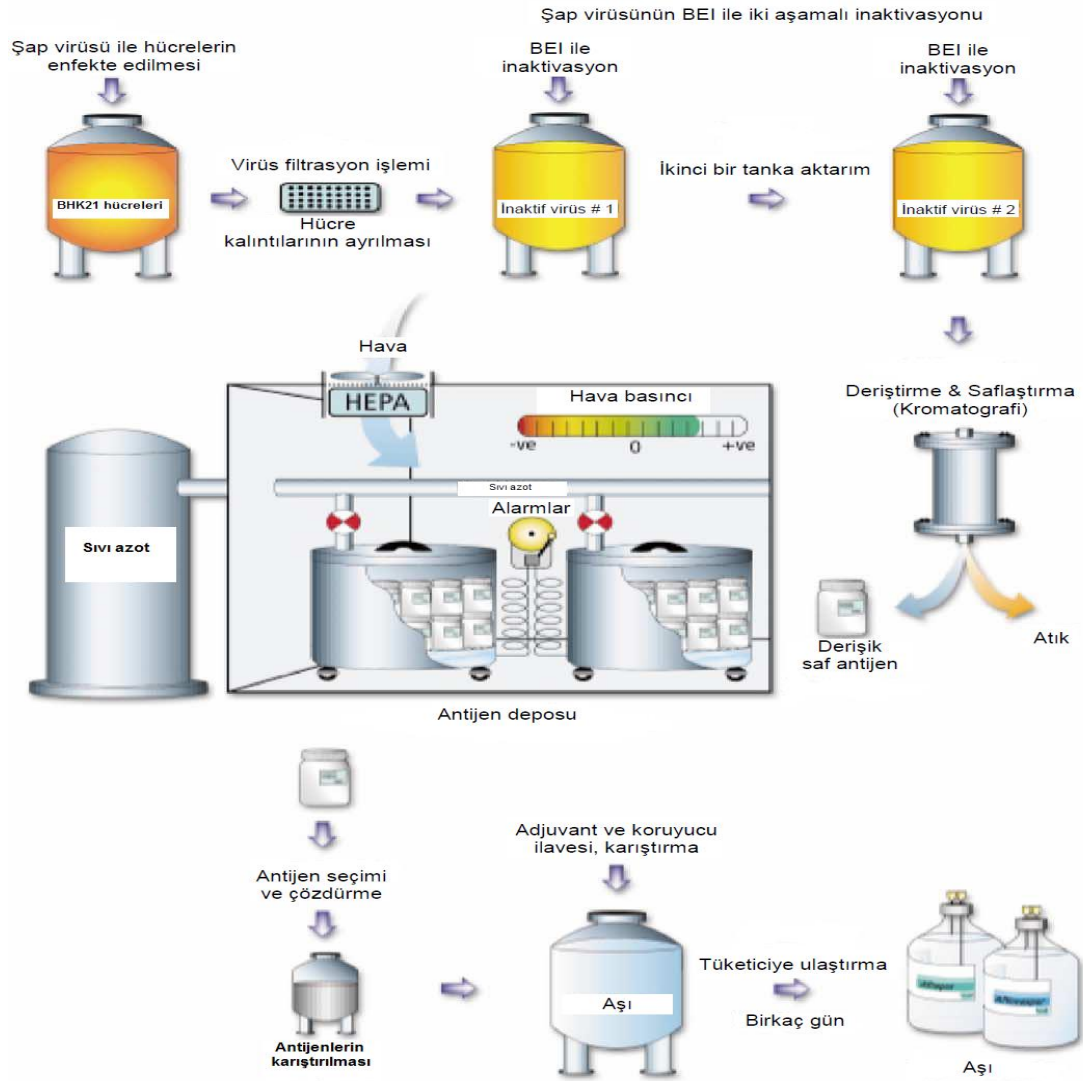
Endüstriyel şap virüsü üretimi, tüm dünyada çoğunlukla büyük hacim süspanse hücre kültürü ile yapılmaktadır. Monolayer hücre kültürü sistemleri, genellikle küçük hacim üretimler için kullanılmaktadır. Hücre kültürlerinde BHK–21 C/13 hücreleri yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Büyük hacimde şap virusu üretimi için -196°C'de sıvı azot içerisinde saklanan tohum hücrelerin birkaç pasaj monolayer olarak çoğaltılmasının ardından bu hücrelerin süspanse kültürlerine adaptasyonları sağlanır. Süspanse ortama adapte edilen bu hücreler bazı ölçek büyütme teknikleri kullanılarak yaklaşık 3.000 L hacime ulaşabilen biyoreaktörlerde çoğaltılırlar. Virus kültürü üretimi için, büyük hacimlerde üretilmiş hücre kültürü, besiyeri ortamından gelen bazı virus inhibitörleri ve serumun uzaklaştırılması amacıyla santrifüj edilir [18].

Santrifüj edilen hücreler, serum içermeyen virus üretme besiyerinde son hacimde yaklaşık 2×10^6 hücre/mL olacak şekilde seyreltikten sonra tohum virus ile 1 pfu (plaque-forming unit)/100 hücre olacak şekilde enfekte edilirler. Aşı virus üretimi 37°C'de gerçekleştirilir ve inkübasyon sırasında alınan numunelerde hücrelerin CPE oluşumundan kaynaklanan ölümleri ve yıkımlarının gözlemlenmesi ile birlikte inkübasyon sonlandırılır [18].

Üretilen aşı virüsü filtrasyon teknikleri kullanılarak steril bir şekilde inaktivasyona alınır. İnaktivasyonda uzun yıllar formaldehit kullanılmasına rağmen bugün hemen hemen tüm dünyada aziridin grubu bir ajan olan BEI (binary ethylene imine) kullanılmaktadır. Bu aşamada sıcaklık, pH ve BEI kombinasyonu ile virüsün yaklaşık olarak 48 saatte inaktivasyonu sağlanmaktadır. İnaktif hale gelmiş virüsler “antijen” olarak isimlendirilir. Bu inaktif antijenler ultrafiltrasyon metodu ile konsantre edildikten sonra bir dizi saflaştırma işlemine tabi tutulup formüle edilinceye kadar 4°C’de depolanırlar [18].

Depolanmış olan bu saf antijenlerin istek üzerine monovalan, bivalan veya trivalan olarak karışımları hazırlanarak adjuvan madde ile formüle edilirler ve son ürün olarak aşı şişelerine taksim edilerek piyasaya sürülürler [3]. (Şekil 2.4.)



2.2. Şap Virüsünün Tayininde Kullanılan Test Yöntemleri

Şap virüsü ile enfeksiyonlarının doğru tanısı gerek şap hastalığının kontrol ve eradikasyonu için endemik bölgelerde, gerekse itlaf (stamping out) politikasının uygulandığı şap hastalığından ari bölgelerde büyük önem taşır [19]. Şap virüsünün tayininde kullanılan test yöntemlerini iki grupta değerlendirmek doğru olabilir. Bunlar 1930' lu yıllardan başlayan "geleneksel yöntemler" ve günümüz teknolojisi imkanlarında olan "yeni nesil yöntemler" olarak aşağıda incelenmiştir.

2.2.1. Geleneksel yöntemler

Virüs tanısında kullanılan belli başlı geleneksel yöntemler aşağıda açıklanmıştır.

Komplement Fiksasyon Testi (CFT) : Bu teknik ilk defa 1929 yılında, Ciuca tarafından kobay kökenli antiserum ve şap virüsünün tiplendirilmesinde kullanılmıştır [16]. Daha sonraları sığır kökenli virüs, kobay antiserumu kullanılan CFT ile başarı ile tiplendirilebilmiştir [20]. CFT o zamandan beri şap virüsü tiplerini ayırt etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Takip eden yıllarda tüpler yerine 96 gözlü test kaplarının kullanıldığı mikro-CFT testi geliştirilmiştir [21]. 1964-1965 yıllarında şap virüsünün tiplendirilmesinde CFT, kobaylarda çapraz koruma testinin yerini almıştır. Daha sonra bu amaç için mikro-CFT testi adapte edilerek kullanılmaya başlanmıştır. CFT hızlı bir yöntem olmasına rağmen, test için yüksek miktarda virüs gerekir ve yöntem, test numunesinden kaynaklı antikomplementer aktivitelerden etkilenebilmektedir [22].

Virüs izolasyonu : Sığır, koyun ve domuz orijinli primer hücre kültürlerinde şap virüsünün duyarlılıkları gösterilmiştir. Bununla birlikte şap virüsü izolasyonu için en duyarlı hücre kültürü sistemi primer sığır tiroid hücreleridir fakat bu hücrelerin saklanma esnasında dondurulup çözülmesi ve tripsinle muamelesi sonucu duyarlılıkları kaybolmaktadır [23].

Revenson ve Segura büyük ölçekte şap virüsü antijeni üretimi için BHK hücre kültürlerinin uygun olduğunu bildirmiştir [24]. Monolayer BHK hücre kültürleri süspanse kültürlerle göre daha iyi bir büyüme sağlamaktadır. BHK-21 klon 13 hücre hattında şap virüsünün seri pasajları ile titresinde önemli artış sağlanmıştır [25]. IBRS-2 ve MVPK hücrelerinin aşı üretiminde BHK-21 kadar avantajlı olmadığı

bildirilmiştir [26]. Mishra ve ark., BHK-21 hücreleri klon 13 hücresi ile 3-7 seri pasajıyla saha şap virüslerini adapte ettiklerini bildirmiştir [27].

Şap virüsü saha izolatları BHK-21 hücreleri klon 13 hücre kültürlerinde de pasajlanabilir. Karakteristik sitopatolojik etki (CPE) ile çoğalan virüsler 3-5 pasajla adapte edilebilir [28]. CPE 48 saat içerisinde görülebilir. Eğer bu süre içerisinde CPE görülmemişse hücre dondurulup çözülürken tekrar yeni bir hücre flaskına pasajlanır ve 48 saat süreyle tekrar gözlemlenir. Virüs izolasyonuna alternatif olarak virüs miktarını belirleyebilen plak test kullanılabilir [29]. Bununla birlikte hücre kültürü sistemlerinin kullanımı zor ve zaman alıcıdır. El becerisi ve biyogüvenlik koşullarını sağlayan laboratuvar gerektirir.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : ELISA birçok bulaşıcı hastalık için en çok kabul gören serolojik tekniklerden biri olarak 1975 yılından bu yana kullanılmaktadır. Şap virüsü antikorlarının taranması amacı ile ilk defa Abu Elzeinbu ve Crowther tarafından kullanılmıştır [30]. Daha sonra yakalayıcı sistem olarak şap hastalığı geçirerek iyileşmiş sığır serum immunglobulini, belirtici sistem olarak anti-146S guinea pig serumu kullanılan bir sandviç ELISA, tiplendirme ve şap virüsü miktarının ölçümünde kullanılmıştır [31]. Yakalayıcı sistem olarak iyileşmiş sığır serum immunglobulini yerine tavşan anti-146S immunglobulinlerinin kullanılmasıyla sandviç ELISA'nın duyarlılığı artmıştır [32].

ELISA ve çeşitli modifikasyonları teşhis, tiplendirme ve alt tip ayırımı amacıyla kullanılmıştır. ELISA, CFT testinden daha duyarlı olmakla birlikte Mikro Nötralizasyon Testi (MNT) ile benzer duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir [30, 33]. Şap hastalığı referans laboratuvarı (FAO/WRLFMD) şap virüsü antijenlerinin tespiti ve tiplendirilmesi amacıyla ELISA testini tercih edilen bir yöntem olarak önermektedir [22]. Bu testle numunenin laboratuvara gelmesinden sonraki 3-4 saat içerisinde sonuç alınabilmektedir. Negatif bulunan örnekler hücre kültürü inokulasyonundan sonra tekrar ELISA ile test edilir. ELISA testi Komplement Fiksasyon testine göre daha duyarlı olmakla birlikte çok sayıda örnekte negatif sonuç verdiği için hücre kültürü inokulasyonuna sıklıkla ihtiyaç duyulmaktadır [34]. Bu da testin sonuçlanma süresini 4 güne kadar uzatabilmektedir. Sonuç olarak şap virüsünün hızlı ve güvenilir teşhisinde PCR ve Real-Time PCR gibi alternatif test sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Revers Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) : Polimeraz zincir reaksiyonu ilk ortaya çıkışından bu yana en yaygın kullanılan nükleik asit tabanlı tanı yöntemidir [35]. RNA' yı hedef alan Revers Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu' nun geliştirilmesi ile birlikte birçok araştırmacı Şap Hastalığı teşhisinde bu yöntemi konvansiyonel testlerle birlikte veya tek başına güvenilir bir araç olarak kullanmaya başlamıştır [36]. Şap virüsünün polimeraz genini (3D) tespit edebilen spesifik bir RT-PCR testi geliştirilerek valide edilmiştir. Bu testin analitik duyarlılığı tek pasaj hücre kültürü inokulasyonuna göre 1000 kat daha yüksek bulunmuştur [37]. Jel elektroforez ile analiz edilen PCR ürünleri test içi kontaminasyon riskine neden olabilir. Bununla birlikte PCR birçok avantajı ile diğer konvansiyonel testlere göre daha üstündür. Örneğin, kötü örnekleme nedeniyle ortaya çıkabilecek yanlış negatif sonuçlar nadiren görülür. Eğer örnekte virüs mevcutsa RNA ekstraksiyonu esnasında inaktive olacağından düşük güvenlik seviyesine sahip laboratuvarlarda da çalışmak mümkündür. Ayrıca virüs inokulasyonunda interferon ve bazı enzimatik inhibitörler hücre duyarlılığını olumsuz etkiler. Şap virüsü tanısında RT-PCR ve hücre kültürü virüs izolasyonu çeşitli çalışmalarda karşılaştırılmıştır [38].

Birçok farklı doku örneğinde nükleik asit tespitinde altın standart olarak kabul edilen PCR yaygınlaşmış ve çok önemli bir araç haline gelmiştir. Duyarlı, özgül, hızlı teşhis ve viral RNA miktarının ölçülebilmesi Real-Time PCR testini insan ve hayvan viral patojenlerinin tespitinde vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir [39]. Real-Time PCR tekniği, daha hızlı sonuç verebilmesi, daha yüksek duyarlılığa sahip olması, otomatize edilebilmesi, hedef materyalin miktarı hakkında bilgi verebilmesi, "carry-over" kontaminasyonu en aza indirmesi gibi özellikleriyle konvansiyonel PCR' a göre daha avantajlıdır. Real-Time PCR tekniği ile şap virüsünün korunmuş gen bölgelerinin (5' UTR ve 3D polimeraz) spesifik universal primerler ve floresan işaretli problarla teşhisi OIE tarafından tavsiye edilmiştir [40]. Spesifik prob kullanımı testin duyarlılığını agaroz tabanlı konvansiyonel PCR testine göre arttırmıştır [41].

Tanısız PCR uygulamalarının en önemli problemi yanlış pozitif sonuçlar verebilmesidir. Bunun nedeni daha önce çoğaltılmış PCR ürünleri ile ortamın kontamine olmasıdır. Real-Time PCR tekniğinde test kapalı tüp içerisinde değerlendirilebildiğinden ortamdan kaynaklı kontaminasyon önemli ölçüde

engellenebilmektedir. İnsan kaynaklı hataları azaltmak amacıyla şap hastalığı teşhisinde kullanılan Real-Time testi otomatize edilmiştir. Bu amaçla RNA ekstraksiyon robotları, PCR miksi hazırlayan otomatik sistemler kullanılmaktadır [37]. Otomatize edilmiş Real-Time PCR sistemi virüs izolasyonu ile karşılaştırılmış ve epitelyal örneklerde virüs izolasyonundan daha hassas olduğu bildirilmiştir [42].

2.2.2 Yeni nesil yöntemler

Viral ürünlerin serilerinin piyasaya sürülmeden önce titresinin (konsantrasyonunun) hesaplanması önem taşımaktadır, çünkü bu, etkinlik ve güvenliğin sağlanması için kritik bir basamaktır. Her ürün grubu serisinin serbest bırakılması için gerekli spesifik testler olsa da her bir olguda virüsün tanımlanması, bileşimi ve etkinliğinin değerlendirildiği testler ve cihazlar Uluslararası Uyum Komitesi (ICH) tarafından belirlenen standartlara uygun olmalıdır [40].

Virusların etkinliğinin ve konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan testler Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), Analitik Ultrasantrifüj ve Dinamik Işık Saçılımı (DLS)'dir. TEM yüksek çözünürlüklü sonuç vermekle birlikte pahalı bir yöntemdir. Ayrıca oldukça yavaş ve örnek hazırlaması zahmetlidir. Virüs partiküllerinin seçiminde sübjektifliğe açıktır. Buna karşın "Işık Saçılımı" yöntemi oldukça hızlıdır ancak 10 nm'nin altındaki virüs partiküllerinin ayırımında başarısızdır [43].

AFFF-MALLS (Asymmetrical Flow Field Fractionation combined with Multiangle Laser Light Scattering): Hidrate partiküllerin büyüklüklerine göre ayrılması temeline dayalı bir yöntemdir. Ardışık 3 basamaktan oluşmaktadır. Ölçümümü yapılacak örnek birinci basamakta 350 µm'lik yüksek ayırıştırma kanalın alt yüzü boyunca yer alan gözenekli membrana enjekte edilir. Sıvı her iki uçtan girer ve gözenekli membran boyunca ilerler, ikinci aşamada akış düzeni kanal üzerinde laminar akış ve membran üzerinde çapraz akış (cross-flow) olacak şekilde devam eder. Membran yüzeyinden diffüze olan partiküller büyüklüklerine göre, küçük partiküller daha önce kolonu terk edecek şekilde ayrılırlar. Son aşamada membran üzerindeki akış durur ve kalan tüm büyük partiküller ve agregatlar kolondan çıkar. Bu partiküllerin UV absorbans ölçümleri ve MALLS dedektörleri ile analizi yapılır [44].

ES-DMA (Electrospray Differential Mobility Analysis): Biyolojik madde üreticilerinin (aşuların, gen tedavi ürünlerinin) 20-200nm boyutta partikülleri oldukça konsantre çözeltilerde ölçbilmelerini sağlayan bir testtir. ES-DMA'nın avantajı partikül büyüklük dağılımının doğrudan ölçülebilmesine olanak sağlaması, nanopartiküllerin önemli popülasyonlarının hızla ölçülmesine olanak sağlaması ve 0.3 nm kadar küçük nanopartiküllerin ölçülebilmesidir ki, bu ölçü en küçük virüslerden bile daha küçüktür. Buna ek olarak virüsler partikül büyüklüğüne göre ayrılabilmekte ve böylelikle kontaminant virüsler aynı büyüklükte olmadığı sürece tespit edilebilmektedir. ES-DMA son on yılda hem büyük hem de küçük çapta pek çok virüsün tespitinde kullanılmıştır. Kütle spektrofotometresinden farklı olarak DMA ayırımı, partiküllerin yükünün büyüklüğüne oranına göre yapmaktadır [43].

X-ışını Kırılması (X-ray diffraction, XRD): İso metrik virüslerde gerçek kristallerin oluşumu söz konusudur. Nükleik asitin virüs içerisindeki konumu, kapsomer topografisi ve diğer yapısal özellikler X ışınları ve Nötron dağıtım teknikleri ile ortaya konmaktadır. Buradaki teknikler çok komplike ve özelleşmiş tekniklerdir [45].

Analitik ultrasantrifüj: Bu tekniğin uygulanabilmesi santrifüj hızlarının 40.000 rpm veya daha yüksek değerlere çıkmasıyla mümkün olabilmektedir. Virüslerin sedimentasyon davranışları fizikokimyacılar ve virologlara avantaj sağlamıştır. Sedimentasyon hızı sıklıkla makromolekülün ya da partikülün konsantrasyonu ile ilgilidir. UV saptayıcıların geliştirilmesi bu konudaki çalışmalarda patlamaya yol açmıştır. Sukroz gradiyentlerinde ultrasantrifüjün kullanılması yaklaşık ve karşılaştırmalı bir data analizine imkan vermektedir. Bu yaklaşım analitik ultrasantrifüjün yerine kullanılmaktadır çünkü daha az özelleşmiş ekipman gerektirmektedir [45].

Elektroforez ve İyon Değişim Kromatografisi: Tüm virüsler, elektrik alanda sahip oldukları iyon yüküne göre hareket ederler. Bunların yükleri şüphesiz ki buldukları sıvının pH'ına bağlıdır. Bu yüzden pH 4'ün altında tüm karboksil grupları dissosiyasyon almamıştır ve elektroforetik hareketliliğe sahip değildir. Aynı durum pH 11'in üzeri için de geçerlidir. Bununla birlikte proteinler ve büyük agregatların elektroforetik hareketliliği, örneğin viral partiküllerin toplam bileşiminden ziyade yüzeyindeki polar grupların bileşimi tarafından belirlenir.

Elektroforez bu yüzden sıklıkla (ama her zaman değil) virüslerin ve bunların alt ünitelerinin ayırımında yararlı bir araç olmuştur [45].

Plak yöntemi: Enfektivitenin hesaplanmasında kullanılır. Virolojide temel yöntemdir aynı zamanda teşhis için de önem taşımaktadır. Basit, doğru ve yüksek düzeyde tekrarlanabilir bir yöntemdir. Katı bir destekte üretilen tek tabaka hücre üzerine virüs örneği eklenir ve 1 saat içerisinde virüsün hücreye tutunması gerçekleşir. Üzerine yarı-katı agar eklenir plaklar virüsün özelliğine göre 1 günden 3 haftaya varan sürelerde şekillenir. Plaklar çeşitli şekillerde belirlenir. Eğer virüs sitopatik etki yapıyorsa canlı hücreler boyanarak boşluklar belirlenir. Bazı virüsler ise hücreyi öldürmez bu durumda hemagglütinasyon özelliğine bağlı olarak eklenen eritrositler hücre yüzeyinde kümelenirler. Bu yöntem "hemoadsorbisyon yöntemi" denir. Ya da enfekte hücreler birleşerek "synsitium oluşumu" gösterebilirler. Bunlar mikroskopta gözlenebilir ve son olarak da hücre içindeki virüs partikül miktarına bağlı olarak immunofloresan yöntemi ve işaretli antikor yardımı ile tespit edilebilirler [46].

Q-PCR Kantitatif PCR: Bu teknikte genlerin kopya sayısı hesaplanır ve her bir kopyanın bir virüse karşılık geldiği tahmin edilerek virüs miktarı belirlenir. Ancak virüs genomu ölçüldüğünden ortalama boyut ve büyüklük dağılımı hesaplanamaz [47].

2.3. Kromatografi

Kromatografi, kompleks karışımlardaki çeşitli maddeleri birbirinden ayırmaya ve tanımlamaya olanak veren ve bilim adamlarının çalışmalarını kolaylaştıran bir seri ayırma yöntemleri tekniğidir. Tüm kromatografik uygulamalarda bir "sabit faz" ve bir "hareketli faz" bulunur. Bir karışımdaki maddeler hareketli faz ile sürüklenerek sabit faz üzerinden taşınır. Örnekteki maddelerin göç etme hızlarının farklı olması, her bir maddenin sabit faz üzerinde gruplaşarak ilerlemesine yol açar, böylece karışım içindeki maddeler birbirinden ayrılırlar.

Kromatografi, 20. yüzyılın başlarında Rus botanikçisi Mikhail Tswett tarafından bulunmuştur. Tswett, klorofil ve ksantofiller gibi çeşitli pigmentleri içeren bir çözeltiyi, toz halinde kalsiyum karbonatla doldurulmuş bir cam kolondan geçirerek birbirinden ayırmayı başarmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bölgeler halinde

gruplar oluşturduğu için bu ayırma yöntemine, renkli fotoğraf anlamına gelen kromatografi (chromatography) adını vermiştir.

2.3.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Kromatografinin sınıflandırılması dört ana başlık altında incelenebilir. Bunlar:

- Uygulama biçimine göre
- Faz tipine göre
- Kullanım amacına göre ve
- Ayrılma mekanizmalarına göre yapılan sınıflandırmalardır.

Uygulama biçimine göre:

- Düzlemsel kromatografi
 - o Kağıt kromatografisi
 - o İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
 - o Gaz kromatografisi (GC)
 - o Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Faz tipine göre:

- Sıvı kromatografisi
 - o Sıvı-katı kromatografisi
 - o Sıvı-sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
 - o Gaz-katı kromatografisi
 - o Gaz-sıvı kromatografisi

Kullanım amacına göre:

- Analitik kromatografi (Kalitatif kromatografi; Kantitatif kromatografi)
- Preparatif kromatografi (Karışımlardan saf madde elde etme)

Ayrılma mekanizmalarına göre:

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Partisyon (Dağılma) kromatografisi
- İyon değişim kromatografisi
- Jel filtrasyon (Size-Exclusion) kromatografisi

- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

kullanılan belli başlı yöntemlerdir. Sunulan tez çalışmasında kullanılması nedeniyle aşağıda iyon değişim kromatografi yöntemi detaylı bir şekilde açıklanacaktır.

2.3.2. İyon değişim kromatografisi

İyon değişim kromatografisi ile ayrıştırmanın temeli, çözelti içerisinde bulunan yüklü moleküller ile kolon matriksine kovalent olarak bağlı bulunan zıt yüklü moleküller arasında, geri dönüşümlü bir adsorbsiyonun oluşmasına dayanır. Bu nedenle, iyon değişim kromatografisinin (Ion Exchange Chromatography, IEC) temeli, zıt yüklü partiküller arasındaki çekime dayanmaktadır. İyon değişim kromatografisi ile ayrıştırma işlemleri genelde, iyon-değiştirici kolon materyalleri ile doldurulmuş kolonlarda yürütülür [5]. İyon değişim kromatografisi ile ayırım için iyonik yapı şarttır. Bu yöntemle basit inorganik ve organik iyonlar birbirinden ayrılacağı gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de ayrılabilir [48]. İyon değişim kromatografisinin başarılı bir şekilde uygulanmasının en temel nedenleri arasında, oldukça geniş bir uygulama alanına sahip olması, yüksek çözünürlük sağlaması, kapasite yüksekliği ve uygulama basitliğinin yanı sıra, metodun kontrol edilebilir olması sayılabilir.

İyon değişim kromatografi uygulamaları, birbirinden ayrı beş adımdan oluşmaktadır.

1) Kolon materyalinin dengelenmesi: Bu adımda iyon-değiştiricinin (kolon materyalinin), ayrıştırılmak istenilen molekülleri bağlamasını sağlamak için, ortamın pH ve iyonik kuvveti dengelenerek, başlangıç koşullarına getirilmesi sağlanır. Bu dengeleme sonucunda, kolon materyali üzerinde kovalent olarak bağlı bulunan iyon değiştirici gruplar, değiştirilebilen-iyonlar (genellikle klor veya sodyum gibi basit anyonlar veya katyonlar) ile ilişki halindedirler (Şekil 2.5.)

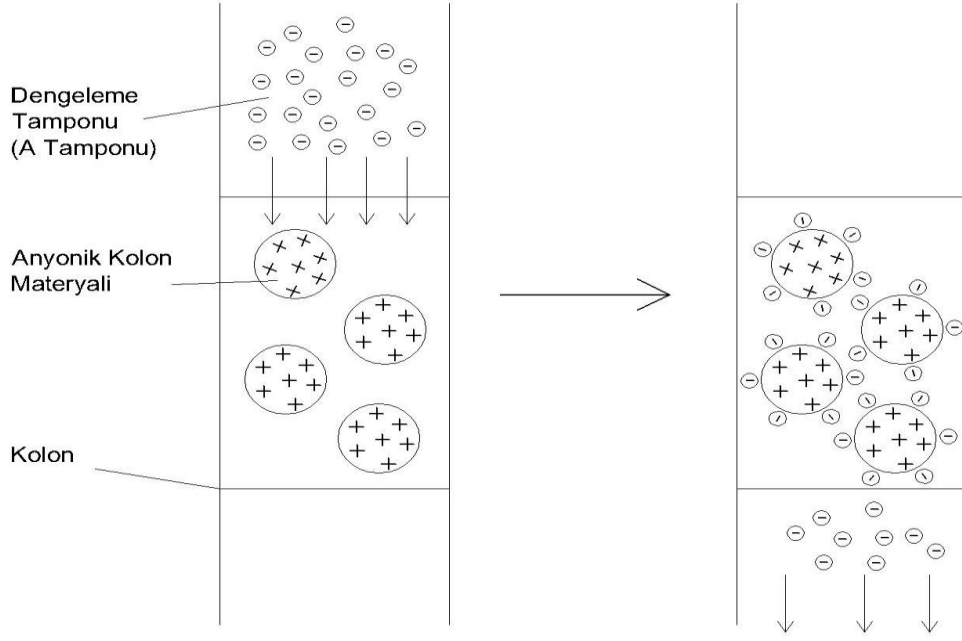
2) Örneğin yüklenmesi ve adsorbsiyonu: Bu adımda, dengelenmiş olan kolon materyali üzerine örnek yüklenir ve yüklenen örnek, hareketli faz ile iyon-değiştiricinin matriks yapısı boyunca değişim bölgesine difüze olur. Bu aşamada örnek içerisindeki uygun yüklü moleküller, değiştirilebilen-iyonlarla yer değiştirerek,

kolon matriksine geri-dönüşümlü olarak bağlanırlar. Kolon matriksine bağlanmayan moleküller ise kolonun dengelenmesinde ve örneğin yüklenmesinde kullanılan hareketli faz (yıkama tamponu) ile birlikte kolonu terk ederler (Şekil 2.6.).

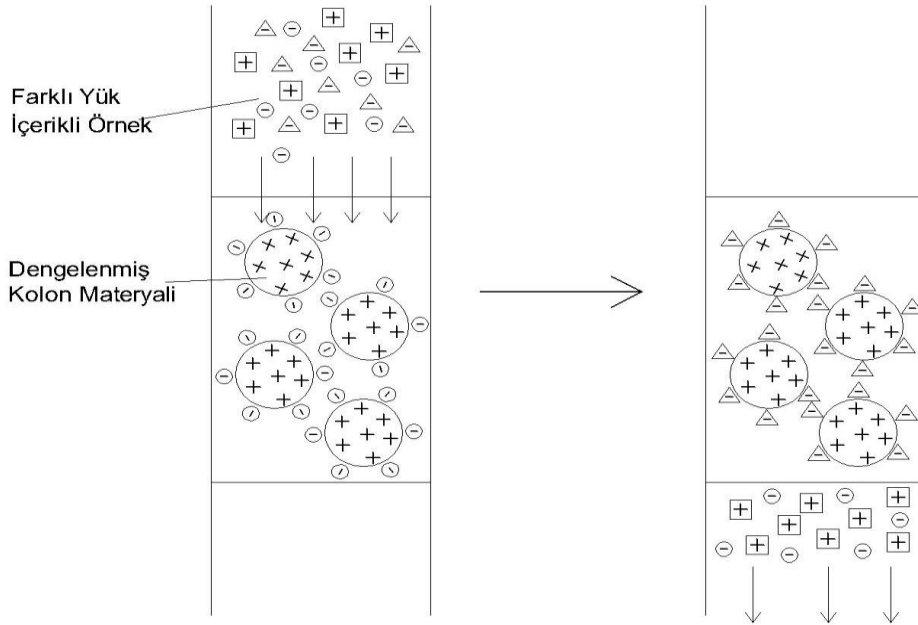
3) Moleküllerin elüsyonu: Kolon materyaline geri-dönüşümlü olarak bağlanmış olan yüklü moleküllerin kolondan elüsyonu, elüsyon tamponununun pH' sının değiştirilmesi veya iyonik kuvvetinin artırılması ile başarılabilir gibi, affinite elüsyonu ile de başarılabilir. Affinite elüsyonunda kolona, iyon-değiştiriciye olan affinitesi, yüklü olan molekülün affinitesinden daha fazla olan bir iyonun yüklenmesi ile ayırma işlemi başarılıdır. Bu olayın çok ani bir biçimde ve bir denge prosesi şeklinde oluştuğu düşünülmektedir. Şekil 2.7.'de gösterilen 3. adımda, kolon materyaline iyonik olarak bağlı bulunan yüklü moleküllerin desorbsiyonu, elüsyon sıvısı içerisindeki tuz derişiminin dereceli olarak artırılması ile sağlanmıştır. Tuz derişiminin kademeli olarak artırılması ise yüklü moleküllerin bağlanma derecelerine bağlı olarak, bu moleküllerin sırası ile kolondan elüsyonunu sağlamaktadır. Yani, kolon materyaline bağlanmış olan molekülün oldukça yüksek oranda elektriksel yük ile yüklenmiş olması, bu molekülün iyon-değiştiriciye çok daha sıkı bir şekilde bağlanmasına yol açacaktır. Bu nedenle, iyon-değiştiriciye sıkı bir şekilde bağlanan bu molekülün elüsyonu, daha zayıf olarak bağlanan moleküle oranla, daha yüksek tuz derişiminin uygulandığı noktada gerçekleşecektir. Bunun sonucu olarak da, kolon materyaline en zayıf bağlanan yüklü moleküllerin elüsyonu en önce, en kuvvetli bağlanan moleküllerin elüsyonu ise en sonra gerçekleşecektir [5] (Şekil 2.7.) .

4) Kolon materyalinin temizlenmesi: Uygulanan elüsyon koşullarına rağmen, kolondan ayrılmayan moleküllerin kolondan elüsyonu sağlanır. Bunun için yüksek tuz derişimine sahip çözelti kolondan geçirilerek kolon materyali üzerinde kalan moleküller temizlenir (Şekil 2.8.).

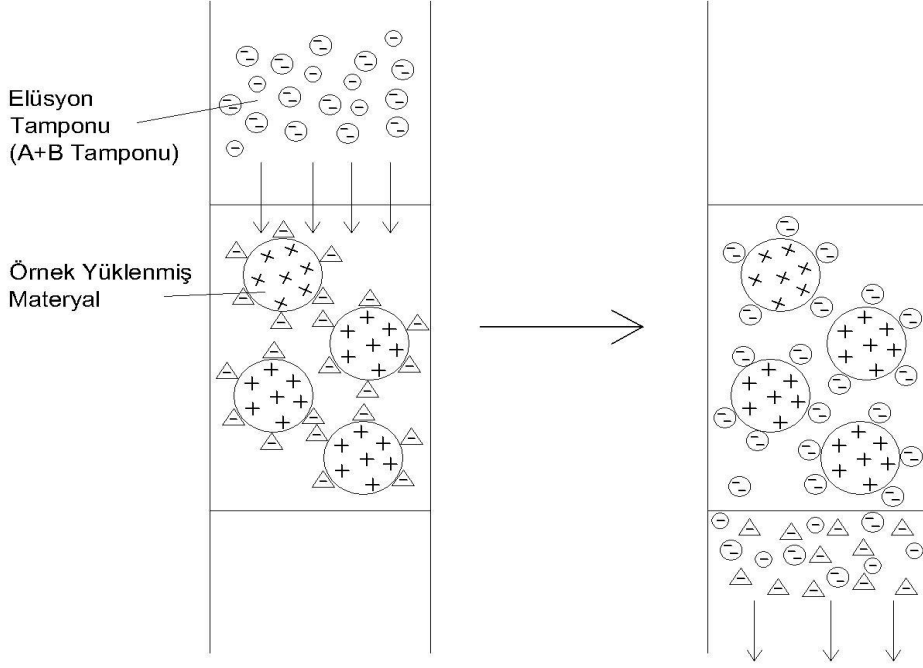
5) Kolon materyalinin rejenerasyonu: Kolon materyalinin ve kolonun yeniden kullanılması için başlangıç koşullarına getirilmesi, yani yeniden dengelenmesidir (Şekil 2.8.).



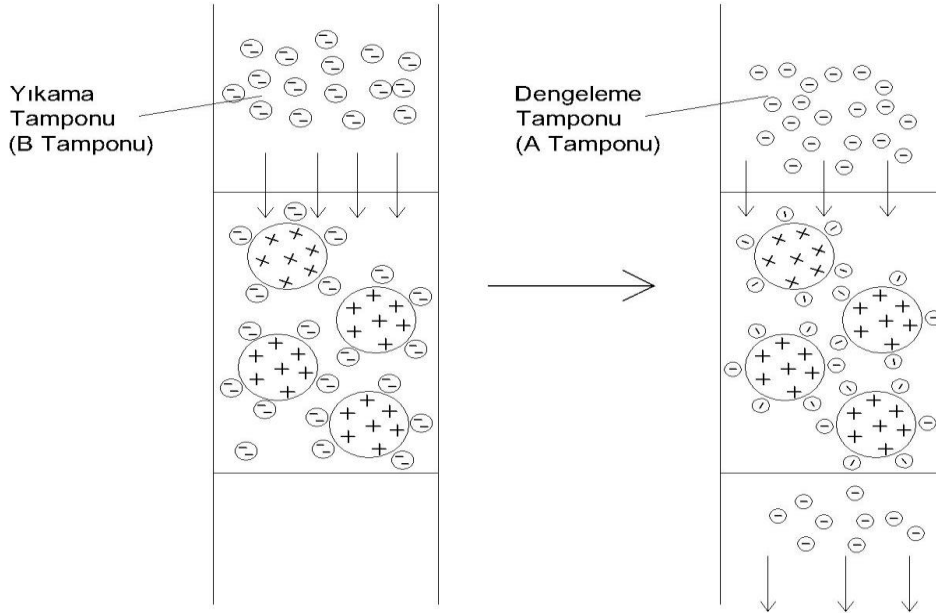
Şekil 2.5. Kolon materyalinin dengelenmesi



Şekil 2.6. Örneğin yüklenmesi ve adsorsiyonu



Şekil 2.7. Moleküllerin elüsyonu



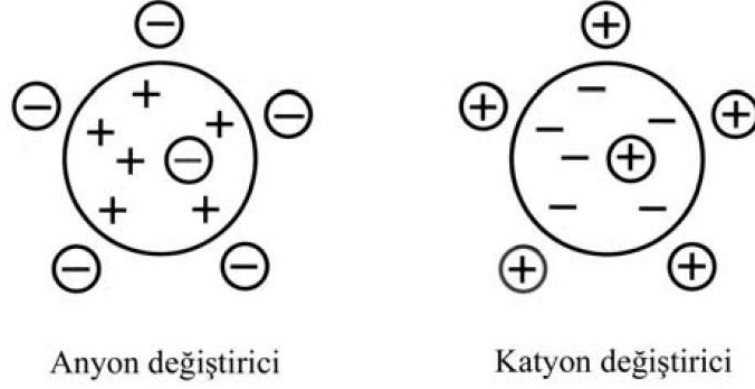
Şekil 2.8. Kolon materyalinin temizlenmesi ve rejenerasyonu

İyon değişim kromatografisi ile ayrıştırmanın temeli, farklı moleküllerin farklı iyonik yüklere sahip olmaları, yük yoğunluklarının farklı olması ve yüklerin moleküller üzerindeki dağılımlarının farklı olması nedeni ile iyon-değiştirici ile farklı derecelerde etkileşim göstermelerine dayanmaktadır. Yüklü moleküller ile iyon-değiştirici arasındaki etkileşimler ise ortamın iyonik kuvvetinin ve pH'nın değiştirilmesi gibi faktörlerle kontrol edilebilmektedir. İyon değişim kromatografisi, örneğin tek bir yüklü amino asit bakımından dahi farklı olan iki protein molekülünün ayrıştırılmasını sağlayan, güçlü bir ayrıştırma tekniğidir. Bu nedenle, biyomoleküllerin yük özelliklerindeki farklılıklar, bu kromatografi tekniğinin uygulanmasında oldukça önemli bir yere sahiptir.

İyon değişim kromatografisinin uygulanmasında araştırmacı, ilgilenilen bileşiklerin ayrıştırılmasında iki yoldan birisini takip edebilir. Bunlardan birincisinde, ilgilenilen bileşiklerin kolon materyaline bağlanması sağlanırken, kirleticilerin kolonu terk etmesi sağlanmaktadır. İkincisinde ise kirleticilerin kolon materyaline bağlanması sağlanırken, ilgilenilen bileşiklerin kolonu terk etmesi sağlanabilir. Bu yöntemlerden daha sıklıkla kullanılanı ise birincisidir. Çünkü birinci yöntem, hem ilgilenilmekte olan bileşiklerin yoğunlaştırılmasına, hem de daha etkili bir fraksiyonlamanın yapılmasına imkan sunmaktadır [5].

2.3.2.1. İyon değiştirici matriksler

İyon değişim kromatografileri, değişik iyonik gruplarının kovalent olarak bağlanmış olduğu matriksler kullanılarak uygulanabilir. Matrikslere kovalent olarak bağlanan iyonik gruplar ise ya pozitif yüklü ya da negatif yüklüdürler (Şekil 2.9.). Bu nedenle iyon-değiştiricilerin, katyon- ve anyon değiştirici matriksler olmak üzere iki tipi bulunur. Katyon-değiştirici matriksler, negatif yüklü fonksiyonel gruplara sahiptirler ve bunlar, pozitif olarak yüklü katyonları çekerler. Bu iyon değiştiriciler aynı zamanda, asidik iyon-değiştirici matriksler olarak da adlandırılırlar. Çünkü bunların negatif yükleri, asidik grupların iyonizasyonu sonucu oluşur. Anyon-değiştirici matriksler ise pozitif yüklü fonksiyonel gruplara sahiptirler ve bu gruplar, negatif yüklü anyonları çekerler. Genellikle pozitif yükler, protonların bazik gruplarla birleşmesi sonucu olduğundan, aynı zamanda bu tipteki iyon-değiştiricilerini tanımlamak için "bazik iyon-değiştirici matriks" terimi de kullanılır.



Şekil 2.9. İyon değiştirici matris tipleri [5]

Biyolojik bileşiklerin ayrıştırılması amacı ile kullanılabilir ilk iyon-değiştiriciler Peterson ve Sober (1956) tarafından geliştirilen selüloz iyon-değiştiriciler olmuştur. Selülozun hidrofilitik özelliği nedeni ile bu tipteki iyon-değiştiriciler, proteinlerin denatürasyonuna çok daha az neden olmaktadır. Fakat, ne yazık ki selüloz iyon-değiştiricilerin çoğu düşük kapasiteye ve selülozun düzensiz şekli nedeni ile de zayıf akış kapasitesine sahiptirler. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için ise ilk etapta çapraz-bağlı dekstran (Sephadex), agaroz (Sephacel) ve selüloz (DEAE Sephacel) temelli iyon değiştirici matrisler geliştirilmiştir. Bu iyon değiştirici matrisler küresel formda ve oldukça gözenekli yapıda olduklarından, hem matrisin akış özelliklerinin, hem de makromoleküller için kapasitelerinin artırılması sağlanmıştır. Daha sonraları jel teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak, Sepharose High Performance[®], Sepharose Fast Flow[®] ve Sepharose Big Beads[®] gibi oldukça yüksek oranda çapraz-bağlı agaroz temelli matrisler ve MonoBeads[®], MiniBeads[®] ve SOURCE[®] gibi çeşitli ticari sentetik polimer matrisler geliştirilmiştir. Bu modern matrisler ise iyon değişim kromatografilerinin hem analitik hem de preparatif amaçlı olarak oldukça hızlı, yüksek kapasiteli ve yüksek çözünürlüklü bir kromatografi tekniği olarak kullanılmasına yol açmıştır. Günümüzde ise mikropreparatif veya analitik ayrıştırmalar için aşırı derecede yüksek çözünürlük sağlayan MiniBeads gibi gözeneksiz, polimer matrisler de bulunmaktadır [5].

İyon-değiştirici matrislerin örnekleri izelge 2.1'de verilmektedir. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) için uygun olan ve çok çeşitli iyonik gruplar içeren, çapraz bağlı iyon-değiştiricilerini ise günümüzde peliküller ve gözenekli

formlarda bulmak mümkündür. Polistiren, gözenekli silika veya hidrofilik poli-eter kökenli olan gözenekli iyon-değiştirici çeşitleri ise proteinlerin ayrıştırılmasında özel bir öneme sahiptirler. Bu iyon değiştiriciler 5-25 µm aralığında partikül çaplarına sahiptirler. HPLC iyon-değiştiricilerinin çoęu ise 60°C'ye kadar kararlıdır. Kolon sıcaklığındaki artış, hareketli fazın viskozitesini dūřüreęinden ve bunun soncunda da ayrıştırma verimini artıracadığından, ayrıştırma işlemi çoğunlukla bu sıcaklıkta (60°C) gerçekleştirilmektedir.

Çizelge 2.1. İyon-değiştirici matriks rnekleri [5].

Tipi	Matriks	Fonksiyonel grup	Fonksiyonel grup adı
Zayıf asidik (Kasyon-değiştirici)	Agaroz		
	Selüloz	$CH_2-O-COO^-$	Karboksi
	Dekstran	$CH_2-O-CH_2COO^-$	Karboksimetil
	Poliakrilat		
Kuvvetli asidik (Kasyon-değiştirici)	Selüloz	$CH_2-O-SO_3^-$	Sülfo
	Dekstran	$CH_2-O-CH_2SO_3^-$	Sülfometil
	Polistiren	$CH_2-O-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$	Sülfopropil
Zayıf bazik (Anyon-değiştirici)	Agaroz		Poli-etilenimin
	Selüloz	$CH_2-O-CH_2CH_2N^+H_3$	Aminoetil
	Dekstran	$CH_2-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$	Dietilaminoetil
	Polistiren		
Kuvvetli bazik (Anyon-değiştirici)	Selüloz	$CH_2-O-CH_2N^+(CH_3)_3$	Trimetilaminometil
		$CH_2-O-CH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_3$	Trietilaminoetil
	Dekstran	$CH_2-O-CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$ CH_2CH_2OH	Dimetil-(2-hidroksietil) aminometil
		$CH_2-O-CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_2CH_3)_2$ CH_2CHCH_3 OH	Dietil-(2-hidroksipropil) aminoetil
Polistiren			

2.4. Kromatografi Yönteminin Kullanıldığı Analiz Cihazları

Bu başlıkta, yapılan çalışmalarda kullanılan HPLC ve FPLC cihazları ve kolonları hakkında bilgiler verilecektir.

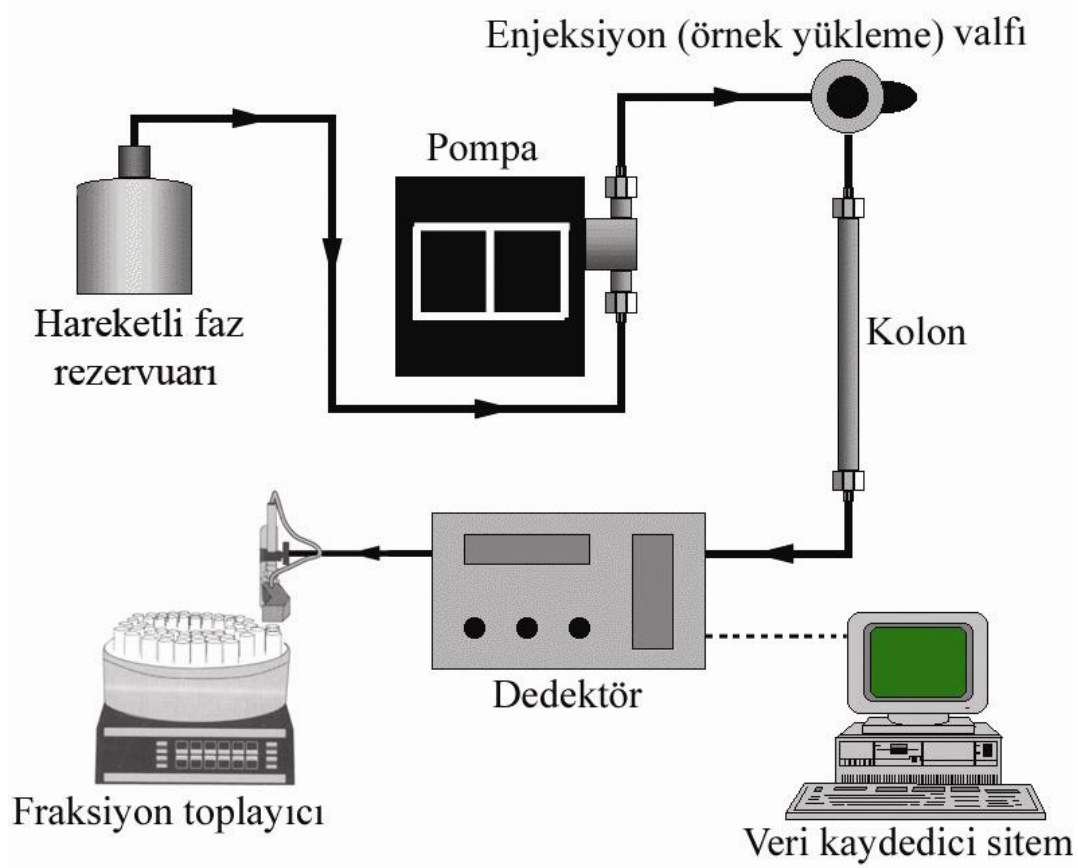
2.4.1.HPLC cihazı ve kolonları

HPLC (High Performance Liquid Chromatography), biyoteknoloji ve farmosötik endüstrisi alanında yapılan çalışmaların araştırma aşamasından kalite kontrol ve onaylama aşamasına kadar olan bütün aşamalarında, moleküllerin

tanımlanmasında, karakterizasyonunda ve saflaştırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir kromatografi tekniğidir. HPLC'nin bu kadar yaygın olarak kullanılmasının nedenlerinden birisi, sıvı içerisinde çözünen moleküllerin ayrıştırılmasını ve saflaştırılmasını sağlayan eşiz bir kromatografi tekniği olmasıdır. Bunun yanı sıra, 1970'li yıllardan günümüze kadar HPLC alanında kaydedilen gelişmelere paralel olarak, araştırma konularının temel amacı moleküllerin saflaştırılması ve karakterizasyonu olan biyoteknoloji ve biyokimya alanında da oldukça önemli ilerlemelerin kaydedilmesine yol açmıştır [5].

HPLC sistemleri :

HPLC sistemlerini oluşturan ekipmanlar, Şekil 2.10.'da şematize edildiği gibi bir hareketli faz rezervuarı, pompa, enjeksiyon valfi, kolon, dedektör, veri kaydedici sistem ve fraksiyonların toplanması arzu edildiği durumlarda ise bir fraksiyon toplayıcıdan meydana gelmektedir. Böyle bir sistemin en önemli parçasını ise, örnek moleküllerinin ayrıştırılmasının gerçekleştirileceği yer olan kolon oluşturmaktadır. Kolon içerisine doldurulmuş olan gözenekli durgun faz materyallerinin partikül çapları oldukça küçük (3-10 μm) olduğundan, kolon boyunca hareketli fazın akışı yüksek basınç sağlayan bir pompa aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Kromatografik proses, örnek materyalinin, örnek yükleme valfi aracılığı ile kolona yüklenmesi sonucu başlamaktadır. Örnek moleküllerinin ayrıştırılması ise kolon boyunca moleküllerin ve hareketli fazın pompalanması esnasında gerçekleşmektedir. Ayrıştırılması gerçekleşmiş olan moleküller hareketli faz ile birlikte kolonu terk ederek (elüe olarak) dedektör tarafından dar bir bant (veya pik) olarak belirlenecektir. Kolondan elüsyonu gerçekleştiren moleküllerin dedektör aracılığı ile belirlenmesi önemlidir. Elüsyonu gerçekleştiren moleküllerin seçici veya genel olarak belirlenmesi ise kullanılan dedektörün tipine bağlıdır. Kolondan elüe olan her bir molekül için dedektörde meydana gelen sapma, bir grafik kaydedicide veya bilgisayar ekranında görüntülenir ve böylece kromatografik ayrıştırmanın kromatogramı elde edilmiş olur. Ayrıştırılması gerçekleştirilen moleküllerin toplanması isteniyorsa, elüentin belirli hacimlerde veya zaman aralıklarında toplanmasını sağlayan bir fraksiyon toplayıcı kullanılmalıdır. Kromatografik verilerin toplanması, saklanması ve analizi için ise genellikle bilgisayarlar kullanılmaktadır.



Şekil 2.10. HPLC sistemini oluşturan ekipmanlar

HPLC kolonları:

HPLC'de kullanılan kolonlar (Şekil 2.11.) genellikle paslanmaz çelikten yapılmış, $5,5 \times 10^7$ Pa basınca dayanıklı kolonlardır. Genellikle 10, 15 ve 25 cm uzunluğunda, 4 veya 4,6 mm iç-çapa sahip kolonlar, örnek kapasitesi, hareketli faz tüketimi, kromatografinin hızı ve çözünürlüğü arasında ideal bir dengeyi oluşturmasını sağladığı için en çok kullanılan HPLC kolonlarıdır. Çoğunlukla bu ölçülerdeki kolonlar kullanılmasına rağmen, daha küçük mikro-çaplı kolonlar (1-2 mm çapında) da mevcuttur. HPLC'de kullanılan kolonların iç-çapları, sadece kolona yüklenecek örnek materyal miktarını ve hareketli fazın akış oranını etkiler. Genel bir kural olarak, moleküllerin aynı elüsyon zamanlarında elüe edilebilmesi için bir kolonun iç-çapı iki-kat artırıldığında, hareketli fazın akış oranını dört-kat (kolon iç-çapının karesi kadar) artırmak gerekmektedir. Bu durumda, kolona yüklenecek olan örnek materyal miktarı da aynı oranda artırılabilir. Bunun aksine, kolonun iç çapı iki-kat düşürüldüğünde ise hareketli fazın akış oranı ve örnek materyal miktarı ise dört-kat azaltılır.



Şekil 2.11. Değişik boyutlardaki HPLC kolon örnekleri.

Normal HPLC kolonları 2 mL/dk'lık bir akış hızı sağlarken, mikro-çaplı kolonlar 0,05-0,20 mL/dk'lık bir akış oranı sağlarlar. Fakat HPLC ile ayrıştırılması yapılan moleküllerin toplanması gerekiyorsa (preparatif-ölçekli), daha büyük boyutlardaki kolonların kullanılması gerekebilir. Bu durumda, 100 mL/dk'lık akış oranı sağlayan, iç-çapı 25 mm olan preparatif kolonlar da mevcuttur. HPLC' de kullanılan en iyi kolonlar ise kolon materyalinin çok iyi bir şekilde paketlenmesini sağlamak amacı ile iç cidarı sırlanmış olan kolonlardır.

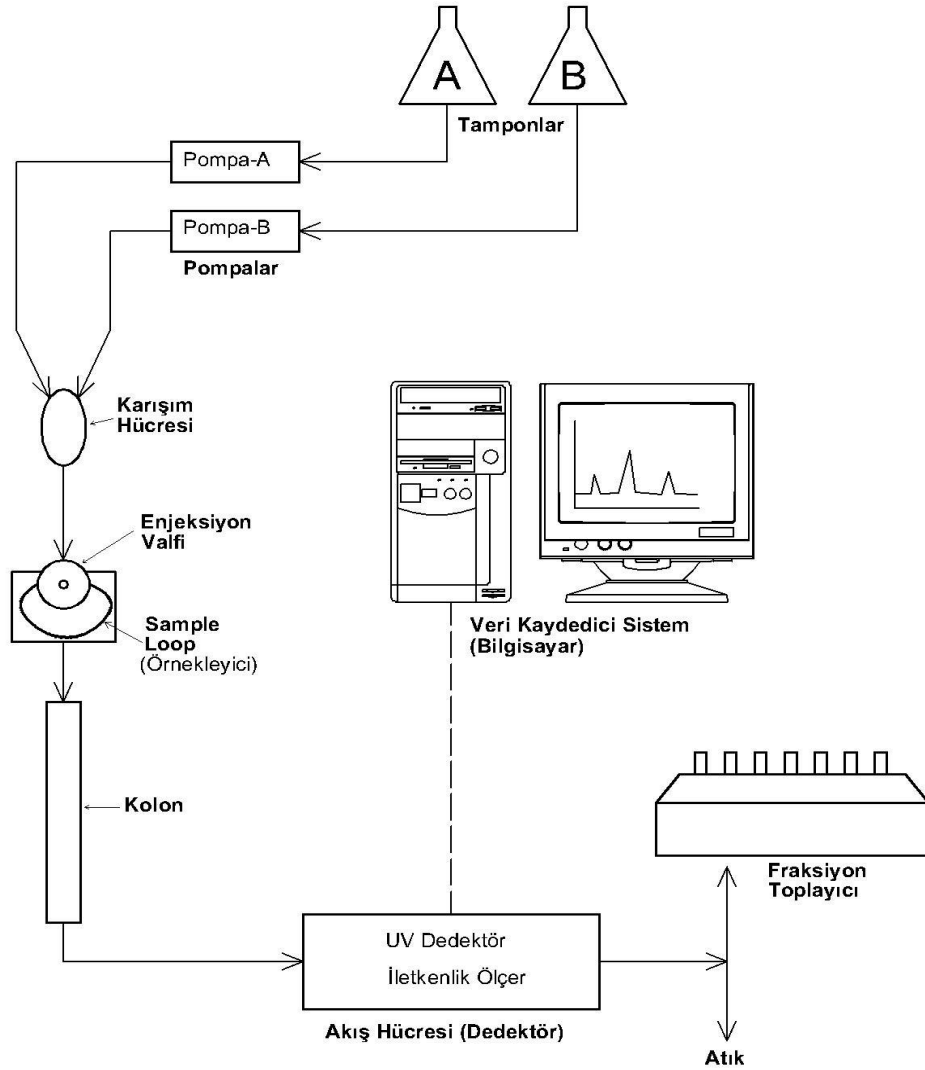
2.4.2.FPLC cihazı ve kolonları

Sıvı kromatografi tekniklerinden biri olan FPLC (Fast protein liquid chromatography) proteinlerin analizinde veya saflaştırmalarında sıklıkla kullanılır. FPLC 1982 yılında İsveç'te geliştirilmiştir. İlk olarak hızlı performanslı sıvı kromatografisi (fast performance liquid chromatography) olarak adlandırılmıştır. HPLC' den farklı olarak FPLC sistemlerinde genelde sadece protein ile çalışılır. Bu nedenle hızlı protein sıvı kromatografisi (Fast protein liquid chromatography) olarak da adlandırılır. FPLC sistemlerinde HPLC sistemlerinin tersine daha düşük (5 bar dan az) basınçlarda ve daha yüksek akış hızlarında (1-5 mL/dk) çalışılır. Kolonların hacimleri çok geniş aralıkta değişebilir. Miligram miktarındaki analizler için 5 mL veya daha az hacimlerde kullanıldığı gibi endüstriyel uygulamalarda gram veya kilogram seviyelerinde saflaştırma işlemleri için çok daha büyük hacimlerde kolonlar kullanılabilir.

Diğer sıvı kromatografi tekniklerinde olduğu gibi FPLC sisteminde de bir mobil faz ve bir sabit faz vardır. Protein karışımı bu fazlara karşı farklı afiniteye sahip

olduğundan ayırım mümkün olur. FPLC sistemlerinde mobil faz, çalışılacak olan örneğin yapısına uygun bir pH ve tuz oranına sahip olan tampon çözeltidir. Mobil fazın akış hızı pompalar tarafından kontrol edilir. Mobil faz bileşimi iki farklı tamponun (A ve B tamponları) karışımından oluşabilir. Sabit faz, silindirik yapıya sahip cam veya plastik kolon içine yerleştirilmiş genellikle çapraz bağlı olan agaroz, silika, selüloz veya polisten matrikslerden oluşur. FPLC matriksleri uygulama yöntemine göre geniş aralıkta değişen tanecik boyutuna ve yüzey ligandına sahiptir.

FPLC sistemlerinde özellikle de iyon değişim kromatografisinde, hedef protein ve diğer yabancı protein karışımı A tamponuyla birlikte hareket ettirilerek kolona yüklenir, daha sonra B tamponu ile de kolondan sökülerek hedef protein diğer proteinlerden ayrılır. Örnekleyiciye (sample loop) yüklenen örnek protein karışımı %100 A tamponu içinde çözünerek hareket eder ve kolona yüklenir. Kolona giren protein karışımının bir kısmı iyonik yüklerine göre hedef protein ile birlikte kolon matriksine tutunur, diğer kısmı da kolona tutunmadan A tamponu ile birlikte kolonu terk eder. Bir sonraki aşama kolona tutunan proteinlerin hem kolondan hem de birbirinden ayrılması aşamasıdır. Bu aşamada B tamponu (elüsyon yani sıyırma tamponu) kullanılır. A ve B tamponlarının pompasının otomatik kontrolü ile pompaların çıkışında bulunan karışım hücrelerinde, belirli bir zaman aralığında %0 B + %100 A tamponları karışımından başlayarak %100 B + %0 A tamponları karışımı olacak şekilde bir tuz konsantrasyonu değişimi (gradient elüsyon) oluşturularak sabit akış hızında kolona pompalanır. Kolona tutunmuş olan proteinler, bu gradient elüsyonu ile iyonik yüklerinin şiddetine göre farklı zamanlarda kolondan sıyrılarak kolonu terk eder. Kolondan çıkan proteinler akış hücresinde bulunan iki dedektörden geçer. Bunlardan birisi 280 veya 254 nm dalga boylarında ışınım yapan UV lamba ve dedektörüdür. Burada proteinlerin UV absorbansı ve miktarına bağlı olarak pikler tespit edilir. Diğer dedektör ise tuz konsantrasyonunun tespit edildiği iletkenlik dedektörüdür.



Şekil 2.12. FPLC sistemini oluşturan ekipmanlar

FPLC sistemleri

Tipik bir laboratuvar FPLC sistemi iki adet yüksek hassasiyetli pompa, bir kontrol ünitesi, bir kolon, bir UV dedektör sistemi ve bir fraksiyon toplayıcıdan oluşur. Bu sistemi manuel çalıştırmak mümkün olsa da, normalde tüm bileşenler bilgisayarla veya kontrol ünitesi ile kontrol edilir (Şekil 2.12.).

1. Pompalar: FPLC sisteminde A ve B tamponları için birer pompa bulunur. Pompaların çıkışında karışım haznesi mevcuttur. Karışım haznesinde A ve B tamponları karışır. Pompaların basınçları HPLC sistemlerinde olduğu gibi yüksek

değildir. Akış hızları geniş bir aralığa sahiptir. Bu nedenle de FPLC hem analitik hem de preparatif kromatografi için uygun bir yöntemdir.

2. Örnekleyici (Sample loop): Çalışılacak örnek kolona yüklenmeden önce ince borulardan oluşan bu kısma doldurulur. Birkaç mikro litreden 50 mL ye karar değişen hacimde örnekleyici vardır.

3. Enjeksiyon valfi: Motorlu ve otomatik kontrolü olan üç farklı yolu olan bir vanadır. Bu yollar: i) pompalardan geçmiş ve karışım haznesinde karışmış olan tamponu kolona gönderebilir, ii) karışım haznesinden gelen tamponunu yıkama esnasında atığa gönderebilir ve iii) enjeksiyon loop' unda bulunan örneği kolona gönderebilir.

4. Kolon: İçerisinde, kullanılacak olan kromatografi metoduna göre farklı matriksler (sabit faz) bulunan cam ya da plastik bir silindirdir. Kolonlar yukarıdan aşağıya doğrusal bir akış için dikey olarak monte edilir. Kolonun çıkış kısmı, içerisinden tampon ve proteinlerin geçişine müsaade ederken kolon matriksinin kolondan boşalmasına müsaade etmez.

5. Akış hücresi: Bu kısımda UV lamba ve iletkenlik ölçer bulunur. Kolondan çıkan tampon ve proteinlerin UV absorbansını (280 nm veya 254 nm dalga boyunda) ölçmek için kullanılır. Aynı zamanda hücreden geçen tamponun tuz konsantrasyonu da iletkenlik ölçer sensörü ile ölçülür. Bazı sistemlerde pH ölçümü için de bir sensör bulunabilir.

6. Kaydedici sistem: Akış hücreleri bir ekran ve/veya kayıt cihazına bağlıdır. Bu cihaz eski sistemlerde basit bir grafik kaydedici olabilir, modern sistemlerde ise özel donanım ve yazılıma sahip bir bilgisayardır. Bu kısımda akış hücresinden geçen ayrımı yapılmış proteinlerin pikleri izlenir ve kaydedilir. Bilgisayar yazılımının özelliğine göre piklerin değerlendirilmesi (örneğin protein miktar tayini) yapılabilir.

7. Fraksiyon toplayıcı: Fraksiyon toplayıcı, içinde test tüpleri ve benzeri kaplar bulunan döner bir raf sistemidir. Bu sistemle ayrımı yapılan protein piklerinin her birini otomatik olarak ayrı test tüplerine toplamak mümkündür. Sistemde piklere göre veya eşit hacimde olacak şekilde toplama yapılabilir.

FPLC sistemleri, çeşitli isteğe bağlı bileşenler içerebilir. Tıkanmayı engellemek için kolondan önce bir filtre ilave edilebilir. Büyük FPLC kolonlarında enjeksiyon loopu yerine, numune doğrudan küçük bir peristaltik pompa ile kolon içine yüklenebilir.

FPLC kolonları

FPLC kolonları HPLC kolonlarından farklı olarak daha büyük çap ve uzunlukta olabilmektedir. Basınç dayanımı olarak HPLC kolonları gibi yüksek basınçlara uygun değildirler. Yüksek akış hızları için uygundur. İçerisinde bulunan matrikse (sabit faz) ve kromatografi tipine göre cam ya da plastik olabilirler. Genel olarak ticari kolonlar kullanılmakta olup, (Şekil 2.13.) kromatografi deney çalışmalarında kullanılan el ile doldurulmuş kolonlar da mevcuttur.



Şekil 2.13. FPLC kolon örnekleri (GE Healthcare).

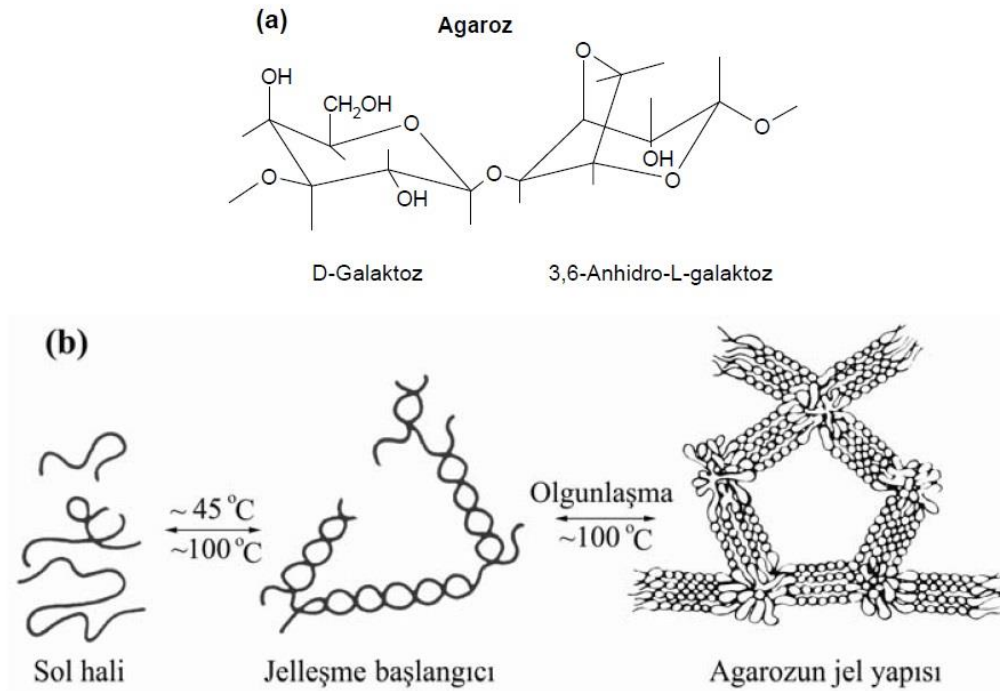
Kolon destek materyalleri (Matriksler): Matriks, durgun fazı desteklemek amacıyla kullanılan materyaldir. Belirli bir durgun faz için matriks seçimi, sabit fazın kromatografide başarıyla kullanılması açısından büyük önem taşır. Bir matrikste bulunması gereken özellikler ise aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- İyi bir akış sağlamalı ve kolon boyunca meydana gelebilecek basınç düşmelerini minimize edebilmesi için yüksek mekanik kararlılığa sahip olmalıdır.

- Kimyasal kararlılığı iyi olmalıdır.
- Kolon materyalinin yatak hacmini küçültmek için, durgun fazın bağlanmasını sağlayan, yoğun fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır.
- Değişik partikül boyutları aralığında kullanılabilir olmalıdır.
- Bazı kromatografilerde gözenekli yapıda matrikslerin kullanılması gerektiğinden, matriks gözenekleri doğru boyut ve şekilde olmalıdır.
- Analitlerin seçici olmayan adsorbsiyonlarını minimize etmek için matriks yüzeyi inert olmalıdır [5].

Pratikte kullanılan en yaygın altı matriks ise şunlardır:

1. Agaroz: D-galaktoz ve 3,6-anhidro-L-galaktoz birimlerinden oluşmuş bir polisakkarittir (Şekil 2.14.). Dallanmış polisakkarit zincirlerinin 2,3-dibromopropanol gibi ajanlarla çapraz-bağ yapması sonucunda, pH 3-14 aralığında kararlı jeller meydana gelir. Bu jellerin akış özellikleri iyi olmasına ve hidrofilik özellikleri yüksek olmasına rağmen, kurumalarına izin verilirse yapıları geri dönüşümsüz olarak bozulabilir. Sepharose ve Bio-Gel A bu jellere örnektir.



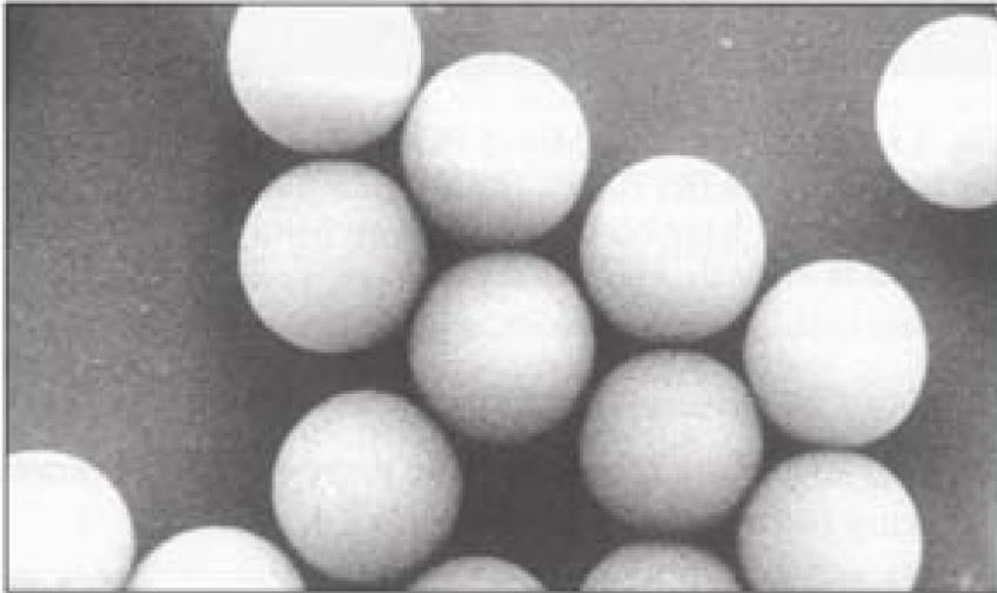
Şekil 2.14. Agaroz tipi jellerin (a) moleküler ve (b) jel yapısı [5].

2. Selüloz: Glikoz birimlerinin β -1-4 glikozid bağlarıyla bağlanması sonucunda oluşan bir polisakkarittir. Epiklorohidrin ile çapraz-bağ yaparak kolon matriksi olarak kullanılır. Çapraz-bağ sayısı ise matriksin gözenek boyutunu belirler. Boncuk, mikrogranüler ve fibröz formlarda kullanıldığında pH kararlılığı ve akış özellikleri iyi olup, oldukça hidrofildirler.

3. Dekstran: α -1-6 bağlı glikoz birimlerinden oluşmuş bir polisakkarittir. Epiklorohidrin ile çapraz-bağ yaparak matriks olarak kullanılabilir, ancak asit hidrolizine karşı selüloz matrikslere oranla daha duyarlıdır. Dekstran, pH 12' ye kadar kararlı ve hidrofildir. Dekstran temelli matriksin ticari örneğini ise Sephadex oluşturur.

4. Poliakrilamid: Akrilamidin *N,N'*-metilen-bisakrilamid ile çapraz bağlanmasıyla oluşan bir polimerdir. pH 2-11 aralığında kararlı olan akrilamid matriksin ticari örneğini ise Bio-Gel P oluşturur.

5. Polistiren: Stirenin divinilbenzenle çapraz-bağlanmasıyla oluşan bir polimerdir (Şekil 2.15.). Polistiren matriksler, bütün pH aralıklarında kararlıdır. Jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografilerinde polistiren matriksler çoğunlukla kullanılırlar. Hidrofilik özellikleri ise diğer matrikslere oranla nispeten düşüktür.



Şekil 2.15. Polistiren/divinil benzen polimerinden oluşturulmuş küresel matriksin ışık mikroskopundaki görüntüsü [5].

6. Silika: Tipik bir adsorbent olan ve ortosilisik asitten oluşturulan silika, polimerik bir materyaldir. Silikanın yüzeyinde bulunan silanol (Si-OH) grupları ise bu polimere hidrofilik özellik kazandırır. Hafif asidik olan bu gruplar, analit veya elüentin polar fonksiyonel grupları ile etkileşir. Silikanın farklı ticari preparasyonlarında farklı topolojilerde (düzenlemelerde) bulunan bu silanol grupları, grupların farklı ayrıştırma özelliklerine sahip olmasını sağlar. Triklorometilsilan ile muamele edilerek fazla silanol grupları uzaklaştırılabilir. Silika matriksler ise pH 3-8 aralığında kararlıdır. Silika matrikslere oldukça benzeyen bir diğer materyal ise 'gözenekli cam' dır. Gözenekli camın gözenek büyüklükleri ise kontrollü olarak ayarlanabilmektedir. Gözenekli cam matriksler kimyasal olarak inerttir, fakat silika matriksler gibi pH 8' in üzerinde çözünme eğilimindedirler [5].

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde dört ana başlık halinde; tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve uygulanan analiz yöntemleri hakkında bilgiler sunulmuştur. Birinci kısımda, çalışılacak olan virüs antijeni numunelerinin (üretim aşamaları dahil) hazırlanmasından söz edilmiştir. İkinci ve üçüncü kısımlarda, HPLC ve FPLC cihazlarında deney metodunun geliştirilmesine yönelik çalışmalar ve yapılan deneyler hakkında açıklamalar yer almıştır. Dördüncü kısımda ise virüs antijeni numunelerine ve deneylerde toplanan numunelere uygulanan testler açıklanmıştır.

3.1. Deneylerde Kullanılacak Virüs Antijeni Numunelerinin Hazırlanması

Şap virüsünün üretilmesi herhangi bir laboratuvar ortamında yapılamamaktadır. Canlı virüs ile çalışmak için biyogüvenlik seviyesi en az üç (BSL 3) olan laboratuvar ortamı gereklidir. Ayrıca Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı yetkili mercilerinden izin alınması gerekmektedir. Deneylerde kullanılan şap virüsü antijen numuneleri Şap Enstitüsü Müdürlüğü Virüs Kültürü Laboratuvarında (VKL) üretilmiş inaktif antijenlerdir. Bu nedenle Enstitü dışında çalışılmasında herhangi bir sakınca bulunmamaktadır. Ayrıca tez kapsamında yapılan çalışmalar Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nün bilgisi dahilindedir.

Bu kısımda deneylerde kullanılan numune gruplarından bir tanesinin (PEGO 13/06) üretim süreci örnek olarak açıklanacaktır. Diğer grupların üretim süreçleri de açıklananla aynı şekilde olmaktadır.

3.1.1. Şap virüsünün üretilmesi

Virüs üretiminde konak hücre olarak BHK 21 Ankara 73 M13 S8 hücresi kullanılmıştır. Enstitü Hücre Kültürü Laboratuvarında (HKL) üretilen hücre kültürlerinden alınan uygun sayıda hücre santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu hücreler Virüs Kültürü Laboratuvarında, 6M virüs vasatıyla karıştırılarak mililitrede $1,7 \times 10^6$ adet hücre olacak şekilde ayarlanmış ve her biri 3.000 L hacminde olan önceden steril edilmiş 2 adet biyoreaktöre toplam hacim yaklaşık 5.600 L olacak şekilde transfer edilmiştir. Biyoreaktörlere alınan hücre kültürüne önceden hazırlanmış O₁ Manisa tipi (O TUR/07) tohum virüs 0,04 MOI (Multiplicity of infection,

virüs/hücre) oranında eklenerek virüs kültürüne başlanmıştır. MOI Eşitlik 3.1. yardımıyla hesaplanmıştır.

$$MOI = \frac{\text{Virüs inokülasyon hacmi (mL)} \times 10^{ET} \left(\frac{\text{virüs}}{\text{mL}}\right)}{\text{Çalışma hacmi (mL)} \times \text{Hücre derişimi} \left(\frac{\text{hücre}}{\text{mL}}\right)} \quad (3.1.)$$

ET : Enfektif titre (\log_{10} PFU/mL) (Bölüm 3.4.4'te ayrıntılı olarak açıklanmıştır).

Virüs kültürü toplamda yaklaşık 24 saat devam etmiştir. Kültürün sonlarına doğru her üç saatte bir biyoreaktörden numuneler alınarak virüs üremesinin göstergesi olan CPE (Cytopathological Effect) oluşumu mikroskopla incelenmiştir. 22-24 saatlik kültür süresi sonunda, hücrelerin % 90-95'inde CPE oluşumu görüldüğünden kültür sonlandırılmıştır. Virüs kültürünün sonunda Enstitüde yapılan 146 S testi sonucuna göre mililitrede 1,2 μg O₁ Manisa tipi virüs elde edilmiştir. Daha sonra bu virüs, önceden buhar ile sterilize edilmiş, aşağıda belirtilen filtrelerden sıra ile süzölmüştür.

- 1- Paslanmaz çelik 500 μm kaba filtre
- 2- Depth filtre 15 μm (Milipore)
- 3- Depth filtre 1 μm (Milipore)
- 4- Seluloz asetat membran filtre 0,45 μm + 0,2 μm birleşik (Sartorius)

Filtrasyon işlemine tabi tutulan virüs kültürü her biri 3.000 L hacminde olan önceden steril edilmiş 1. inaktivasyon tanklarına aktarılmıştır.

3.1.2. Şap virüsünün inaktivasyonu

Virüs kültürünün inaktivasyon işleminde BEI (Binary ethylenimine) kimyasalı kullanılmıştır [49]. BEI hazırlanırken BEA (binary ethylenamin, Merck) ve indikatör olarak sodyum hidroksit (NaOH, Merck) ile birlikte β -Naft viyolet (Alfa Johanson Maxxhey) kullanılmıştır. Hazırlanan 168 L BEI çözeltisi filtre edildikten sonra 1. inaktivasyon tanklarında bulunan virüs kültürüne eklenmiştir. Toplam 24 saat süren inaktivasyon işleminin ilk 12 saati Virüs Kültürü Laboratuvarında bulunan 1. inaktivasyon tanklarında, ikinci 12 saati de Aşı Hazırlama ve Taksim

Laboratuvarında bulunan 2. inaktivasyon tanklarında gerçekleşmiştir. İnaktivasyon süreci sonunda yapılan testlerde virüsün inaktivasyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir. İnaktivasyon için kullanılan BEI' nin aktivitesini sonlandırmak için sodyum tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck) ilave edilmiştir. Yapılan 146 S testi sonucuna göre mililitrede 1,42 μg inaktif antijen olduğu anlaşılmıştır. İnaktivasyonu gerçekleştirilen virüs antijeni, selüloz asetat membranlı 0,2 μm steril filtreden (Sartorius) geçirilerek steril bir şekilde her biri 3.000 L hacminde olan depo tanklarına deriştirme işlemi yapılmak üzere transfer edilmiştir.

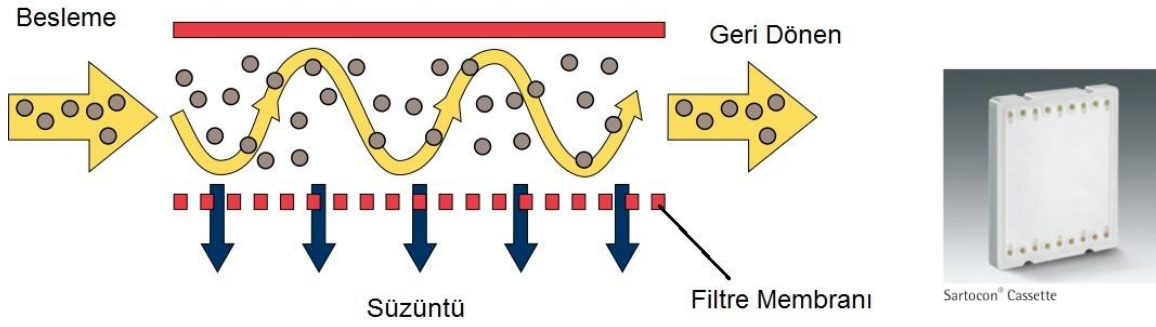
3.1.3. Virüs antijeninin deriştirme işlemi

Şap Enstitüsünde deriştirme işlemi çapraz akışlı (cross flow) ultrafiltrasyon işlemi ile yapılmaktadır. Bu işlemde, Sartoflow-40 (SF-40) model deriştirme (konsantrasyon) cihazı (Sartorius) kullanılmaktadır. Şekil 3.1.'de gösterilen çapraz akış sistemi ve aşağıda tipi ve adedi belirtilen çapraz akış filtre kasetleri ile 5.600 L inaktif virüs antijeni 28 kez deriştirilerek 200 litreye düşürülmüştür. Bu işlem sonunda yapılan testlerde başlangıç 146 S virüs antijeni değeri 1,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iken derişim işleminden sonra bu değer 49,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olmuş, Lowry yöntemi ile yapılan tayin sonunda toplam protein miktarı da 26.233 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur. 28 kez yapılan derişim işlemi sonunda teorik olarak 39,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olması gereken 146 S miktarı 49,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak ölçülmüştür. Bunun nedeninin Enstitü'de 146 S testi olarak adlandırılan sukroz gradient testinin (Bölüm 3.4.1.' de ayrıntılı olarak açıklanmıştır) uygulanmasındaki sıkıntılardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kullanılan çapraz akış sistemin kaset bilgileri aşağıdaki gibidir.

- 40 adet Ultrafiltrasyon Sartocon Kaset (Lot No: 3021467907E-SG, Sartorius)
- Polyether Sulfon (PESU) membran
- Nominal molekül ağırlığı cut off: 300 kDalton
- Filtrasyon alanı 0,7 m^2/kaset

Deriştirme işlemi sonucunda elde edilen 200 L derişik inaktif O tipi antijen (SOV-16) steril bir şekilde 300 L hacminde antijen stok tankına alınarak PEG (Polietilen Glikol) ile saflaştırılmak üzere + 4°C de soğuk odada saklanmıştır.



Şekil 3.1. Çapraz akış filtrasyon sistemi ve filtre kaseti

3.1.4. Antijenin polietilen glikol (PEG) ile saflaştırılması

PEG işlemi Enstitü'de polietilen glikol 6000 (PEG 6000, 0Z007852 lot numaralı, AppliChem) ile yapılmaktadır. Önceden deriştirilme işlemi yapılmış O₁ Manisa Şap Virüsü antijenleri (Her biri 200 L hacminde olan, yukarıda üretimi anlatılan SOV-16 ile birlikte SOV-17 ve SOV18 kültürleri) PEG 6000 ile muamele edilmiştir [50, 51]. İşlem neticesinde başlangıç toplam protein miktarı 17.935 µg/mL iken saflaştırma sonunda 8.375 µg/mL değerine getirilmiştir. Elde edilen Şap Virüsü antijeninin 146 S değeri de 57,52 µg/mL olarak ölçülmüştür. Saflaştırılmış O₁ Manisa Şap Virüsü antijeni PEGO-13/06 olarak adlandırılmıştır.

3.2. HPLC ile Nucleosil C18 Kolonunda Yapılan Deneyler

Yapılan ilk deneyler Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na ait biyomalzeme laboratuvarlarında bulunan Dionex Ultimate marka sıvı kromatografi cihazında, halihazırda mevcut olan Nucleosil C18 kolonu ile yapılmıştır. Bu deneyler genel bir fikir edinmek amacıyla yapılmıştır. Şap virüsü antijeni numuneleri C18 kolonunda aşağıda belirtilen deney koşullarında yürütülmüştür.

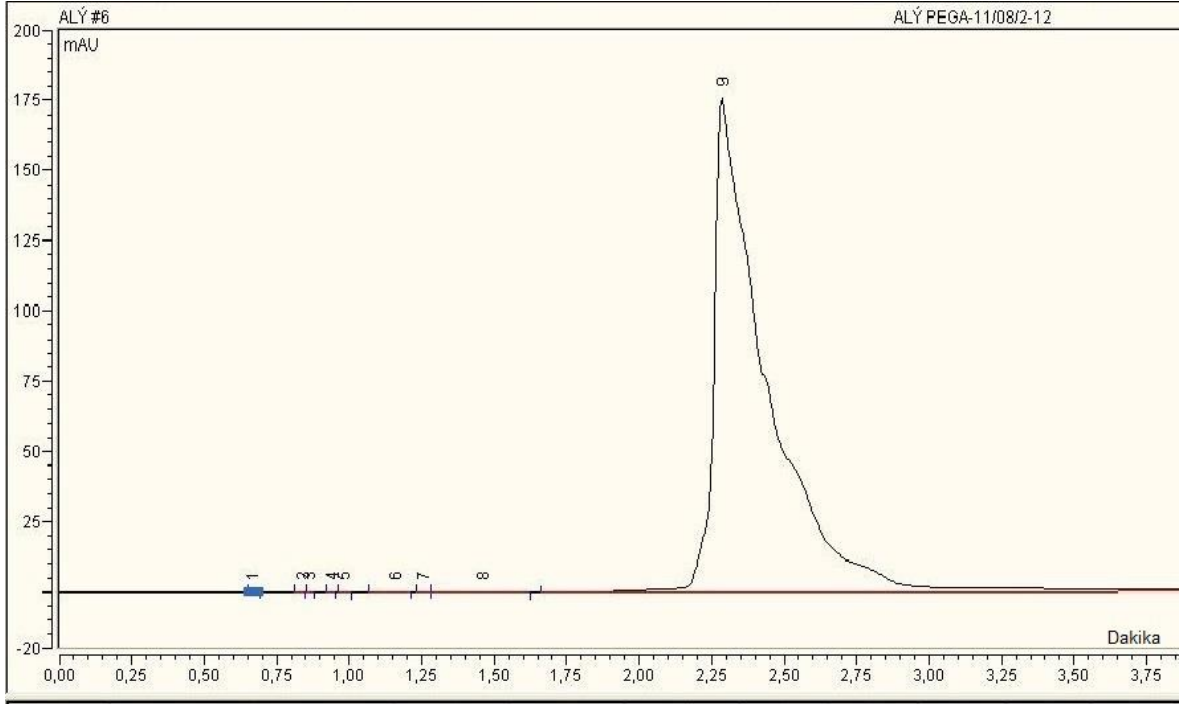
Deney Koşulları:

Akış Hızı : 1 mL/dk

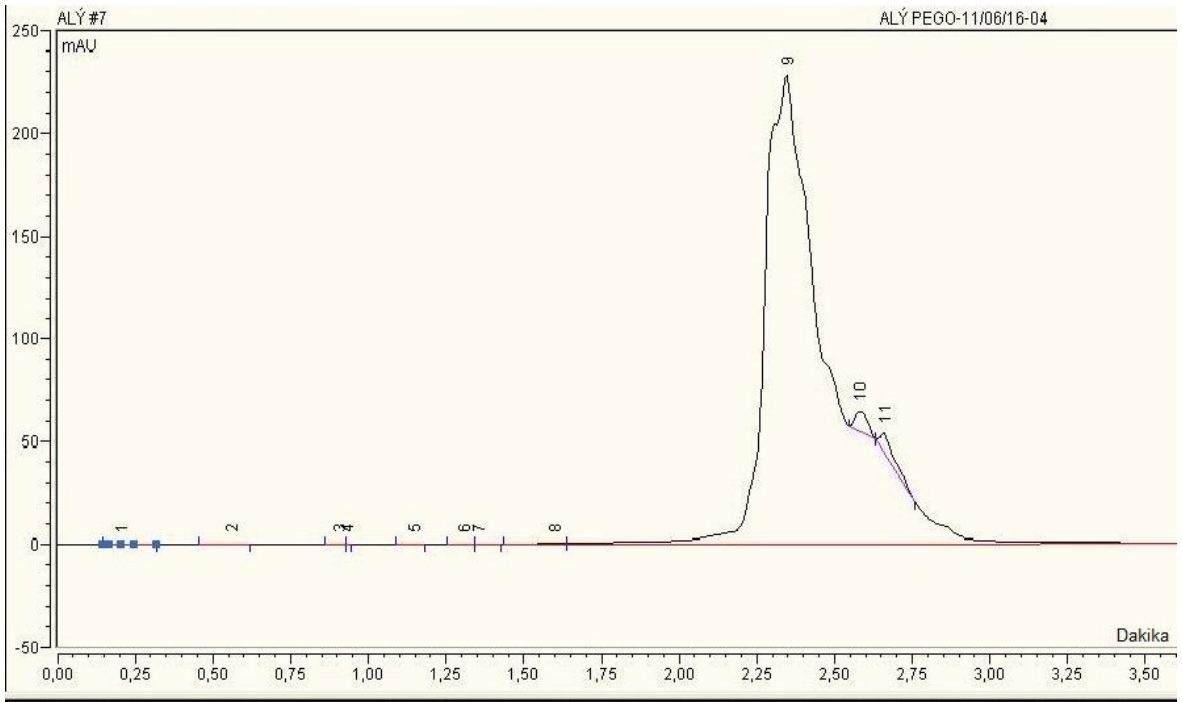
Numune Hacmi : 20 µL

Dedektör : UV (280 nm)

Mobil Faz : %80 Asetonitril + %20 Su



Şekil 3.3. İkinci numune kromatogramı (A tipi, (PEGA-11/08) 146 S değeri 35,3 µg/mL)



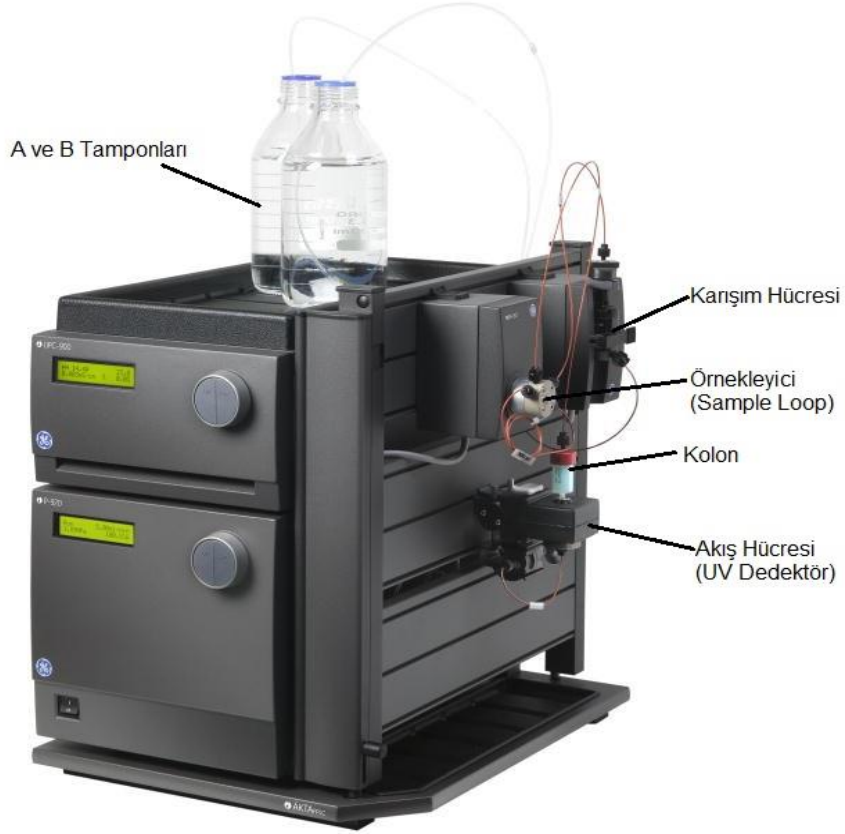
Şekil 3.4. Üçüncü numune kromatogramı (O tipi, (PEGO-11/06) 146 S değeri 15,3 µg/mL)

Yapılan ilk deneyde elde edilen kromatogramdaki (Şekil 3.2.) iki adet pikin sırasıyla konakçı hücre DNA' sı ve 146 S partikülü pikleri olabileceği düşünülmüştür. İkinci ve üçüncü deneylerde (Şekil 3.3., Şekil 3.4.) elde edilen kromatogramlarda da 2,3'cü dakikada pikler görülmüştür. Numunelerin 146 S ve toplam protein miktarına göre piklerin şiddeti anlamlı bir şekilde değişmiştir. Birinci deney kromatogramında görülen iki pik sadece üçüncü deney kromatogramında (Şekil 3.4.) görülmüştür. İkinci deney kromatogramında (Şekil 3.3.) iki pik net görülmemekle birlikte girişim yapmış olabilecekleri de düşünülmüştür. Birinci deney kromatogramında olduğu gibi bu piklerin konakçı hücre DNA'sı ve 146 S partikülü pikleri olabileceği kanaatine varılmıştır. Özdural ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da benzer yorumlar yapılmıştır [52]. Tüm bu deneyler neticesinde genel olarak ilk piklerin 2,3 'cü dakikada görülmesi anlamlıdır ve 146 S partikülü piki olması muhtemeldir.

Bu aşamadan sonra yapılan deneylerde, çalışmaya esas olan iyon değişim kromatografisi yöntemi ile çalışılmıştır. Bunun için satın alınan ticari iyon değişim kolonları kullanılmıştır. Bu kolonların destek materyali %6 güçlü çapraz bağlı küresel "agaroz"dur ve güçlü bir anyonik yapıya sahiptir, ticari olarak Q Sepharose XL® (GE Healthcare) olarak adlandırılmaktadır.

3.3. FPLC Cihazında Q Sepharose XL Kolonları ile Yapılan Deneyler

Çalışmanın bu aşaması ve sonrasında yapılan tüm deneyler Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında, Prof. Dr. Adil Denizli'nin laboratuvarlarında bulunan GE Healthcare marka AKTAFPLC isimli sıvı kromatografi cihazında (Şekil 3.5.) yapılmıştır.



Şekil 3.5. Deneylerde kullanılan FPLC cihazı (AKTAFPLC, GE Healthcare)

Deneylerde ticari Q Sepharose XL kolonları kullanılmıştır. Bu kolonlar cihaz üreticisi firmadan (GE Healthcare) iki farklı tipte alınmıştır. Aşağıda kolonların özellikleri verilmiştir.

1- HiPrep Q XL 16/10 (Şekil 3.6.)

Kolon Matriksi	: %6 güçlü çapraz bağlı küresel agaroz
Ortalama partikül çapı	: 90 µm
Yatak hacmi	: 20 mL
Yatak yüksekliği	: 25 mm
Kolon iç çapı	: 16 mm
Kolon materyali	: Polipropilen
Akış hızı aralığı	: 1 – 5 mL/dk
Basınç limiti en çok	: 0,3 MPa, 3 bar

Çalışma pH aralığı	: 2 - 12
İyon değiştirici tipi	: güçlü anyon
Dolgu maddesi	: $-N^+(CH_3)_3$
Toplam iyonik kapasite	: 0,18 -0,26 (mmol Cl ⁻ /mL ortam)



Şekil 3.6. Deneylerde kullanılan HiPrep Q XL 16/10 kolonu (GE Healthcare)

2- HiTrap Q XL 5mL (Şekil 3.7.)

Kolon Matriksi	: %6 güçlü çapraz bağlı küresel agaroz
Ortalama partikül çapı	: 90 µm
Yatak hacmi	: 5 mL
Yatak yüksekliği	: 100 mm
Kolon iç çapı	: 16 mm
Kolon materyali	: Polipropilen
Akış hızı aralığı	: 2 – 10 mL/dk
Basınç limiti en çok	: 0,5 MPa, 5 bar
Çalışma pH aralığı	: 2 – 12
İyon değiştirici tipi	: güçlü anyon
Dolgu maddesi	: $-N^+(CH_3)_3$
Toplam iyonik kapasite	: 0,18 -0,26 (mmol Cl ⁻ /mL ortam)



Şekil 3.7. Deneylerde kullanılan HiTrap Q XL 5 mL kolonu (GE Healthcare)

Deneylerde kullanılan tüm tampon çözeltileri Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Vasat Hazırlama Laboratuvarında hazırlanmıştır. Tampon çözeltileri hazırlamada kullanılan kimyasallar, çözeltinin süzülmesinde kullanılan 0,2 µ filtre ve diğer malzemeler Enstitü tarafından karşılanmıştır. Çözelti hazırlamada kullanılan saf su, Enstitüde bulunan merkezi sistem deiyonize su olup, iletkenlik değeri 0,5 µS/cm dir. Hazırlanan tüm tampon çözeltilerde aynı lot kimyasal kullanılmıştır. Aşağıda kullanılan kimyasallar ve özellikleri listelenmiştir.

- 1- **Tris**: Tris[Hydroxymethyl]aminomethane, (lot numarası 128H1408, %99 saflıkta, SİGMA)
- 2- **NaCl** : Sodyum klorür, (lot numarası K43797400 235, Merck)
- 3- **HCl** : Hidroklorik asit, (lot numarası K35384014 546, Merck)
- 4- **NaOH** : Sodyum hidroksit, (lot numarası B0892382 312, Merck)
- 5- **Etanol**: C₂H₅OH (lot numarası K35091886 537, Merck)

Tampon çözeltilerin pH değeri kolonların kullanım kılavuzu direktiflerine uygun ve virüs antijenine zarar vermeyecek bir değer olan 7,5 civarına (±0.05) ayarlanmış olup, tüm deneylerde aynı değerinde çalışılmıştır. Tampon çözeltisi pH ayarlaması HCl ve NaOH kullanılarak yapılmıştır. Etanol çözeltisi %20 lik olarak hazırlanmış olup, cihaz temizliği ile kolonların yıkanması ve muhafazasında kullanılmıştır.

3.3.1 Q Sepharose XL kolonları ile yapılan deney metodunun belirlenmesi çalışmaları

FPLC cihazında Q Sepharose XL kolonları ile yapılacak çalışmalarda kullanılacak tamponların seçimi literatür bilgisi ışığında yapılmıştır [52,53]. Buna göre yürütücü tampon olarak 20 mM Tris (pH:7,5), elüent tamponu olarak da 20 mM Tris + 1 M NaCl (pH:7,5) kullanılmıştır. Ayrıca farklı derişimde ve pH değerinde tamponların denenmesine karar verilmiştir. Böylece aşağıda listelenen tamponlar hazırlanmıştır. FPLC cihazında yürütücü tampon "A tamponu", elüent tamponu "B tamponu" olarak adlandırılmıştır.

Çalışmalarda,

Kolon tipi olarak:

- HiTarp Q XL 5 mL
- HiPrep Q XL 16/10

A tamponu olarak:

- 20 mM Tris-HCl, pH:7,50
- 20 mM Tris-HCl, pH:7,00

B tamponu olarak

- 20 mM Tris-HCl + 0,5 M NaCl , pH:7,50
- 20 mM Tris-HCl + 0,5 M NaCl , pH:7,00
- 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl , pH:7,50
- 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl , pH:7,00
- 20 mM Tris-HCl + 2 M NaCl , pH:7,50

UV dedektörü dalga boyu olarak

- 280 nm dalga boyu
- 254 nm dalga boyu

Gradient tipi olarak:

- Lineer gradient elüsyon
- Basamaklı gradient elüsyon

kullanılmıştır.

Hazırlanan farklı tamponlar ile denemeler yapılmıştır. Yapılan denemelerde lineer gradient elüsyon yöntemi ile elüent tamponu oranı %0 B den %100 B' ye arttırılmış, basamaklı gradient elüsyon ile ise farklı B tamponu derişimleri uygulanmıştır. UV lambasının dalga boyu 280 nm ve 254 nm olarak değiştirilerek karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır.

3.3.2. HiPrep Q XL 16/10 kolonu ile yapılan deneyler

Bu aşamada yapılan deneyler HiPrep Q XL 16/10 kolonun yapılacak olan çalışmalardaki performansının belirlenmesi ve diğer kolona (HiTrap Q XL 5 mL) karşı avantaj ve dezavantajlarının tespiti için yapılmıştır.

3.3.2.1 O tipi antijen deneyleri

Şap Enstitüsü Müdürlüğü Aşı Hazırlama ve Taksim Laboratuvarından alınan O tipi (PEGO-12/05) inaktif virüs antijen numuneleri ile farklı iki günde 3 adet deney yapılmıştır. Bu deneylerden 2. ve 3. deney esnasında 146 S partikülü pikini belirlemek maksadıyla piklerin fraksiyonu toplanmıştır. Deney koşulları aşağıdaki gibidir.

Deney Koşulları:

Kolon	: HiPrep Q XL 16/10
Akış Hızı	: 2 mL/dk
Numune Hacmi	: 2 mL
Numune Tipi	: O tipi (PEGO-12/10)
A Tamponu	: 20 mM Tris-HCl, pH :7,50
B Tamponu	: 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH:7,50
Gradient	: Lineer Gradient
Dedektör	: UV(254 nm)

3.3.2.2 A tipi antijen deneyleri

Şap Enstitüsü Müdürlüğü Aşı Hazırlama ve Taksim Laboratuvarından alınan A tipi (PEGA-12/08) inaktif virüs antijen numuneleri ile 2 adet deney yapılmıştır. Bu deneylerden 2. deney esnasında 146 S partikülü piki belirlemek maksadıyla piklerin fraksiyonu toplanmıştır. Deney koşulları yukarıda belirtilen O tipi antijen deneyi ile aynı şekildedir.

3.3.3. HiTrap Q XL kolonu ile yapılan deneyler

Bu aşamadaki deneyler, elde edilen düzgün piklerden hangisinin 146 S partikülü içerdiğini tespit etmek maksadıyla yapılmıştır. Toplam 38 adet (20 adet O tipi, 18 adet A tipi) deney yapılmış olup RT-PCR, ELISA ve 146 S partikül testleri için fraksiyon toplanmıştır.

3.3.3.1. O tipi antijen deneyleri

Şap Enstitüsünden daha önceden alınarak +4 °C' da saklanan O tipi (PEGO-12/05) inaktif antijen numunesi kullanılmıştır. Metot belirleme deneylerinden ayrı olarak, kabul edilen metot ile 2 ayrı günde 4 adet deney yapılmıştır. Yapılan 2. ve 4. deneylerden 146 S pikini belirlemek için RT-PCR, ELISA ve mevcut 146 S testlerinde kullanılmak üzere fraksiyon toplanmıştır. Deneyler aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Deney Koşulları:

Kolon	: HiTrap Q XL 5 mL
Akış Hızı	: 2 mL/dk
Numune Hacmi	: 100 µL
Numune Tipi	: O tipi (PEGO-12/05)
A Tamponu	: 20 mM Tris-HCl, pH :7,50
B Tamponu	: 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH:7,50
Gradient	: Basamaklı Gradient
Dedektör	: UV(254 nm)

3.3.3.2. A tipi antijen deneyleri

Aynı şekilde Şap Enstitüsünden daha önceden alınarak +4 °C' da saklanan A tipi (PEGA-12/03) inaktif antijen numunesi kullanılmıştır. Aynı metot ile 2 ayrı günde 4 adet deney yapılmıştır. Yapılan 2. ve 4. deneylerden 146 S pikini belirlemek için RT-PCR, ELISA ve mevcut 146 S testlerinde kullanılmak üzere fraksiyon toplanmıştır. Deney koşulları O tipi antijen deneyleri ile aynı paralellikte gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Nükleaz enzimi ile muamele sonrası yapılan deneyler

Literatür bilgisi ışığında daha önceden alınarak +4 °C dolapta muhafaza edilen O ve A tipi (PEGO-12/05, PEGA-12/03) inaktif antijen aşağıda özellikleri belirtilen nükleaz enzimi ile muamele edilmiştir [52,4].

Nükleaz: Novagen/Benzonase marka, lot numarası D00128585, %90 saflıkta, 10.000 U (Unit)

Analizden 1 gün önce 4 adet O tipi, 4 adet A tipi antijen 1 mL'lik miktarlarda, tüplere taksim edilmiş, bu numunelerin 2 şer adedi (2 adet O tipi, 2 adet A tipi) Şap Enstitüsünde eş zamanlı 146 S testi yapılmak üzere ayrılmıştır. Yapılacak deney ve 146 S testlerde nükleaz enzim muamelesi yapılmayan numuneler ile de eş zamanlı çalışılmıştır.

Her bir numunede en fazla 10 µg/mL DNA olabileceği hesaplanmıştır. Numunelerin bozulma riski göz önüne alınarak inkübasyon sıcaklığı +4 °C olarak belirlenmiştir. Nükleaz ürün kataloğunda yazan değere göre bu sıcaklıkta 12 saat inkübasyon süresi ve 10 µg DNA için 625 U enzim miktarı hesaplanmıştır. Tris tamponu ile dilüe edilen enzim her bir tüpe 625 U gelecek şekilde ilave edilmiştir.

Kullanımdan arta kalan 5.000 U enzim daha yüksek dozajda da deneyler yapmak üzere dörde bölünerek 2 adet O tipi, 2 adet A tipi numunede kullanılmıştır. İki kattan fazla dozajda enzimle muamele edilen numuneler de 12 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Nükleaz enzimi çalışmaları için 3 ayrı günde toplam 20 adet deney yapılmıştır. 10 adet A tipi (PEGA-12/03), 10 adet O tipi (PEGO-12/05) inaktif antijenle çalışılmıştır. Bu çalışmalardan üçer deney (3 adet A tipi, 3 adet O tipi) karşılaştırma yapmak maksatlı enzimle muamele edilmemiş numunelerden oluşmuştur. Çalışmalarda uygulanan deney koşulları aşağıdaki gibidir.

Deney Koşulları:

Kolon : HiTrap Q XL 5 mL
Akış Hızı : 2 mL/dk
Numune Hacmi : 100 µL
Numune Tipi : O tipi (PEGO-12/05)/ A tipi (PEGA-12/03)

A Tamponu : 20 mM Tris-HCl, pH :7,50
B Tamponu : 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH:7,50
Gradient : Basamaklı Gradient
Dedektör : UV(254 nm)

3.3.5. Farklı antijen derişimlerinde yapılan deneyler

Bu aşamada, daha önceki yapılan deney ve fraksiyon analizleri neticesinde tespit edilen 146 S partikülü piki alanı ile Şap Enstitüsünde yapılan 146 S partikül testi sonuçlarının eşleştirmesi ve sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi için farklı derişimlerde ve farklı seri numuneler ile çalışılmıştır. Hatta farklı üretim aşamasındaki (örneğin deriştirme işlemi sonrası aşama) numunelerle de çalışmalar yapılmıştır. Aynı numune hacimce %100, %75, %50, %25 ve %12,5 derişimlerde olacak şekilde seyreltilerek deneyler yapılmıştır. Bu şekilde A ve O tipi antijenlerle, farklı derişimlerde çalışılmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Yapılan deneylerde kullanılan antijenler ve değerleri.

Antijen Tipi	Antijen Serisi	Top. Protein Miktarı (µg/mL)	146-S miktarı (µg/mL)
O	PEGO-12/05	6.355	17,6
O	PEGO-13/05	5.640	13,33
O	PEGO-13/06	8.335	24,60
O	PEGO-13/07	23.948	74,54
A	PEGA-12/03	5.880	14,16
A	PEGA-13/07	9.144	17,45
O	SOV24	14.213	11,62

Bu aşamada yedi farklı günde toplam 60 adet deney yapılmıştır. 15 adet A tipi antijen ve 45 adet O tipi antijen numunesi ile çalışılmıştır. Bu çalışmalarda deney koşullarındaki parametrelerden akış hızının artırılması ile (3 mL/dk, 5 mL/dk) her bir deney daha kısa sürede gerçekleşmiştir. Deney koşulları aşağıdaki gibidir

Deney Koşulları:

Kolon : HiTrap Q XL 5 mL
Akış Hızı : 2 mL/dk / 3 mL/dk / 5 mL /dk
Numune Hacmi : 100 µL
Numune Tipi : O tipi / A ipi
A Tamponu : 20 mM Tris-HCl, pH :7,50

B Tamponu : 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH:7,50
Gradient : Basamaklı Gradient
Dedektör : UV(254 nm)

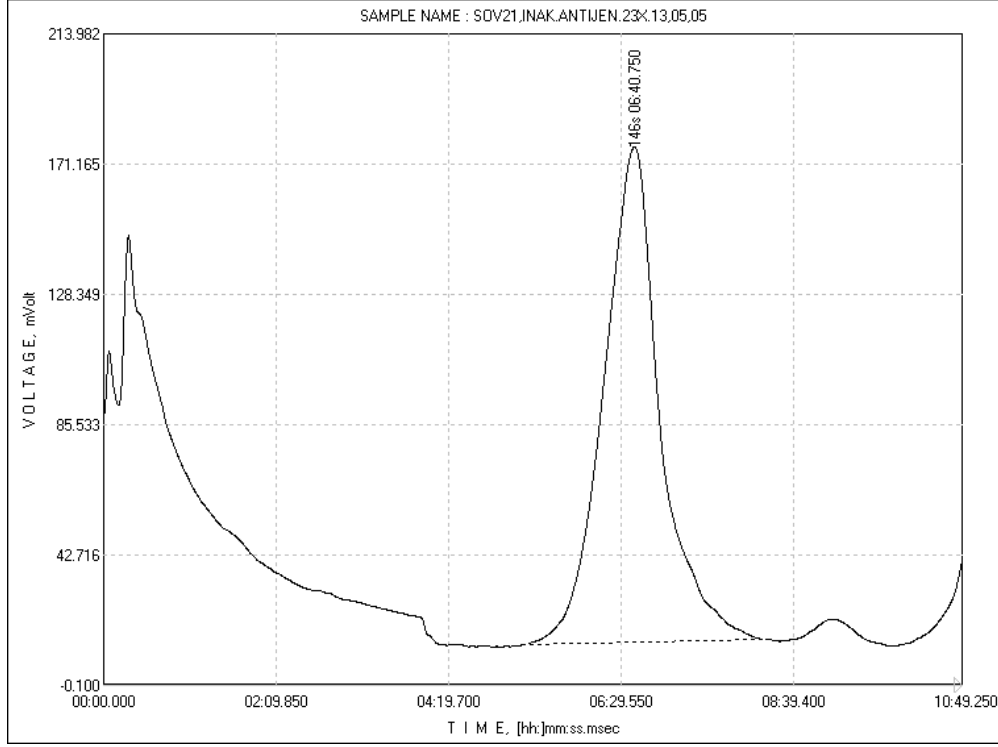
3.4. Uygulanan Analitik Teknikler

Çalışılan inaktif virüs antijeni numuneleri ve toplanan fraksiyonlar bazı testlere tabi tutulmuştur. Numune ve fraksiyonların 146 S partikül miktarı Şap Enstitüsü Müdürlüğü Üretim Aşaması Kontrol Laboratuvarı'nda, RT-PCR, ELISA ve CFT testleri de Şap Enstitüsü Müdürlüğü Seroloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.4.1. 146 S partikül miktarının belirlenmesi

Tam bir şap virüsü ultrasantrifüjlemede 146 S sedimentasyon sabiti değerine sahiptir. 146 S partikül miktarının belirlenmesi için Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde belirtilen sukroz yoğunluk gradient santrifügasyon yöntemi ve sürekli akış UV spektrofotometre metodu kullanılmıştır [54].

Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre merkezkaç kuvveti yardımı ile ayrılması prensibine dayanan bu yöntemde, gradient oluşturmada % 45'lik (ağırlık/hacim) ve % 15'lik (ağırlık/hacim) sakkaroz çözeltileri kullanılır. Tüp içerisinde oluşturulan sakkaroz gradientlerinin üzerine 0,5 mL virüs süspansiyonu eklenir ve ultrasantrifüjde 41.000 devir/dk ve +4°C'de 2 saat yapılan santrifüjleme işlemi sonucunda 146 S proteinlerinin belli bir gradient bölgesinde toplanması sağlanır. Santrifüj işleminden sonra tüpün altı delinir ve belirli bir hızda % 60'lık (ağırlık/hacim) sakkaroz çözeltisi ile gradientler optik okuyucuya gönderilir. Spektrofotometrede 254 nm dalga boyunda absorban ölçümleri gerçekleştirilir ve elde edilen pik alanından 146 S partikülü derişimi hesaplanır. Şekil 3.8.'de 146 S tayini için absorban grafiği örneği verilmiştir.



Şekil 3.8. 146 S tayini absorbans grafiği örneği.

3.4.2. RT-PCR testi

Çalışmalarda kullanılan antijen numunelerinde ve deneylerden toplanan fraksiyonlarda 146 S antijeni varlığının tespiti için Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde bulunan şap virüsünün tek aşamalı real time RT-PCR (qRT-PCR) ile teşhisi olarak belirtilen test yöntemi kullanılmıştır [55].

Bu yöntemde epitelyum, salya, veziküler sıvı, doku kültürü sıvısı, organ parçası, gibi virüs kaynaklarında bulunan virüse ait RNA tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürüldükten sonra, ısı döngüleyici cihaz ve diğer PCR reaktifleri ile çoğaltılıp elektroforez veya Real Time PCR cihazı yardımı ile görüntülenerek tespit edilmektedir.

Analizde Kullanılan ekipmanlar şunlardır:

- Değişik hacimlerde tek kanallı ve çok kanallı mikropipetler (10-1000µL)
- Tek kullanımlık pipet uçları (10-1000 µL)
- RNA ekstraksiyon robotu (ExiPrep™ 16 Dx, Bioneer)
- PCR tüpleri (0.2 mL lik)
- Thermal Cycler (Exicycler™ 96, Bioneer)
- Real time Thermal Cycler (AccuPower® Dual-HotStart™, Bioneer)
- Spin santrifüj
- Masaüstü soğutmalı santrifüj

RNA ekstraksiyonu: İşlem kit (ExiPrep™ Viral RNA Kit Kat.no:K-4473, Bioneer) talimatına uygun olarak yapılır. Elde edilen RNA, test yapılana kadar kısa süreli beklemler için -20 °C’de, uzun süre beklemler için -85°C’de stoklanır.

Tek aşamalı Real time RT-PCR testi : Primer ve prob lar laboratuvara ilk kez geldiğinde 100 pmol’lük ana stoklar halinde sulandırılır ve -40°C de saklanır. Kullanılacağı zaman 10 pmol lük çalışma çözeltilerinden, primer karışımları hazırlanır. Bir tane Bioneer AccuPower Dualstar qRT-PCR premiksinden 4 numune için miks hazırlanır. Her premix içine 5 µL primer prob karışımı (2 µL 3DF Primer, 2 µL 3DR Primer, 1 µL Taqman Prob) ve 40µL DEPC su eklenir ve karıştırılır. Hazırlanan bu karışım toplam 45 µL olur. Bundan 0,2 mL lik 4 PCR tüpüne 11,25 µL dağıtılır. RNA ekstraksiyon odasından alınan RNA’lar ve temiz odada hazırlanan reaksiyon karışımı PCR birleşim odasındaki laminar kabine buz içinde getirilir. Her bir örnek için işaretlenmiş karışım içeren tüplere 1,25 µL aktarılır, kısa bir santrifüj yapılarak, real time PCR cihazına konulur. Cihaz aşağıda belirtilen program seçilerek talimata uygun olarak çalıştırılır.

45°C	15 dk	1 döngü
95°C	10 dk	1 döngü
95°C	5 sn	} 40 döngü
55°C	20 sn	
Tarama		

Sonuçların değerlendirilmesi: Ct (threshold cycle, döngü) değeri 35 veya daha küçük bulunan örnekler pozitif olarak değerlendirilir. Ct değeri 35-37 arasında olan örnekler için test tekrar edilir.

3.4.3. ELISA testi

Yapılan deneylerden toplanan fraksiyonlarda 146 S antijeni varlığının tespiti için kullanılan bir diğer yöntem de ELISA testidir. Bu test için Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü’nde belirtilen Şap hastalığı’nın antijen ELISA ile teşhisi yöntemi kullanılmıştır [56].

Test, şap virusu A, O, Asia 1 ve C tiplerine spesifik çeşitli anti-şap virusu monoklonal antikoları kombinasyonlarının kullanıldığı bir sandviç ELISA

yöntemidir. Test ayrıca tüm tiplere spesifik antikorlar kullandığından üniversal bir testtir. Şüpheli materyal (epiteliyal süspansiyon veya vezikül sıvısı) tip spesifik antikor ve şap virusu spesifik monoklonal antikor bağlanmış olan gözlere konulur. Antikor-antikor (Ag-Ab) kompleksinin oluşabilmesi için optimum şartlarda belirli bir süre tutulur. Ortama daha sonra HRPO ile konjuge edilmiş pan-FMDV antikoru ilave edilir. Test sonucunun görünür hale getirilebilmesi için konjugata uygun bir kromojen çözelti (TMB) ortama ilave edilerek renk oluşumu gözlenir. Sonuçlar ELISA okuyucusunda, OD değerlerine göre ölçülerek pozitif ve negatif olarak değerlendirilir.

3.4.4. Antijenik titrenin belirlenmesi (CFT)

Deneylerde toplanan fraksiyon numunelerinde 146 S varlığının araştırılması için yapılan diğer bir test CFT testidir. Bu testte 146 S partikülü antijenik titresini, Kolmer metodu esas alınarak Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde belirtilen mikro-komplement fiksasyon (mComplement fixation test, mCFT) yöntemiyle belirlenmiştir [57].

Testin ilk basamağında 1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/6 ve 1/8 (hacim/hacim) şeklinde bir dizi seyreltmesi yapılan test numunesi, antikor ve komplement sistemiyle birlikte reaksiyona sokulur. Kısa süreli bir inkübasyondan sonra ikinci basamakta duyarlı hale getirilmiş eritrositler reaksiyon indikatörü olarak teste ilave edilir. Eğer test numunesi antijen içeriyorsa, antikor-antijen kompleksi şekillenerek komplement bu komplekse bağlanır. Inkübasyon sonunda ortamda komplement kalmayacağından teste eklenen eritrositler hemoliz olmaz ve düğme şeklinde tüplerin veya tek kullanımlık tablet gözlerinin alt kısmına çöker. Test numunesi antijen içermiyorsa antikor ile kompleks oluşmadığı için komplement kompleks yapıya bağlanamaz ve teste ilave edilen eritrositlerin erimesine (liziz) neden olur.

mCFT sonuçları, duyarlı hale getirilmiş eritrositlerin % liziz olma oranlarına göre aşağıdaki şekilde değerlendirilir;

Düğme oluşumu % 100, reaktif renksiz ise	+4
Düğme oluşumu % 75, reaktif hafif kırmızı ise	+3
Düğme oluşumu % 50, reaktif açık kırmızı ise	+2
Düğme oluşumu yok, reaktif koyu kırmızı ve berrak ise	+1

3.4.5. Toplam protein miktarının belirlenmesi

Çalışmaların yapıldığı tüm numunelerin toplam protein miktarları, Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde belirtilen BCA (Bicinchoninic acid) protein tayin yöntemi ile belirlenmiştir [58].

Tayin metodu, bazik ortamda Cu^{2+} kationunun Cu^+ kationuna proteinler tarafından indirgenmesi metodu ile bisinkoninik asit içeren reaktif karışımlarını birlikte kullanarak Cu^+ kationunun kolorimetrik olarak belirlenmesi esasına dayanır. Bu yöntemde iki molekül BCA ile bir Cu^+ kationu mor renkli şelat ürününü oluşturur. Suda çözünebilen bu kompleks yapı, 562 nm dalga boyunda 20-2000 $\mu\text{g/mL}$ protein derişimi tayin aralığında derişimle doğru orantılı olarak absorbans verir.

Tayinde, derişimi bilinen protein stok çözeltisinden seyreltmelerle hazırlanan standart çözeltilerle protein derişimi bilinmeyen numuneler birlikte test edilmekte ve kalibrasyon eğrisi çizilerek numunedeki toplam protein derişimi bulunmaktadır. Büyük ve küçük ölçekli iki tayin yöntemi bulunmaktadır. Büyük ölçekli yöntemde test tüplerine 0,1 mL numune ve 2,0 mL reaktif çözeltisi, küçük ölçekli yöntemde ise daha küçük test kaplarına 25 μL numune ve 200 μL reaktif çözeltisi konur.

Reaktif çözeltisi, 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, bisinkoninik asit ve sodyum tartarat içeren birinci reaktiften 50 kısım alınarak 1 kısım % 4'lük (ağırlık/hacim) bakır sülfat çözeltisi ile karıştırılması ile hazırlanır. Karıştırma esnasında ortaya çıkan bulanıklık hafif bir çalkalama ile giderilir ve berrak yeşil renkte reaktif çözeltisi elde edilir.

Küçük ölçekli toplam protein analizinde standart BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltisinden ve protein derişimi bilinmeyen numuneden 25'er μL küçük test kabı tableti gözüne konur ve üzerine 200 μL reaktif çözeltisinden ilave edilerek küçük test kabı tableti çalkalayıcısında 30 saniye çalkalanır. Üzeri kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılan küçük test kabı tableti soğutularak oda sıcaklığına getirilir. Bu tablet gözleri mikrotabllet okuyucuda 562 nm dalga boyunda okutulur.

Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'de çalışmalarda yapılan analizlere ait koşullar ve açıklamalara yer verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada yapılan 1. aşama deneyler listesi

DENEY LİSTESİ - 1								
Gün	Den. No	Deneş Kodu	Kolon Tipi	Antijen Serisi	146 S µg/mL	Top. Pro. µg/mL	Fraks.	Açıklama
1. GÜN	1	1001	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/08	26	32.500	-	Başlangıç Deneyleri
	2	1002	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/08	26	32.500	-	Başlangıç Deneyleri
	3	1003	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/10	28	9.870	-	Başlangıç Deneyleri
	4	1004	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/10	28	9.870	-	Başlangıç Deneyleri
2. GÜN	5	1005	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	17,6	5.098	-	Metot Belirleme Den.
	6	1006	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	17,6	5.098	-	Metot Belirleme Den.
	7	1007	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419	-	Metot Belirleme Den.
	8	1008	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419	Evèt	Metot Belirleme Den.
	9	1009	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419	-	Metot Belirleme Den.
	10	1010	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	17,6	5.098	Evèt	Metot Belirleme Den.
3. GÜN	11	3001	HiPrep Q XL 16/10	PEGO-12/05	17,6	5.098		O Tipi HiPrep Deneyi
	12	3002	HiPrep Q XL 16/10	PEGO-12/05	17,6	5.098	Evèt	O Tipi HiPrep Deneyi
	13	3003	HiPrep Q XL 16/10	PEGA-12/03	14,16	3.419		A Tipi HiPrep Deneyi
	14	3004	HiPrep Q XL 16/10	PEGA-12/03	14,16	3.419	Evèt	A Tipi HiPrep Deneyi
4. GÜN	15	4001	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	17,6	5.098		O Tipi HiTrap Deneyi
	16	4002	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	17,6	5.098	Evèt	O Tipi HiTrap Deneyi
	17	4003	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419		A Tipi HiTrap Deneyi
	18	4004	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419	Evèt	A Tipi HiTrap Deneyi
	19	4005	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419		A Tipi HiTrap Deneyi
5. GÜN	20	4007	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419		A Tipi HiTrap Deneyi
	21	4008	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	14,16	3.419	Evèt	A Tipi HiTrap Deneyi
	22	4009	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	17,6	5.098	Evèt	O Tipi HiTrap Deneyi
6. GÜN	23	4010	HiTrap Q XL 5 mL	A (146 S)	12,91	-	-	146 S testi fraksiyonu
	24	4011	HiTrap Q XL 5 mL	A (146 S)	12,91	-	-	146 S testi fraksiyonu
	25	4012	HiTrap Q XL 5 mL	O (146 S)	14,54	-	-	146 S testi fraksiyonu
	26	4015	HiTrap Q XL 5 mL	O (146 S)	14,54	-	-	146 S testi fraksiyonu
	27	4015	HiTrap Q XL 5 mL	O (146 S)	14,54	-		O Tipi HiTrap Deneyi
	28	3005	HiPrep Q XL 16/10	PEGO-12/05	17,6	5.098	Evèt	O Tipi HiPrep Deneyi
7. GÜN	29	4022	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,9	3.419	-	A tipi nükleaz Yok
	30	4023	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	12	5.098	-	O tipi Nükleaz Yok
	31	4024	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/06	9,6	5.098	-	O tipi Nükleaz Var
	32	4025	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/07	9,6	5.098	-	O tipi Nükleaz Var
	33	4026	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,1	3.419	-	A tipi Nükleaz Var
	34	4027	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,1	3.419	-	A tipi Nükleaz Var
8. GÜN	35	4028	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,1	3.419	-	A tipi Nükleaz Var
	36	4029	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,1	3.419	Evèt	A tipi Nükleaz Var
	37	4030	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/06	9,6	5.098	Evèt	O tipi Nükleaz Var
	38	4031	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/07	9,6	5.098	Evèt	O tipi Nükleaz Var
	39	4032	HiTrap Q XL 5 mL	O (146 S)	12	-	-	O 146 S Norm. Fraks.

	40	4033	HiTrap Q XL 5 mL	O (146 S)	9,6	-	-	O 146 S Nucl. Fraks.
	41	4034	HiTrap Q XL 5 mL	A (146 S)	3,9	-	-	A 146 S Norm. Fraks.
	42	4035	HiTrap Q XL 5 mL	A (146 S)	3,1	-	-	A 146 S Nucl. Fraks.
9. GÜN	43	4036	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,1	3.419	-	A tipi Nükleaz Var
	44	4037	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,1	3.419	Evet	A tipi Nükleaz Var
	45	4038	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/06	9,6	5.098	-	O tipi Nükleaz Var
	46	4039	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/07	9,6	5.098	Evet	O tipi Nükleaz Var
	47	4040	HiTrap Q XL 5 mL	PEGA-12/03	3,9	3.419	Evet	A tipi Nükleaz Yok
	48	4041	HiTrap Q XL 5 mL	PEGO-12/05	12	5.098	-	O tipi Nükleaz Yok

Çizelge 3.3. Çalışmada yapılan 2. aşama deneyler listesi

DENEY LİSTESİ - 2							
Gün	Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	146 S (µg/mL)	Top. Pro. (µg/mL)	Numune (hacimce) (%)	Açıklama
11. GÜN	49	5003	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	3 ml/dk akış hızı (metot 5)
	50	4047	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
	51	4048	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
	52	4049	PEGA-13/07	8,72	-	50	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
	53	4050	PEGA-13/07	4,36	-	25	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
12. GÜN	54	5004	PEGO-13/05	0,00	-	0	Farklı Numuneler (boş)
	55	5005	PEGO-13/05	13,33	5.640	100	Farklı Numuneler
	56	5006	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	Farklı Numuneler
	57	4051	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	Farklı Num. (metot 4 ile)
	58	6001	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	Farklı Num. (3 basamak Metot 6)
	59	7001	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	Farklı Num. (3 basamak Metot 7)
	60	7002	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	Farklı Num. (metot 7)
	61	5007	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	Farklı Num. (metot 5, fraksiyon top.)
	62	7003	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	(metot 7, yeni kolon, fraksiyon Top.)
13. GÜN	63	7004	PEGO-13/07	74,54	23.948	100	Farklı Num. (metot 7, yeni kolon)
	64	7005	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	Farklı Num. (metot 7, yeni kolon)
	65	8001	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	Fark. Num. (metot 8 Akış H.=5mL/dk)
	66	8002	PEGO-13/07	74,54	23.948	100	Farklı Num. (metot 8)
	67	8003	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	Farklı Num. (metot 8)
	68	8004	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	Farklı Num. (metot 8 , eski kolon)
	69	8005	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	Farklı Num. (metot 8, A tipi)
14. GÜN	70	8006	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	Farklı Kons. Den. (met. 8, Eski Kolon)
	71	8007	PEGO-13/06	12,30	-	50	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
	72	8008	PEGO-13/06	6,15	-	25	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
	73	8009	PEGO-13/06	6,15	-	25	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
	74	8010	PEGO-13/06	3,08	-	12,5	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
	75	8011	PEGO-13/06	18,45	-	75	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
	76	8012	PEGO-13/06	18,45	-	75	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
	77	8013	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
	78	8014	PEGO-13/06	12,30	-	50	Farklı. Kons. Den. (O Tipi)
15. GÜN	79	8015	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	Farklı Kons. Den. (met. 8, Eski Kolon)
	80	8016	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
	81	8017	PEGA-13/07	8,72	-	50	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
	82	8018	PEGA-13/07	4,36	-	25	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
	83	8019	PEGA-13/07	2,18	-	12,5	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
	84	8020	PEGA-13/07	13,08	-	75	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
	85	8021	PEGA-13/07	13,08	-	75	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
	86	8022	PEGA-13/07	8,72	-	50	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)

	87	8023	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
	88	8024	SOV24 (O)	5,81	-	50	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
	89	8025	SOV24 (O)	2,91	-	25	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
	90	8026	SOV24 (O)	1,45	-	12,5	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
	91	8027	SOV24 (O)	1,45	-	12,5	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
	92	8028	SOV24 (O)	5,81	-	50	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
	93	8029	SOV24 (O)	8,72	-	75	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
16. GÜN	94	8030	PEGO-13/05	3,33	-	25	Farklı Kons. Den. (met. 8, Eski Kolon)
	95	8031	PEGO-13/05	1,67	-	12,5	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	96	8032	PEGO-13/05	1,67	-	12,5	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	97	8033	PEGO-13/05	3,33	-	25	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	98	8034	PEGO-13/05	6,66	-	50	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	99	8035	PEGO-13/05	10,00	-	75	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	100	8036	PEGO-13/05	13,33	5640	100	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	101	8037	PEGO-13/05	13,33	5640	100	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	102	8038	PEGO-13/05	10,00	-	75	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 1)
	103	8039	PEGO-13/07	74,54	-	100	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 2)
	104	8040	PEGO-13/07	37,27	-	50	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 2)
	105	8041	PEGO-13/07	18,64	-	25	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 2)
	106	8042	PEGO-13/07	9,32	-	12,5	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 2)
	107	8043	PEGO-13/07	55,91	-	75	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 2)
	108	8044	PEGO-13/07	0,00	-	0	Farklı. Kons. D. (O Tipi farklı Num. 2)
17. GÜN	109	9001	PEGO-13/07	74,54	23948	100	Enjek. H: 0,5 mL, (O, metot 9, fraks.)
	110	9002	PEGO-13/07	0,00	-	0	Boş yükleme
	111	9003	PEGA-13/07	17,45	9144	100	Enjek. H: 0,5 mL, (A, metot 9, fraks.)
	112	9004	PEGA-13/07	0,00	-	0	Boş yükleme

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

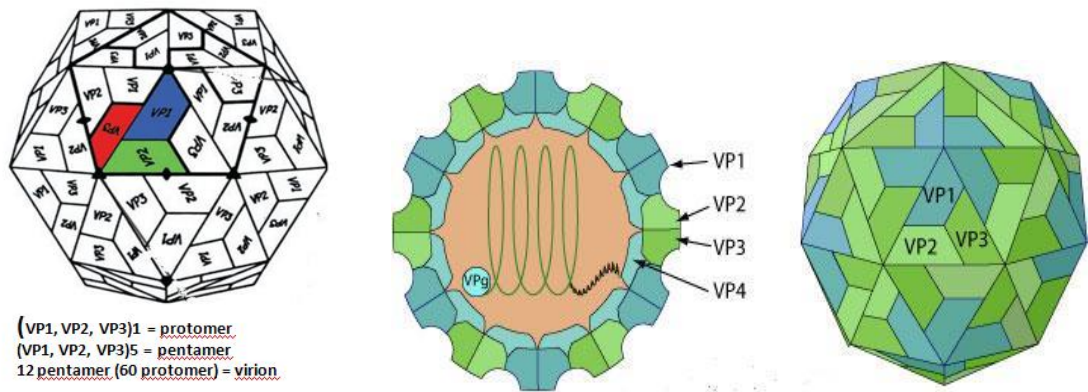
Bu bölümde, tez çalışmasında yapılan deney ve analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve tartışılması yer almaktadır. Öncelikle 146 S testine alternatif olarak seçilen kromatografik yöntem ve seçim nedenleri hakkında açıklamalar yer almıştır. Daha sonra bu kromatografik yöntem için deney metodunun belirlenmesi çalışmalarına değinilmiştir. İkinci bölümde deneylerden elde edilen piklerin analizleri ile 146 S antijen piki tespit çalışmaları açıklanmıştır. Sonraki bölümlerde de 146 S antijen miktarının tayini ve yöntemin doğrusallığı hakkındaki sonuçlardan söz edilmiştir.

4.1. Yöntem Seçimi ve Nedeni

Kromatografi yöntemi ile birbirinden ayrılması zor olan proteinler, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanılarak başarılı bir şekilde ayrılabilir. Aynı zamanda ayrılan bu proteinlerin nicel analizleri de yapılabilir. Kromatografik ayırma işlemi Bölüm-2.3.'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu çalışmada, Şap Enstitüsü'nde şap virüsü antijen miktarının tayininde kullanılan, uygulaması oldukça zor ve kullanıcı kaynaklı hata ihtimali yüksek olan "146 S testine" alternatif kromatografik bir test yöntemi araştırılmıştır. Literatür araştırmaları neticesinde Spitteler ve arkadaşlarının şap virüsü 146 S antijen miktarını jel filtrasyon (size exclusion) kromatografisi yöntemi ile FPLC cihazı kullanarak başarılı bir şekilde tespit ettikleri görülmüştür [4]. Tez çalışmasında farklı bir kromatografik yöntemin denenmesine karar verilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında virüslerin iyon değişim kromatografisi yöntemi ile etkin bir şekilde saflaştırıldığı görülmüştür. Eriksson ve arkadaşları Q Sepharose XL iyon değişim kolonu kullanarak adenovirüs saflaştırmasını hızlı ve etkin bir şekilde yapabilmişlerdir [59]. Özdural ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda iyon değişim kromatografisi yöntemi esaslı, konvansiyonel tanjant akış filtrasyonu ile akuple sürekli annular kromatografi sistemi tasarlanmıştır [52]. Araştırmacılar Q Sepharose XL materyalinin şap virüsü saflaştırılmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Agustin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada şap virüsünün saflaştırılmasında afinite kromatografisi yöntemi kullanmışlardır [60]. Ligant olarak heparin-ultrogel (A4R) hazır ticari kolonlar kullanmışlar ve tek basamakta yaptıkları saflaştırma işleminde yüksek verimler elde etmişlerdir [60]. Bu konuda

yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bilgilerden birisi de grip virüsü (human influenza virüs) aşısı üretim prosesinin antijen saflaştırılması işlemi basamaklarında iyon değişim kromatografisi yönteminin kullanılmasıdır [61].

şap virüsün fiziko-kimyasal özelliği incelendiğinde çoğu protein yapılarında ve virüslerde de olduğu gibi ortalama pH 7' de negatif yüklü bir iyonik yapıya sahip olduğu görölmektedir. Aşağıdaki çizelgede şap virüsünün yapısal proteinlerinin fiziko-kimyasal özellikleri verilmiştir (şekil 4.1., Çizelge 4.1.) [2].



şekil 4.1. şap virusu kapsit yapısı ve viral proteinlerinin şematik gösterimi.

Çizelge 4.1. şap virüsü yapısal proteinlerinin fiziko-kimyasal özellikleri

Protein Kodu	Bulunduğu Yer	Moleküler Ağırlığı(Da)	İzoelektrik Noktası
VP1	Dış yüzey	23.420	3,71
VP2	Dış yüzey	23.881	3,31
VP3	Dış yüzey	24.316	4,16
VP4	İç Yüzey	8.773	3,08

Literatür bilgileri ışığında şap virüsünün iyon değişim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılabileceği düşünölmüştür. Yöntem olarak iyon değişim kromatografisinin uygulanmasına karar verilmiştir. İzoelektrik noktasından da anlaşılacağı üzere pH 7- 7,5'da şap virüsü negatif bir iyonik yüke sahiptir. Bu durumda deneyler için kullanılacak iyon değişim materyalinin katyonik (+) yapıya sahip anyon değiştirici özellikte bir materyal olması gerekmektedir.

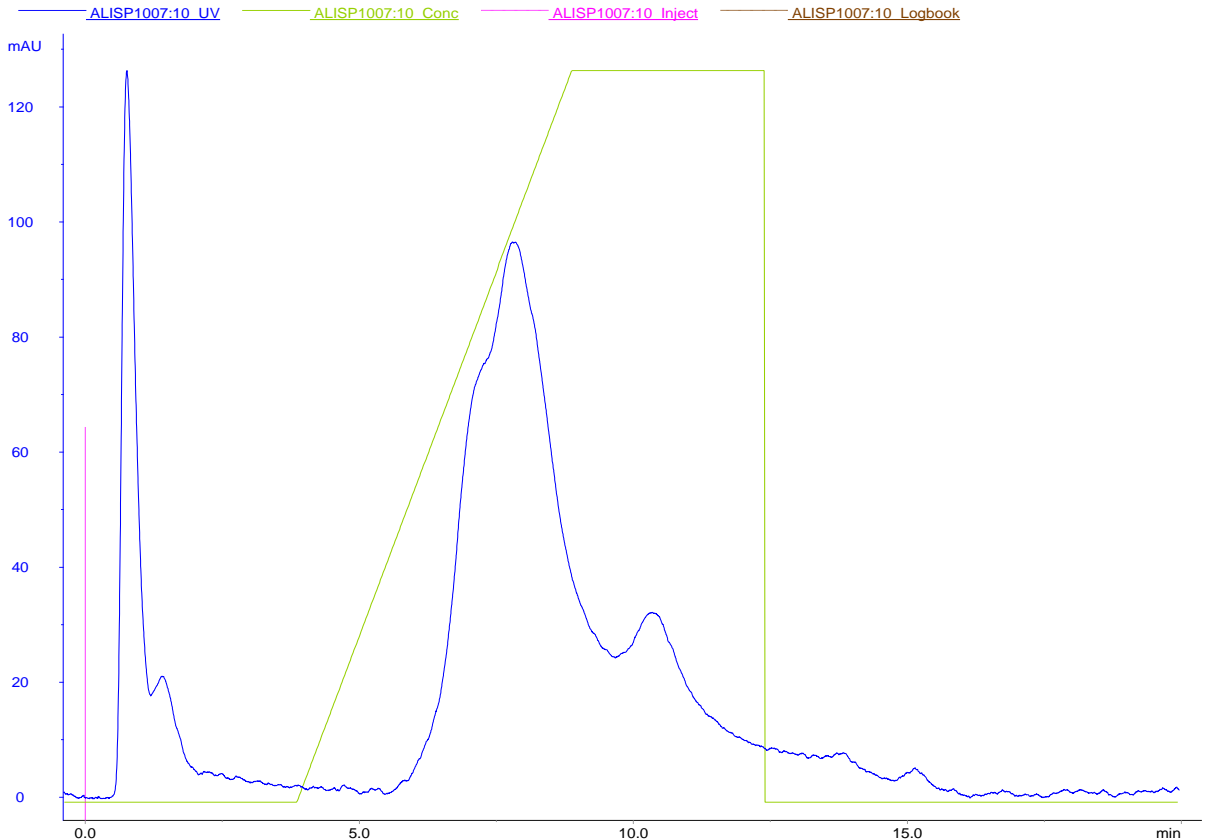
Çalışmalarda, daha hızlı olması ve düşük basınçlarda yüksek akış hızlarında çalışmaya imkan vermesinden dolayı FPLC (Fast protein liquid chromatography) cihazının kullanılması kararlaştırılmıştır. Kolon doldurulmasındaki (packing) zorluklar, bu işlemin ayrı bir aşama olması ve sonuçların da kolon doldurmadaki hatalardan etkilenmemesi için çalışmada hazır ticari kolonlar kullanılmıştır. Kolonların seçimi esnasında FPLC cihazı üretici firmanın (GE Healthcare) orijinal kolonları tercih edilmiştir, ve bu firmanın internet sitesindeki kolon seçim yazılımından faydalanılmıştır [62]. Çalışılacak numunenin özellikleri, çalışma hacmi, vb. bilgiler, yukarıda söz edilen literatür araştırmalarından faydalanılarak internet sitesindeki yazılıma girilmiş ve sonuç olarak iki tip katyonik matriks yapısına sahip anyon değiştirici kolon bulunmuştur. Bunlar “HiPrep Q Sepharose XL 16/10” (Şekil 3.6.) ve “HiTrap Q Sepharose XL 5 mL” (Şekil 3.7.) kolonlarıdır. Bu iki kolon arasındaki en belirgin fark kolon hacimleri ve boylarıdır. Her ikisi de aynı kimyasal yapıya sahiptirler. Diğer bir fark da, kolon hacimlerinin farklı oluşuna bağlı olarak numune yükleme hacimlerinin de farklı olmasıdır. HiPrep Q XL 16/10 kolonunun maksimum numune yükleme hacmi 2 mL, HiTrap Q XL 5 mL kolonununki ise 0,5 mL'dir.

4.1.1. Seçilen yöntem için metot belirlenmesi

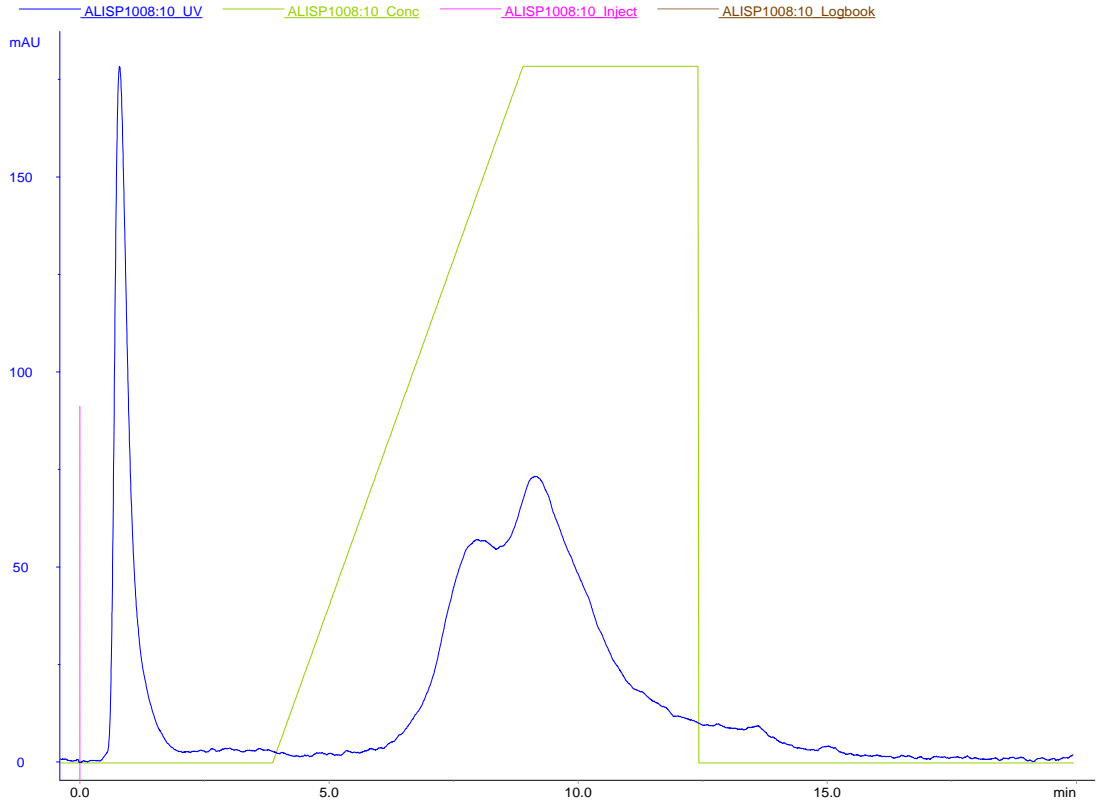
Metot belirleme çalışmalarında öncelikle literatür araştırmalarından elde edilen bilgiler değerlendirilmiştir. Özdural ve arkadaşlarının HPLC cihazında HiPrep Q XL 16/10 kolonu ile çalıştıkları görülmüştür. Yaptıkları deneylerde yürütücü tampon olarak 20 mM Tris-HCl (pH:7,05), elüent tamponu olarak da 20 mM Tris-HCl + 0,5 M NaCl (pH:6.99) kullanmışlardır [52]. Amerika Patent yayınlarından virüs saflaştırma metotları hakkındaki bir çalışmada, iyon değişim yöntemi ile adenovirüs saflaştırılmış ve Q Sepharose XL kolonları kullanılmıştır. Yürütücü tampon olarak 50 mM Tris (pH:7,5), elüent tamponu olarak da 20 mM Tris + 1 M NaCl (pH:7,5) kullanılmıştır [53]. Başka bir çalışmada Eriksson ve arkadaşları adenovirüs saflaştırmasında HiPrep Q XL 16/10 kolonu kullanmışlardır. Yürütücü tampon olarak %5 gliserin ilave edilmiş 50 mM Tris/HCl, pH: 8, elüent tamponu olarak da %5 gliserin ilave edilmiş 50 mM Tris/HCl + 1 M NaCl, pH:8 kullanılmıştır [59]. Söz konusu literatür bilgileri ışığında farklı derişimde ve pH değerinde tamponların denenmesine karar verilmiştir. “Bölüm 3.3.1.” de açıklandığı üzere farklı tampon bileşimlerinde

deneyler yapılmıştır. A tipi antijen numunesi için farklı tamponlar kullanıldığında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. Bu çalışmalardaki deney koşulları da aşağıda açıklanmıştır.

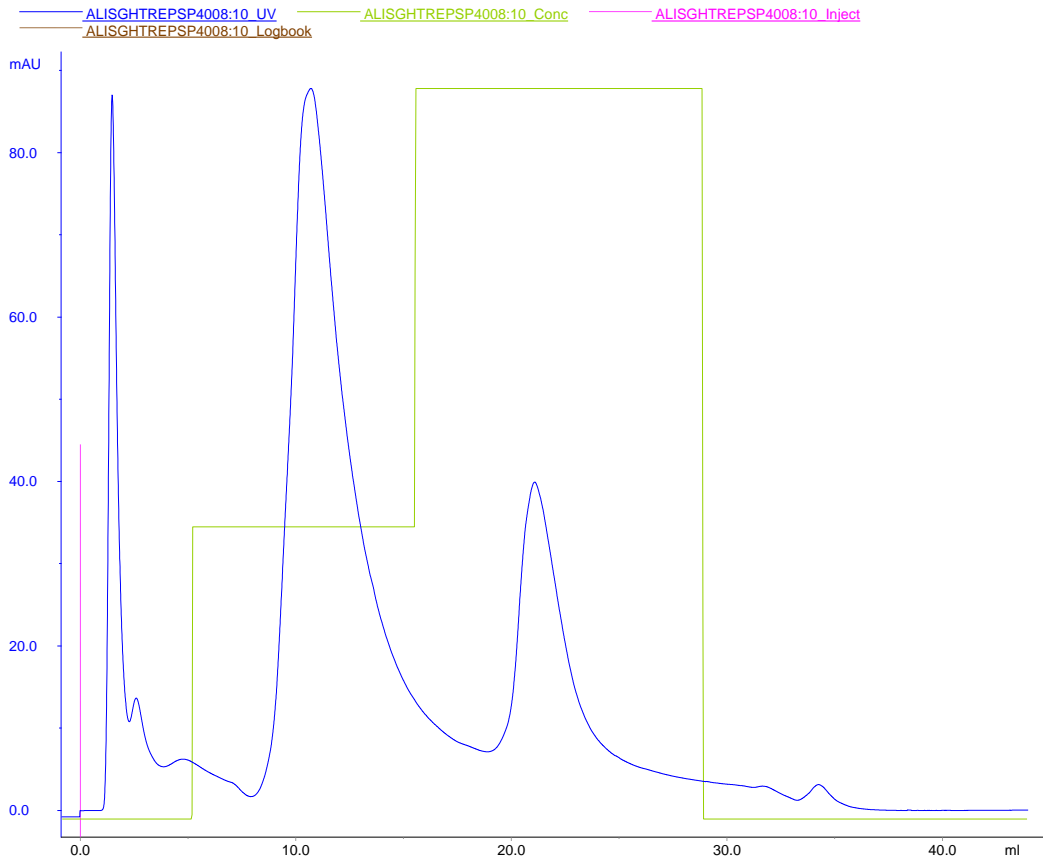
Kolon : HiTrap Q XL 5 mL / HiPrep Q XL 16/10
Akış Hızı : 2 mL/dk
Numune Hacmi : 100 µL(HiTrap Q XL 5 mL) / 2 mL (HiPrep Q XL 16/10)
Numune Tipi : A tipi (PEGA-12/08)
A Tamponu : 20 mM Tris-HCl, pH :7,50
B Tamponu : 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH:7,50
B Tamponu : 20 mM Tris-HCl + 0,5 M NaCl, pH:7,50
Gradient : Lineer gradient, 5 dakikada %0 B den %100 B ye /
Basamaklı gradient
Dedektör : UV(280 nm) / UV(254 nm)



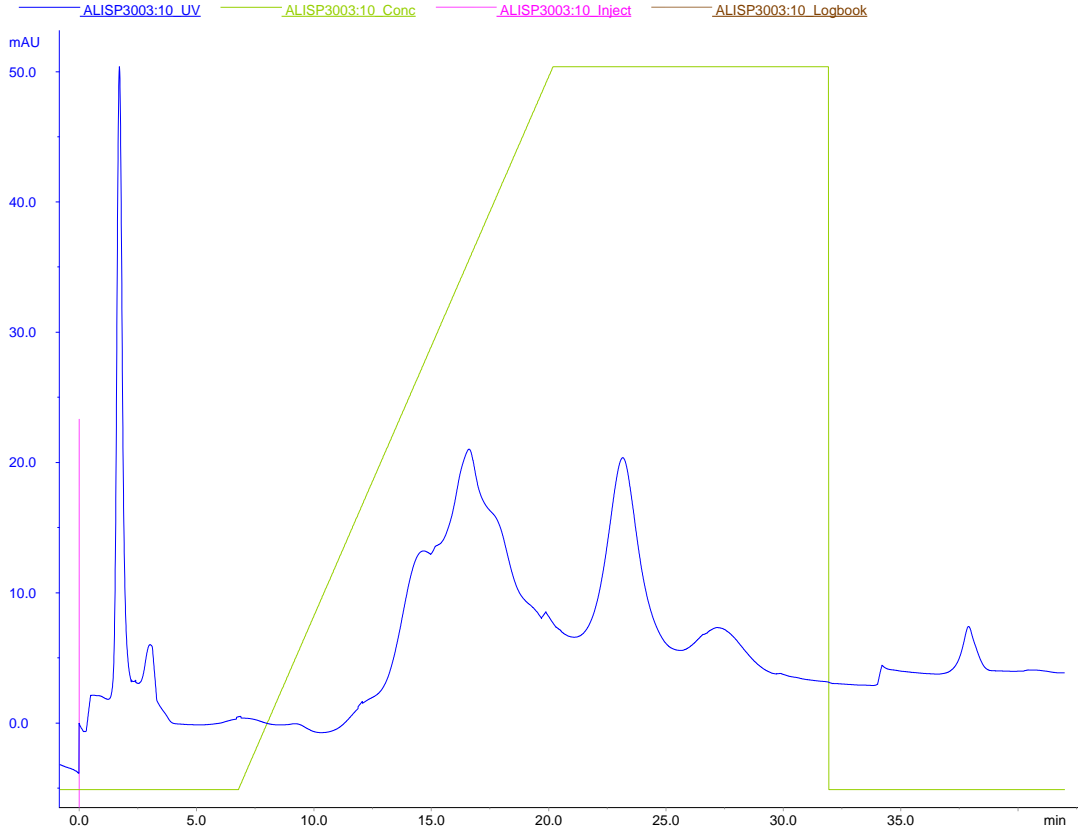
Şekil 4.2. HiTrap Q XL kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B Tamponu: 0,5 M NaCl , lineer gradient, 280 nm dalga boyu)



Şekil 4.3. HiTrap Q XL kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B tamponu: 1 M NaCl, lineer gradient, 280 nm dalga boyu)



Şekil 4.4. HiTrap Q XL kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B tamponu: 1 M NaCl, basamaklı gradient, 254 nm dalga boyu)

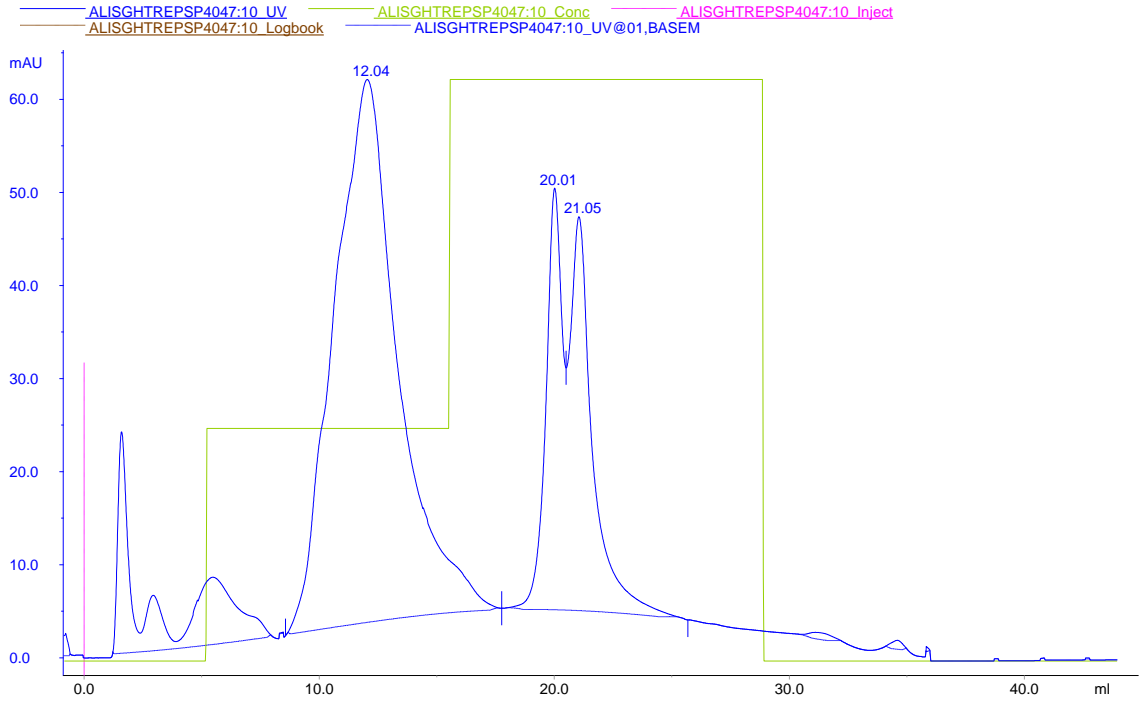


Şekil 4.5. HiPrep Q XL 16/10 kolonunda A tipi antijen kromatogramı (B Tamponu: 1 M NaCl, lineer gradient, 254 nm dalga boyu)

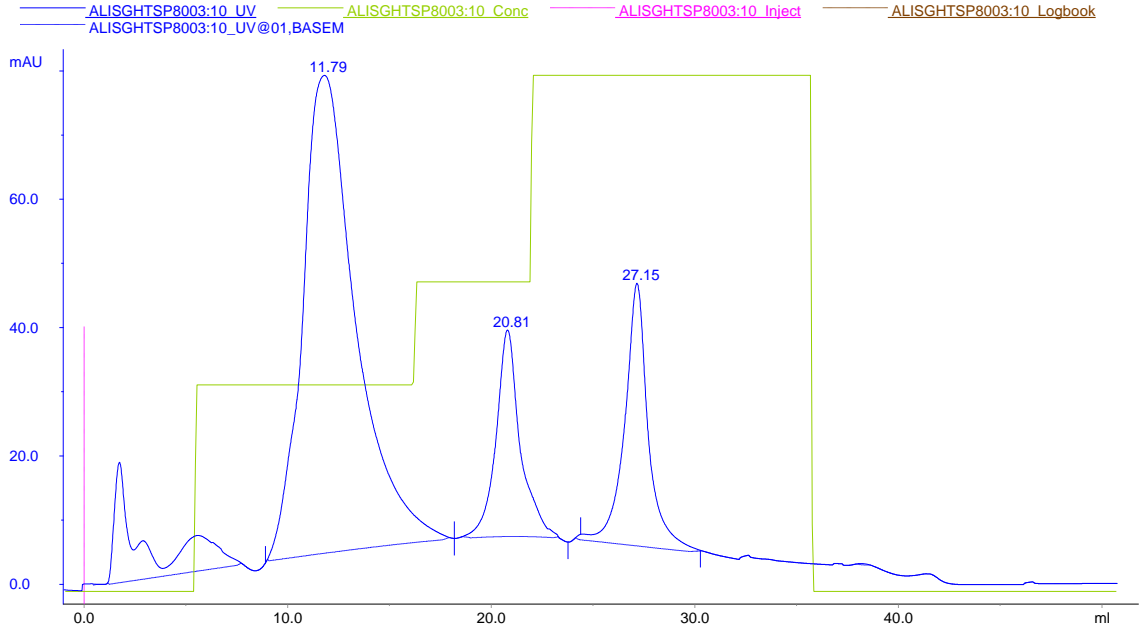
Metot belirleme için yaklaşık 15 adet deney yapılmıştır. FPLC cihazı ile yapılan deneyler sonucunda Şekil 4.2. ve Şekil 4.3. deneylerde birbirine yapışık olarak görülen pikler Şekil 4.4. deneyindeki basamaklı gradient metodu ile birbirinden ayrılmıştır. Ayrıca B tamponuna 0.5 M NaCl ilave edilmesi durumunda kolonda tutulan numunelerin tamamen uzaklaşmadığı görülmüştür. Bu nedenle B tamponunda 0.5 M NaCl kullanımından vazgeçilmiştir. UV dalga boyunun karşılaştırılmasında da 254 nm'de yapılan deneylerin, 280 nm dalga boyundaki deneylerdekinden daha düzgün pikler verdiği gözlemlenmiştir. Kolon tipi karşılaştırılmasında, aynı iyonik yapıda ama farklı boy ve hacimde olan iki kolonla deneyler yapılmıştır. HiTrap Q XL 5 mL kolonunun piklerin ayrılmasında HiPrep Q XL 16/10 kolonuna göre daha başarılı olduğu, ayrıca HiTrap Q XL 5 mL kolonunda daha yüksek akış hızlarında çalışılmasına bağlı olarak deneylerin daha kısa sürede yapılabildiği görülmüştür.

Metot belirlemek amacıyla yapılan bu deneylerin sonucunda bundan sonra yapılacak deneylerde A tamponu olarak 20 mM Tris-HCl, pH :7,50, B tamponu olarak 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH:7,50 kullanılmasına, kolon olarak

HiTrap Q XL 5 mL kolonuna, gradient yöntemi olarak basamaklı gradient yöntemine ve UV dalga boyu olarak da 254 nm dalga boyuna karar verilmiştir. Alınan bu kararlardan sonra yapılan ilk deneylerde iki basamaklı gradient metodu çalışılmış olup ilerleyen çalışmalarda farklı numunelerde 2. basamakta görülen pik çatallanmasından (Şekil 4.6.) dolayı üç basamaklı gradient elüsyon metodunun uygulanması uygun bulunmuştur. (Şekil 4.7.). Akış hızı da, ilerleyen deneylerde daha hızlı sonuç vermesi nedeni ile 5 mL/dk değerine çıkarılmıştır (Şekil 4.7.). Böylelikle Şekil 4.6.' da çatallı olan pik uygulanan yeni metot ile Şekil 4.7.' deki gibi ayrılmıştır.



Şekil 4.6. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4047 kodlu (Çizelge 3.3.) deney sonucu (iki basamaklı gradient elüsyon 2. pik çatallanmış).



Şekil 4.7. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 8003 kodlu (Çizelge 3.3.) deney sonucu (üç basamaklı gradient elüsyon, pikler ayrılmış, akış hızı 5 mL/dk).

4.2. 146 S Antijeni Pikinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Çalışmanın bu aşamasında deney sonuçlarından elde edilen piklerin hangisinin 146 S antijenine ait olduğu araştırılmıştır. Bu amaç için FPLC cihazında UV dedektörün pik verdiği zamanlara ait sıvılar (fraksiyon) numune tüplerine toplanmıştır. Toplanan numuneler Şap Enstitüsü Teşhis Laboratuvarında bir dizi analize tabi tutulmuştur. Aşağıda bu analizlerin sonuçları sunulmuş ve gerekli tartışmalar yapılmıştır.

4.2.1. PCR ve ELISA analizleri

Yapılan deneylerden toplanan pik numuneleri, içerisinde 146 S partikülünün belirlenmesi için RT-PCR ve ELISA testlerine tabi tutulmuştur.

Bu testlerden PCR bilindiği üzere DNA ve RNA belirleme ve tanıma özelliğine sahip bir testtir. Ayrıca Ct (threshold cycle) değerine göre DNA ve RNA'nın miktarı hakkında da bilgi verebilir. Şap virüsü de bir RNA virüsüdür. 146 S antijeni veya partikülü olarak adlandırılan yapı yüksek antijenik özelliğe sahip tam bir virüs partikülüdür. Yani virüsün yapısal proteinlerinin (VP1, VP2, VP3, VP4) tamamını içeren bir kapsit ve içerisinde RNA' sı olan bir partiküldür. RT-PCR testi ile şap virüsü için, tipine göre (A, O ve Asya tiplerine) özel tanıma

yapılabilmektedir. Bu test numune içerisinde aranan tüm RNA'yı tespit etme özelliğine sahiptir. Bu nedenle toplanan pik numuneleri içerisindeki 146 S partikülü yanı sıra serbest halde olan virüs RNA'larını da tespit eder. Bu durumda piklerin herhangi birinde 146 S harici serbest virüs RNA'sı var ise pozitif sonuç verir.

PCR analizlerinden elde edilen Ct değerlerinden iki numune arasındaki (Örneğin: A ve B numuneleri) DNA/RNA miktarı oranı aşağıdaki 4.1. eşitliği yardımı ile hesaplanabilmektedir [63].

$$\text{Oran}_{(A/B)} = E^{\text{Ct}_{(A)} - \text{Ct}_{(B)}} \quad (4.1.)$$

E= Verimlik değeri (E değeri için genel olarak 2 değeri kullanılmaktadır)

$\text{Ct}_{(A)}$ = A numunesi Ct değeri

$\text{Ct}_{(B)}$ = B numunesi Ct değeri

Örnek olarak Ct değeri 35 olan A numunesi ile Ct değeri 25 olan B numunesi arasındaki hedef DNA/RNA miktarı oranı:

$$\begin{aligned} \text{Oran}_{(A/B)} &= 2^{(35-25)} \\ &= 1024 \text{ (B numunesi, A'ya göre 1024 kat fazla DNA/RNA içerir)} \end{aligned}$$

ELISA testi ise PCR' in tersine nükleik asiti değil, antijen-antikor eşleşmesi temelli bir test olduğundan, virüsün antijenik özelliğe sahip kapsit proteinlerini (VP1, VP2 ve VP3) tanıyarak ve pozitif sonuç verir. Toplanan numuneler içerisinde 146 S partikülü haricinde antijenik özelliğe sahip kapsit proteinleri var ise onları da tanıyabilir. Çizelge 4.2.'de PCR ve ELISA test sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.2.'de belirtilen bazı kısaltmaların açıklaması aşağıdaki gibidir.

Ct : Isıl döngü (Threshold cycle)

PK : Pozitif Kontrol (RT-PCR için; A, O ve Asya tipi şap virüsü içeren pozitif kontrol numunesi, ELISA için; OD değeri 1-2 arası olan şap virüsü içeren pozitif kontrol numunesi)

NK : Negatif Kontrol (RT-PCR için; içinde herhangi bir RNA veya DNA bulunmayan negatif kontrol numunesi, ELISA için; OD değeri 0,1 'in altında olan şap virüsü içeren negatif kontrol numunesi

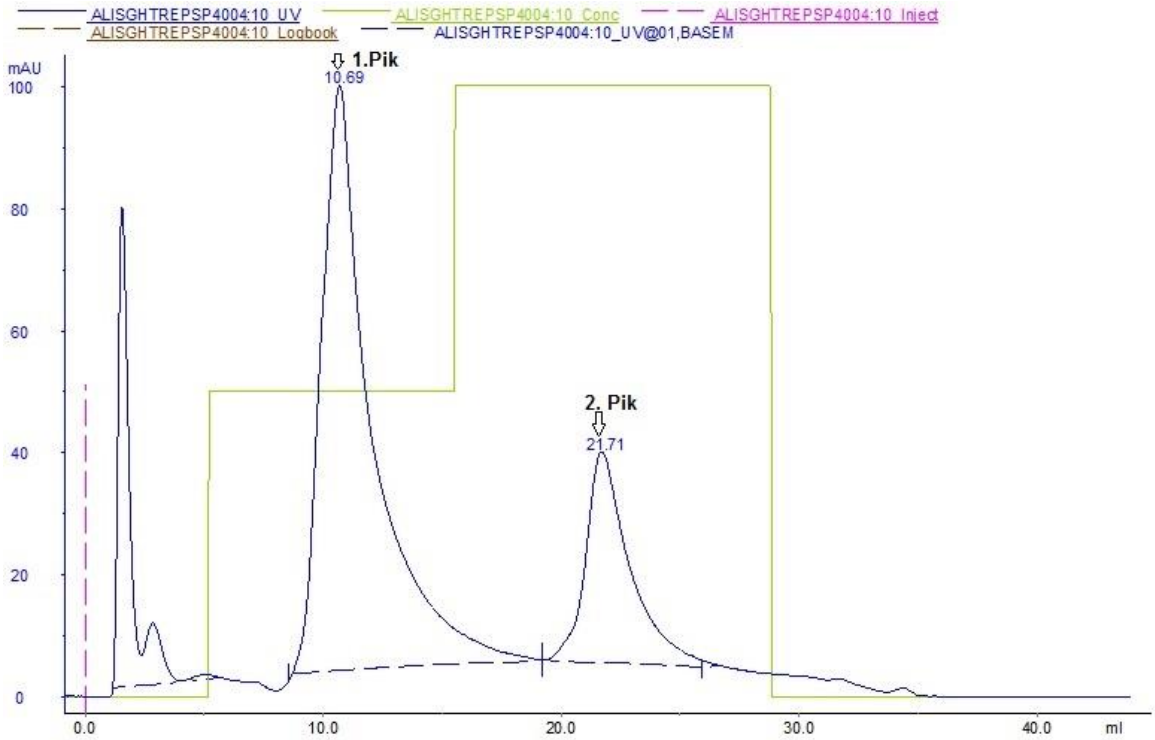
NEG : Negatif sonuç

SOV24 : Konsantre edilmiş O tipi antijenin serisinin kodu

Çizelge 4.2. RT-PCR ve ELISA sonuçları

RT-PCR ve ELISA ANALİZ SONUÇLARI									
Deney No/Kod	Pik No	Deney Antijen	PCR Ct Değerleri			ELISA (OD)		Şekil No	Açıklama
			A tipi	O Tipi	Tüm tipler	A Tipi	O Tipi		
12/3002	1	O	NEG	34.28	34.54	0.52	0.3	-	HiPrep 16/10 kolonu
12/3002	2	O	29.52	30.28	27.08	NEG	NEG	-	HiPrep 16/10 kolonu
14/3004	1	A	32.79	NEG	33.41	0.9	0.18	-	HiPrep 16/10 kolonu
14/3004	2	A	28.59	34.2	25.86	0.14	-	-	HiPrep 16/10 kolonu
16/4002	1	O	37.78	35.82	34.42	0.49	0.38	-	HiTrap 5 mL kolonu
16/4002	2	O	27.22	33.92	27.17	0.1	-	-	HiTrap 5 mL kolonu
18/4004	1	A	34.5	NEG	34.33	1.2	0.17	4.8	HiTrap 5 mL kolonu
18/4004	2	A	27.24	34.78	26.66	0.25	-	-	HiTrap 5 mL kolonu
21/4008	1	A	29.43	NEG	32.55	0.98	0.13	4.9	HiTrap 5 mL kolonu
21/4008	2	A	21.31	32,13	NEG	0.28	-	-	HiTrap 5 mL kolonu
22/4009	1	O	31.66	30,44	31,42	0.43	00.31	4.10	HiTrap 5 mL kolonu
22/4009	2	O	22,06	30,51	NEG	0.13	-	-	HiTrap 5 mL kolonu
		PK	16.53	14.63	13.76	Tamam	Tamam		Pozitif Kontrol
		NK	NEG	NEG	NEG	Tamam	Tamam		Negatif Kontrol
36/4029	1	A	34,61	27.97	34.71	0.48	0.11	-	Nükleaz Enzim Den.
36/4029	2	A	27.44	32.25	27.67	NEG	NEG	-	Nükleaz Enzim Den.
37/4030	1	O	35.04	25.67	30.69	0.45	0.41	-	Nükleaz Enzim Den.
37/4030	2	O	28.06	34.9	24.69	NEG	NEG	-	Nükleaz Enzim Den.
38/4031	0	O	-	-	-	NEG	NEG	4.11	Nükleaz Enzim Den.
38/4031	1.1	O	36.9	33.88	31.57	0.47	0.37	-	Nükleaz Enzim Den.
38/4031	1.2	O	35.38	35.89	35.47	0.13	0.1	-	Nükleaz Enzim Den.
38/4031	2	O	27.78	26.65	28.31	NEG	NEG	-	Nükleaz Enzim Den.
44/4037	1	A	30.99	NEG	31.08	-	-	4.12	Nükleaz Enzim Den.
44/4037	2	A	24.58	25.07	26.83	-	-	-	Nükleaz Enzim Den.
46/4039	1	O	35.81	32.04	31.12	-	-	4.13	Nükleaz Enzim Den.
46/4039	2	O	26.96	28.46	25.37	-	-	-	Nükleaz Enzim Den.
46/4039	3	O	36.82	35.31	36.84	-	-	-	Nükleaz Enzim Den.
47/4040	1	A	30.18	25.48	23.87	-	-	-	Nükleaz yok
47/4040	2	A	22.04	17.76	17.48	-	-	-	Nükleaz yok
61/5007	1	O	30,18	25,48	23,87	-	-	-	SOV24 antijen serisi
61/5007	2	O	22,04	17,76	17,48	-	-	-	SOV24 antijen serisi
62/7003	1.1	O	26,96	28,46	25,37	-	-	4.14	Yeni HiTrap 5 mL kolonu
62/7003	1.2	O	27,57	29,78	26,43	-	-	-	Yeni HiTrap 5 mL kolonu
62/7003	2	O	27,55	29,19	25,66	-	-	-	Yeni HiTrap 5 mL kolonu
62/7003	3	O	-	25,06	-	-	-	-	Yeni HiTrap 5 mL kolonu
109/9001	1	O	30.67	25.4	25.52	1.5	2.6	4.15	0,5 mL enjeksiyon
109/9001	2	O	31.2	24.33	23.38	0.8	2.2	-	0,5 mL enjeksiyon
109/9001	3	O	20.17	12.52	14.2	1.1	2.5	-	0,5 mL enjeksiyon
111/9003	1	A	24.15	26.41	22.3	2.6	1.4	-	0,5 mL enjeksiyon
111/9003	2	A	25.84	27.71	23.61	0.7	0.6	-	0,5 mL enjeksiyon
111/9003	3	A	18.98	18.11	17.09	0.5	1.0	-	0,5 mL enjeksiyon
		PK	18.54	17.12	16.99	Tamam	Tamam		Pozitif Kontrol
		NK	-	-	-	Tamam	Tamam		Negatif Kontrol

PCR testlerinde Ct değeri numune içerisinde bulunan hedef RNA'nın miktarı hakkında da bilgi vermektedir. Örnek olarak 25-26 Ct değeri ile 35-36 Ct değeri karşılaştırıldığında; 25 Ct değerindeki RNA miktarı, 35 Ct değerine göre 1.000 kat daha fazla RNA içerdiği (Bölüm 4.2.1.'de de açıklandığı üzere) Şap Enstitüsünde bu testin uzmanları tarafından değerlendirilmektedir. Bu bilgi ışığında testler değerlendirildiğinde tüm sonuçlarda basamaklı gradient elüsyon aşamasının 2. basamağında çıkan 2. pik Ct değerlerinin hep yüksek olduğu (en az 1.000 – 1.500 kat daha fazla RNA içerdiği) görülmüştür (Çizelge 4.2., Şekil 4.8.).

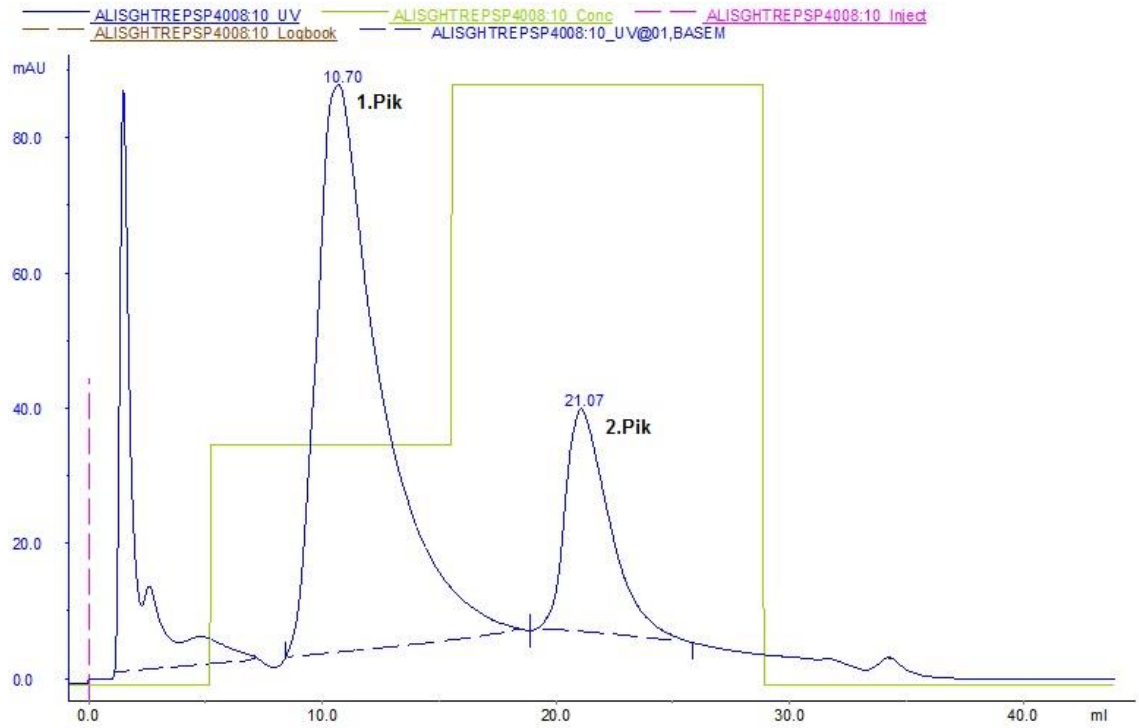


Şekil 4.8. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4004 kodlu deney sonucu.

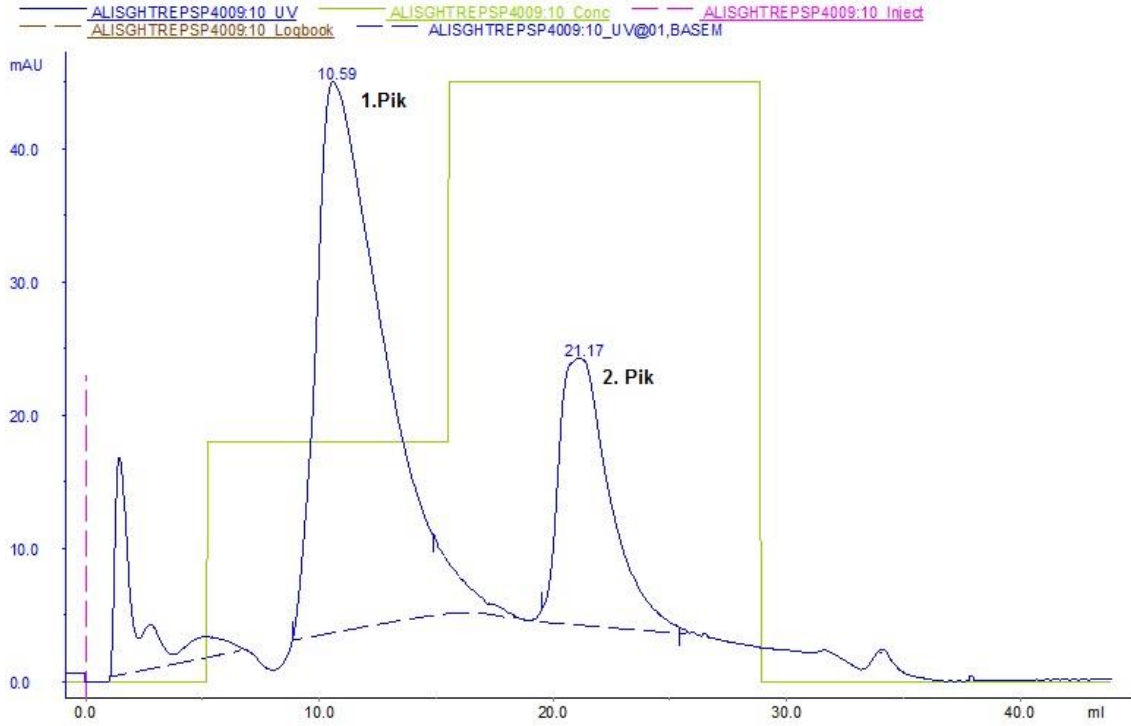
Şekil 4.8.'de 18 nolu 4004 kodlu deneye ait kromatogram görülmektedir. Kromatogramda 3 adet pik görülmektedir. Bu piklerden enjeksiyondan hemen sonra, elüsyondan önce olan (1-3 mL aralığında çıkan) numara verilmemiş pik kolona tutunmadan geçen proteinlerdir. Yapılan ilk PCR ve ELISA analizlerinde bu pikten toplanan fraksiyonda hem PCR, hem de ELISA sonuçlarına göre şap virüsü negatif sonuç vermiştir. Bu nedenle de diğer analizlerde bu pikten fraksiyon toplanmamıştır. Basamaklı gradient elüsyonun ilk basamağındaki pik, "1.pik" (10,69 mL), ikinci basamağındaki pik, "2. Pik" (21,71 mL) olarak adlandırılmıştır.

Şekil 4.8.'de gösterilen 4004 kodlu deneyin Çizelge 4.2.'deki PCR sonuçlarına bakıldığında 1. pikin A tipi için Ct değeri 34,5, O tipi için negatif, 2. pikin A tipi için Ct değeri 27,24 , O tipi için 34,74 olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre 2. pikin 146 S partikülü piki olması muhtemeldir. 4004 kodlu deneyde elde edilen analiz sonuçlarının benzerleri 4008 ve 4009 kodlu deneylerde de elde edilmiştir (Şekil 4.8., Şekil 4.10.).

Analiz sonuçlarında görülen diğer bir önemli nokta ise A tipi antijen numunesinde O tipi antijenin, O tipi antijen numunesinde de A tipi antijenin tespit edilmesidir. Bu durumun öncelikle aynı kolonda çalışılması nedeniyle kolondan kaynaklı kontaminasyon olabileceği düşünülmüştür. Ancak daha sonra 62 no'lu 7003 kodlu deneyde yeni kolon kullanıldığında da aynı sonuç görülünce numunenin kendisinin farklı tiplerle kontamine olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra Şap Enstitüsündeki virüs kültürlerinde kullanılan bazı tohum virüslerin kontamine olduğu tespit edilmiştir. Bu kontaminasyon durumu çalışma için değerlendirildiğinde, çalışılan kolonlarla tipe özel ayırım yapılmadığından 146 S partikülü tespiti için sorun olmayacağı Şap Enstitüsü uzmanları ile birlikte değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4008 kodlu deney sonucu.



Şekil 4.10. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4009 kodlu deney sonucu.

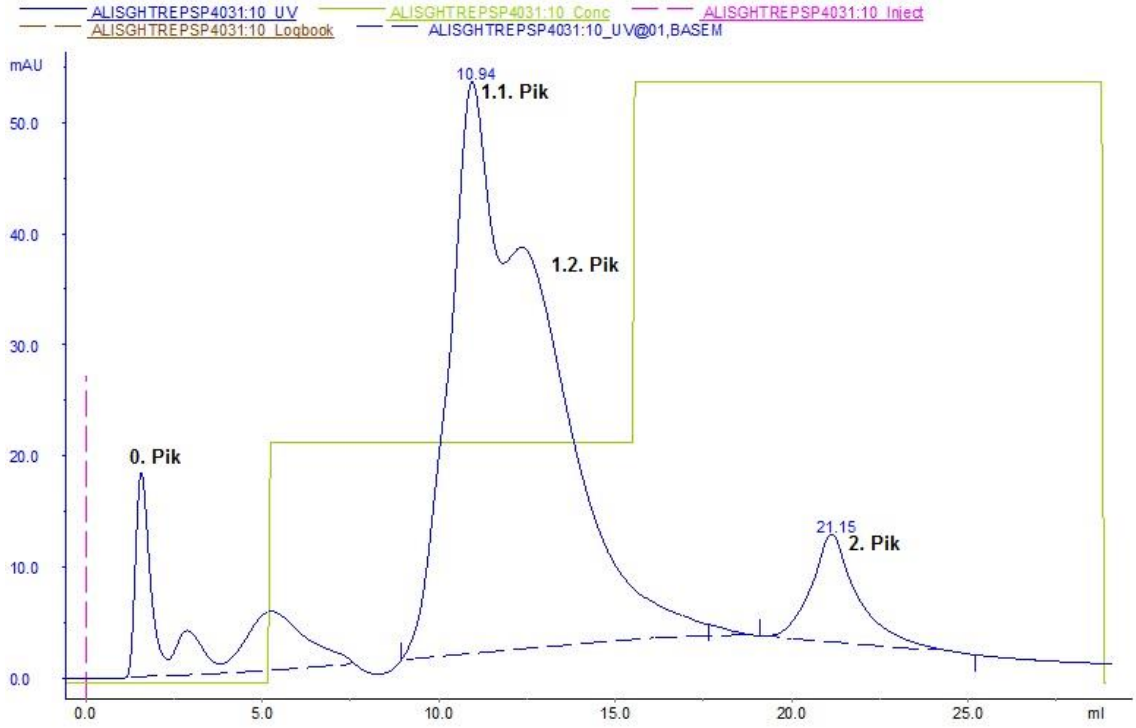
Analiz sonuçları genel olarak kromatogramlardaki 2. pikin 146 S partikülü piki olmasını işaret etmesine rağmen daha net bir tespit için numuneler nükleaz enzimi ile muamele edilerek de deneyler yapılmıştır.

4.2.2. Nükleaz enzimli deney analizleri

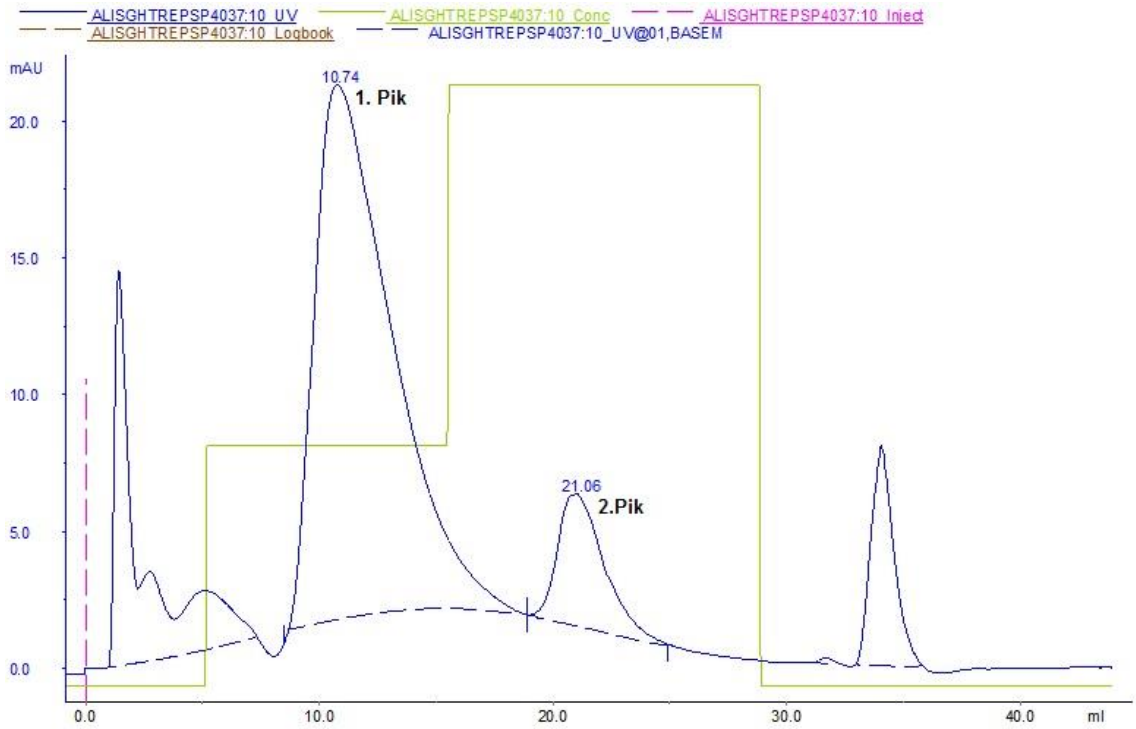
Numuneler içerisinde bulunan ve PCR analizlerinde tespit edilen serbest RNA'ları yok etmek, sadece 146 S partikülünü bırakmak için nükleaz (Novagen/Benzonase) enzimi kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla birlikte 146 S miktar tayini deneylerinde, konakçı hücre DNA'sı yönüyle nükleaz enzimli deneyler ayrıca değerlendirilecektir. Numuneler Bölüm 3.3.4.' de tarif edildiği şekilde nükleaz enzimi ile muamele edilmiştir. Böylelikle numune içerisinde bulunan serbest RNA'lar parçalanacak, kapsit yapısıyla korunan 146 S partikülü içerisinde bulunan RNA muhafaza edilecektir. Deney sonucunda toplanan piklerin içinde olması muhtemel 146 S partikülünün kapsit yapısı, PCR analizi esnasında RNA ekstraksiyonu ile parçalanacak ve RNA serbest kalacaktır. Bu durumda tespit edilen RNA'lar yalnızca 146 S partikülüne ait olacaktır.

Ön görüldüğü gibi olmuş, önceki analizlere göre 146 S partikülü pikini işaret eden pikin nükleaz enzimli değerleri pozitif sonuç vermiş, diğer pikler negatif

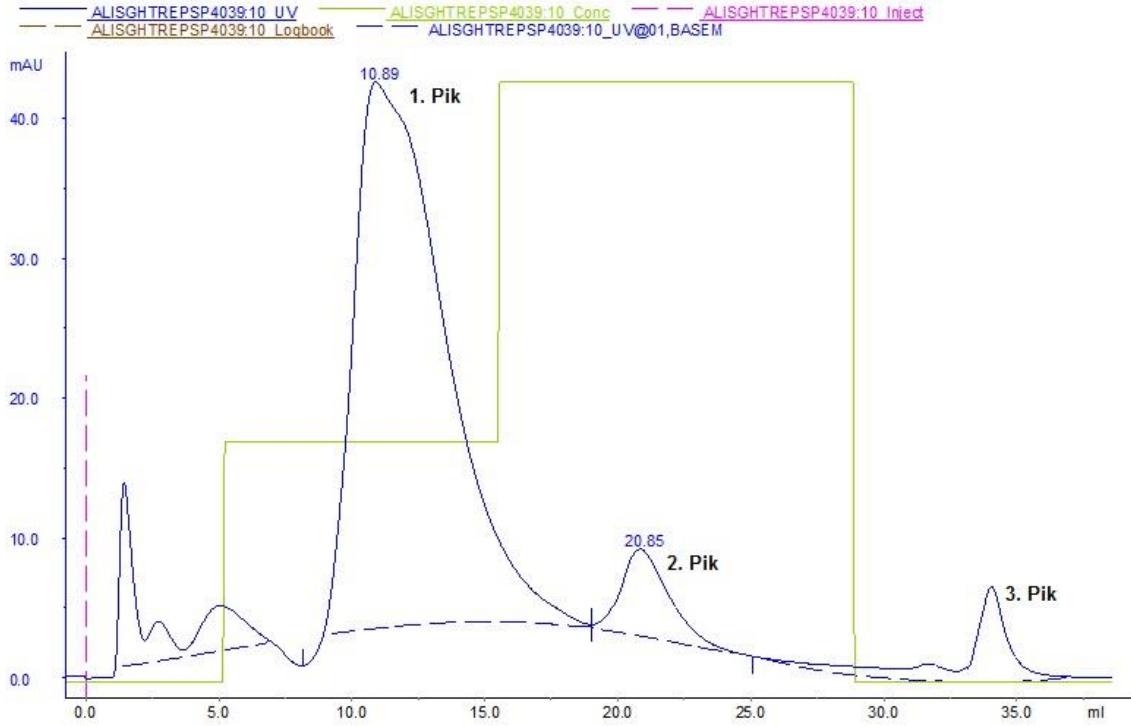
veya negatife yakın değerler vermiştir (Çizelge 4.2., şekil 4.11., şekil 4.12. ve şekil 4.13.).



şekil 4.11. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4031 kodlu deney sonucu.



şekil 4.12. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4037 kodlu deney sonucu.



Şekil 4.13. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 4039 kodlu deney sonucu.

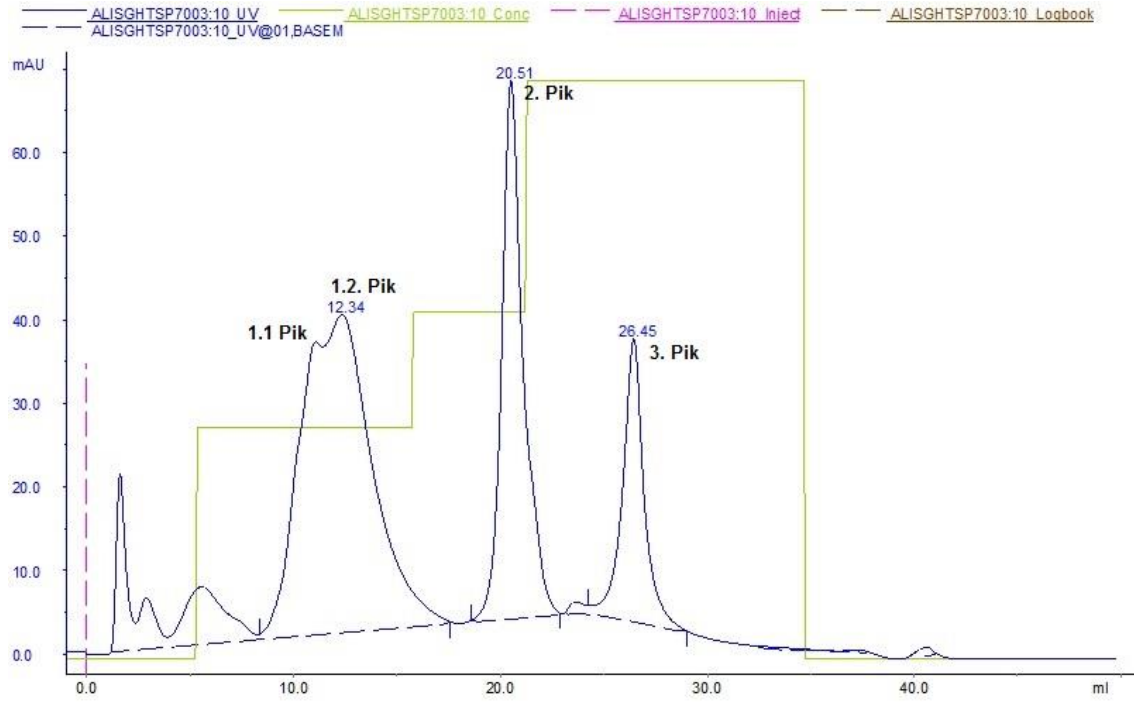
Şekil 4.11.'de görülen 4031 kodlu deneyden dört adet pike ait fraksiyon toplanmıştır. Çizelge 4.2.'de görülen sonuçlar değerlendirildiğinde 0. pik tamamen negatif, 1.1. ve 1.2. pikler ise negatife çok yakın, dolayısıyla negatif olarak kabul edilebilecek Ct değerleri (A için 36,9/35,38 , O için 31,57/35,47) vermiştir. 2. pik ise A için 27,78 , O için 26,65 Ct değeri vermiştir.

Şekil 4.12.'de verilen 4037 kodlu deneyde de aynı paralellikte sonuçlar görülmektedir. Bu deneyde A tipi antijen yürütülmüş olup, Çizelge 4.2.' ye göre A tipi için 1. pik 30,99 Ct, 2. pik 24,58 Ct değeri vermiş, O tipi için 1. pik negatif 2. pik 25,07 Ct değeri vermiştir. A tipi için okunan Ct değerlerine bakıldığında farkın büyük olduğu görülmektedir.

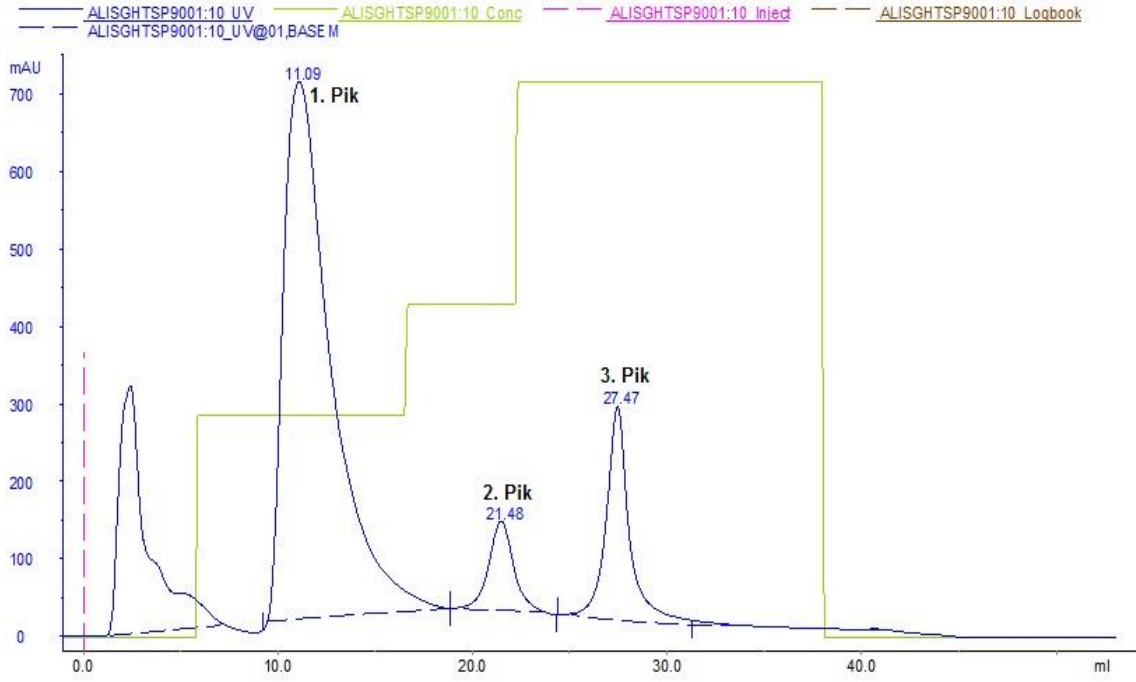
Şekil 4.13.'de 4039 kodlu deneye ait kromatogram verilmiştir. Bu deneyde O tipi antijen yürütülmüştür. Elüsyon işleminden sonra kolon rejenerasyonu esnasında bir pik daha görülmüştür. Bir önceki 4037 kodlu deneyde de aynı pik görülmüştür. Bu deney esnasında çıkan son pikten de fraksiyon toplanmış ve PCR testine gönderilmiştir. Sonuç olarak Çizelge 4.2.'de görüldüğü üzere 3. pik Ct değeri A için 36,82 , O için 35,31 olarak okunmuş olup negatif olarak değerlendirilmiştir. Diğer pik (1. pik, 2. pik) sonuçları da önceki nükleaz enzimli

deneyler ile aynı paralellikte olup 1. pik Ct değerleri negatife oldukça yakın, 2. pik ise pozitif sonuç vermiştir.

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında farklı numuneler ile yapılan deneylerde piklerde çatallanma görüldüğünden (Şekil 4.6.) metot değiştirilmiş ve 3 basamaklı gradient elüsyon metodu geliştirilmiştir (Şekil 4.7.). Yeni metot ile ayrılan pikler toplanmış ve 146 S partikülü tespiti için PCR analizi yapılmıştır (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 7003 kodlu deney sonucu (3 basamaklı gradient elüsyon metodu).



Şekil 4.15. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 9001 kodlu deney sonucu (3 basamaklı gradient elüsyon, 0,5 mL enjeksiyon).

Şekil 4.14.'de 7003 kodlu deneyin, Şekil 4.15.'de de 9001 kodlu deneyin kromatogramı görülmektedir. Her iki deneyde de O tipi antijen yürütülmüştür. Çizelge 4.2.'de bu deneylerden toplanan pikler ile ilgili PCR sonuçlarına bakıldığında 3. pik Ct değerlerinin diğerlerinden yüksek olduğu görülmektedir. Daha önceden iki basamaklı gradient elüsyon metodunda 2. pik olarak tespit edilen 146 S piki, üç basamaklı bu yeni metotta 3. pik olarak tespit edilmiştir. Zaten iki basamaklı gradient elüsyon yönteminin 2. basamağındaki elüsyon tamponu tuz konsantrasyonu ile üç basamaklı gradient elüsyon yönteminin 3. basamağındaki elüsyon tamponu tuz konsantrasyonu aynıdır. Yani aynı kolondan aynı elüsyon konsantrasyonunda yine aynı proteinler çıkacaktır. Yeni metotta daha hassas bir ayırım söz konusudur.

4.2.3. ELISA analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Çizelge 4.2.'de ELISA analiz sonuçlarına bakıldığında çok farklı değerler ile karşılaşılmaktadır. 1. pik OD (optik yoğunluk) değeri 2. pikten daha yüksek bulunmuştur. Hatta bazı 2. pik değerlerinde, özellikle nükleaz enzimli deneylerde, negatif sonuçlar görülmüştür. Bunun nedenin (Bölüm 2.2.1.'de

bahsedildiği üzere) ELISA analizinin yalnızca 146 S partikülüne değil virüs kapsit proteinlerine de (VP1, VP2, VP3) pozitif sonuç vermesi olduğu düşünülmektedir. Şap Enstitüsü uzmanları ile yapılan değerlendirmede de aynı şekilde düşünce hakim olup PCR testinin ELISA' ya göre çok daha güvenilir ve yeni teknoloji olduğu vurgulanmıştır.

PCR ve ELISA analiz sonuçlarının tümü değerlendirildiğinde 146 S partikülüne ait pikin basamaklı gradient elüsyon aşamasının son basamağında çıkan 2. pik olduğu kanaatine varılmıştır.

4.2.4. Sukroz Gradient (146 S testi) analizleri

Sukroz Gradient yöntemi ile 146 S partikül tayini testi Şap Enstitüsü Kontrol Laboratuvarında yapılmıştır. PCR ve ELISA testlerinde olduğu gibi toplanan pikler (1. pik ve 2. pikler) bu teste tabi tutulmuştur. Genel olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir. Sadece birkaç testte 2. pik fraksiyonunun sonucu çok düşük olarak okunabilmiştir. 4004 kodlu deneyin 2. pik değeri 0,03 µg/mL olarak okunmuştur. Negatif sonuçların nedeni deney esnasında toplanan numunelerin oldukça seyreltik olmasına bağlanabilir. Çünkü kolona tutunan 146 S partikülleri elüsyon tamponu ile birlikte seyreltik bir şekilde toplanmaktadır. Bu nedenle sukroz gradient testinin hassasiyet aralığının altında bulunan antijen değerleri okunamamaktadır.

Çalışma esnasında sukroz gradient testi sadece toplanan pikler için yapılmamış olup, zaman zaman çalışılan numuneler de teste tabi tutulmuştur. Bu sonuçlar özellikle ileride bahsedilecek olan pik alanları karşılaştırmalarında kullanılmıştır.

4.2.5. CFT analizleri

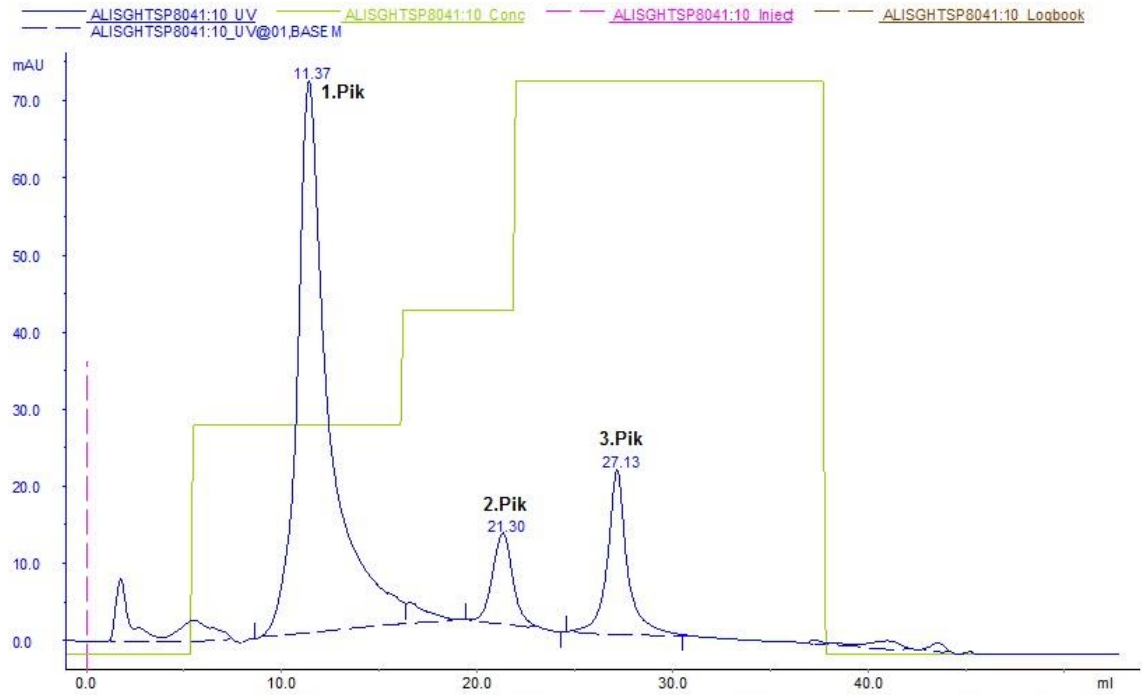
Komplement fiksasyon testleri (CFT) Şap Enstitüsü Seroloji Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmalardan toplanan pik numuneleri CFT testine tabi tutulmuş, negatif sonuçlar (anti komplement) elde edilmiştir. Bunun nedeni Şap Enstitüsü uzmanları ile birlikte değerlendirilmiş olup testin kendisinden kaynaklanan nedenler olabileceği vurgulanmıştır. Çoğu zaman pozitif olduğu bilinen numunelerin anti komplement sonuç verebildiği belirtilmiştir. Testle ilgili olumsuzluklar nedeni ile çalışmanın ilerleyen aşamasında toplanan pikler bu teste tabi tutulmamıştır.

4.3. Tespit Edilen 146 S Pikinden Miktar Tayini

Çalışmanın bundan önceki aşamasında 146 S partikülüne ait pik belirlenmiş olup bu aşamada piklerin alanlarından 146 S partikülü miktarının belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

4.3.1. Kromatografi deney sonuçlarından 146-S piki alanın hesaplanması

Deneylerden elde edilen kromatogramların pik analizleri Unicorn Manager 5.11 (GE, Healthcare, AKTA FPLC) programının pik analiz modülü ile yapılmıştır. Bu modül ile piklerin taban noktaları belirlendikten sonra otomatik olarak istenilen pikin alanları hesaplanmıştır (Şekil 4.16., Çizelge 4.3.).

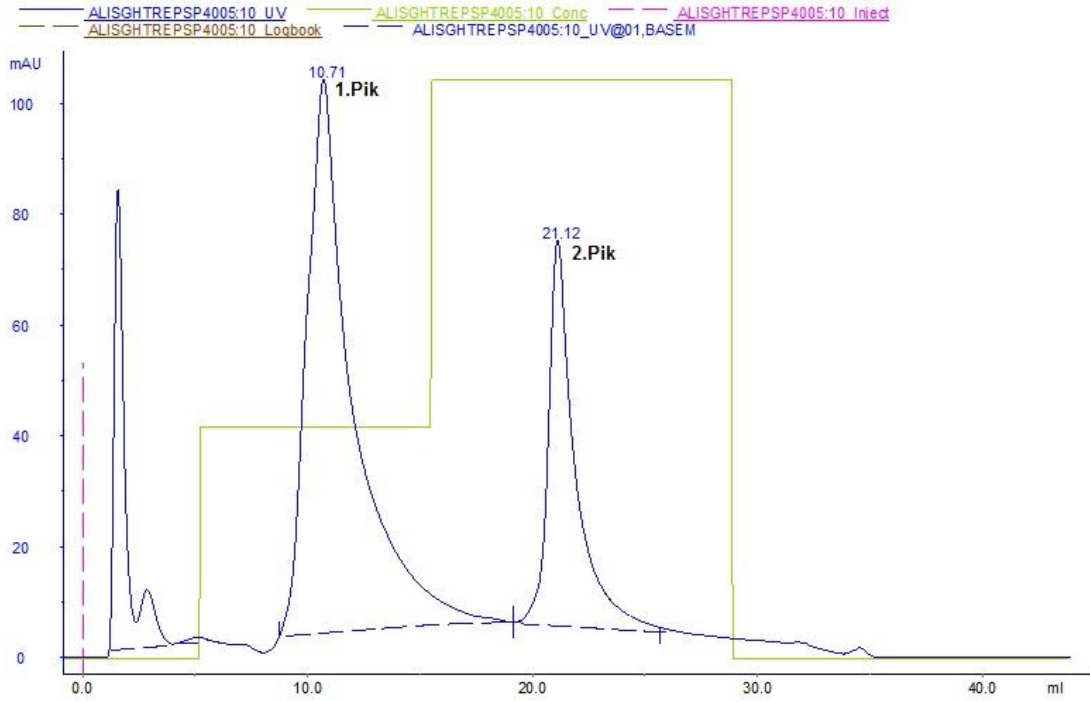


Şekil 4.16. HiTrap 5 mL kolonu, O tipi antijen, 8041 kodlu deney sonucu.

Çizelge 4.3. Şekil 4.16.' da gösterilen kromatogramın pik analiz çıktıları.

Pik tepe noktası (Retention) (mL)	Pik Alanı (mAU.mL)	Pik Şiddeti (mAU)
11,37(1.Pik)	134,69	71,52
21,30 (2.Pik)	14,22	11,80
27,13 (3.Pik)	25,30	21,33

Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.'de sırasıyla Şekil 4.16. ve Şekil 4.17'de gösterilen kromatogramların analiz sonuçları görülmektedir. Bu iki kromatogram arasındaki fark (Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.) metot farkıdır. Şekil 4.16.'da üç basamaklı gradient metodu, Şekil 4.17.'de ise iki basamaklı gradient metodu kullanılmıştır. Üç basamaklı gradient metodu ile yapılan deneylerde 3 adet pikin (1.pik, 2.pik, 3.pik) alan hesabı yapılmış, iki basamaklı gradient metodunda ise 2 adet pikin (1.pik, 2.pik) alan hesabı yapılmıştır.



Şekil 4.17. HiTrap 5 mL kolonu, A tipi antijen, 4005 kodlu deney sonucu.

Çizelge 4.4. Şekil 4.16.'da gösterilen kromatogramın pik analiz çıktıları

Pik tepe noktası (Retention) (ml)	Pik Alanı (mAU.mL)	Pik Şiddeti (mAU)
10,71 (1.Pik)	238,30	99,81
21,12 (2. Pik)	96,79	69,64

Yukarıdaki bu örneklerde olduğu gibi çalışmada yapılan tüm deneylere ait kromatogramların pik alanları hesaplanmıştır. Pik alanlarının hesaplanması çalışmalarında sadece HiTrap Q XL 5 mL kolonu ile yapılan deneyler kullanılmıştır. Çalışmalarda iki basamaklı gradient metodu deneyleri ile üç

basamaklı gradient metodu deneyleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.). Metot belirleme için yapılan deneyler için alan hesabı yapılmamıştır.

Çizelge 4.5. İki basamaklı gradient metodu deneyleri pik alanları

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	146-S (µg/mL)	Top. Pro. (µg/mL)	1.Pik Alanı (mAU.mL)	2.Pik Alanı (mAU.mL)	Açıklama
15	4001	PEGO-12/05	17,6	5.098	127,42	177,64	O Tipi HiTrap Deneyi
16	4002	PEGO-12/05	17,6	5.098	58,80	140,46	O Tipi HiTrap Deneyi
17	4003	PEGA-12/03	14,16	3.419	68,04	221,01	A Tipi HiTrap Deneyi
18	4004	PEGA-12/03	14,16	3.419	74,47	237,73	A Tipi HiTrap Deneyi
19	4005	PEGA-12/03	14,16	3.419	96,79	238,30	A Tipi HiTrap Deneyi
20	4007	PEGA-12/03	14,16	3.419	69,59	278,04	A Tipi HiTrap Deneyi
21	4008	PEGA-12/03	14,16	3.419	71,40	268,91	A Tipi HiTrap Deneyi
22	4009	PEGO-12/05	17,6	5.098	50,32	130,95	O Tipi HiTrap Deneyi
29	4022	PEGA-12/03	3,9	3.419	18,35	88,46	A tipi Nükleaz Yok
30	4023	PEGO-12/05	12	5.098	21,85	155,44	O tipi Nükleaz Yok
31	4024	PEGO-12/06	9,6	5.098	18,43	137,13	O tipi Nükleaz Var
32	4025	PEGO-12/07	9,6	5.098	16,63	146,14	O tipi Nükleaz Var
33	4026	PEGA-12/03	3,1	3.419	14,86	74,36	A tipi Nükleaz Var
34	4027	PEGA-12/03	3,1	3.419	12,16	61,06	A tipi Nükleaz Var
35	4028	PEGA-12/03	3,1	3.419	11,12	71,71	A tipi Nükleaz Var
36	4029	PEGA-12/03	3,1	3.419	12,63	84,38	A tipi Nükleaz Var
37	4030	PEGO-12/06	9,6	5.098	13,52	144,97	O tipi Nükleaz Var
38	4031	PEGO-12/07	9,6	5.098	14,79	159,69	O tipi Nükleaz Var
39	4032	O (146 S)	12	-	8,06	24,87	O 146 S Norm. Fraks.
40	4033	O (146 S)	9,6	-	7,37	7,58	O 146 S Nucl. Fraks.
41	4034	A (146 S)	3,9	-	7,53	20,49	A 146 S Norm. Fraks.
42	4035	A (146 S)	3,1	-	7,27	20,12	A 146 S Nucl. Fraks.
43	4036	PEGA-12/03	3,1	3.419	20,20	65,94	A tipi Nükleaz Var
44	4037	PEGA-12/03	3,1	3.419	11,19	74,81	A tipi Nükleaz Var
45	4038	PEGO-12/06	9,6	5.098	12,78	155,31	O tipi Nükleaz Var
46	4039	PEGO-12/07	9,6	5.098	13,05	154,58	O tipi Nükleaz Var
47	4040	PEGA-12/03	3,9	3.419	10,69	85,84	A tipi Nükleaz Yok
48	4041	PEGO-12/05	12	5.098	20,25	183,06	O tipi Nükleaz Yok

İki basamaklı gradient metodu deneyleri için alan hesap sonuçları Çizelge 4.5. de verilmiştir. Bu deneylerde elde edilen kromatogramlardan iki pikin alan hesabı yapılmıştır. Bu piklerden yukarıda anlatıldığı üzere 2. pik 146 S antijenini içeren pik olarak belirlenmişti. Çizelge kabaca incelendiğinde A tipi ve O tipi 2. pik alanlarının farklı büyüklüklerde olduğu görülmektedir. Örnek olarak 17 numaralı 4003 kodlu, A tipi, 146 S antijen değeri 14,16 µg/mL olan deneyde 2. pik değeri 221,01 mAU.mL iken, daha yüksek 146 S antijen miktarına sahip (17,6 µg/mL) 16 numaralı, 4002 kodlu deneyin alanı 140,46 mAU.mL olmuştur.

Çizelge 4.6. Üç basamaklı gradient metodu deneyleri pik alanları

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	146-S (µg/mL)	Top. Pro. (µg/mL)	Seyreltme Oranı (%)	1.Pik Alanı (mAU.mL)	2.Pik Alanı (mAU.mL)	3.Pik Alanı (mAU.mL)	Açıklama
49	5003	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	202,66	43,66	47,71	3 mL/dk akış hızı (metot 5)
50	4047	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	184,49	36,74	47,83	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
51	4048	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	142,73	2,76	18,75	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
52	4049	PEGA-13/07	8,72	-	50	91,38	1,58	12,62	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
53	4050	PEGA-13/07	4,36	-	25	52,70	0,76	7,16	Farklı Konsantrasyon Deneyleri
55	5005	PEGO-13/05	13,33	5.640	100	110,81	0,00	25,90	Farklı seriye ait numuneler
56	5006	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	297,66	0,00	107,94	Farklı seriye ait numuneler
57	4051	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	307,69	0,00	115,60	Farklı seri num. (metot 4 ile)
58	6001	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	205,61	39,22	39,89	Farklı seri num. (3 basamak Metot 6)
59	7001	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	202,49	37,44	42,47	Farklı seri num. (3 basamak Metot 7)
60	7002	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	310,25	8,73	63,83	Farklı seri num. (3 basamak Metot 7)
61	5007	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	313,66	0,00	114,22	Farklı seri num. (metot 5, fraks. top.)
62	7003	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	152,80	78,43	41,08	(metot 7, yeni kolon, farksiyon Top.)
63	7004	PEGO-13/07	74,54	23.948	100	276,66	53,25	57,63	Farklı seri num. (metot 7, yeni kolon)
64	7005	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	326,56	29,73	61,01	Farklı seri num. (metot 7, yeni kolon)
65	8001	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	326,16	22,86	57,25	Fark. s. num. (metot 8 Akış H.=5mL/dk)
66	8002	PEGO-13/07	74,54	23.948	100	364,98	51,23	79,71	Farklı seri num. (metot 8)
67	8003	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	226,14	44,39	55,20	Farklı seri num. (metot 8)
68	8004	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	198,58	38,82	40,41	Farklı seri num. (metot 8 , eski kolon)
69	8005	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	159,69	4,14	18,91	Farklı seri num. (metot 8, A Tipi)
70	8006	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	175,08	32,00	73,15	Farklı Kons. Den. (met. 8, Eski Kolon)
71	8007	PEGO-13/06	12,30	-	50	99,75	20,07	29,57	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
72	8008	PEGO-13/06	6,15	-	25	60,40	11,31	15,47	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
73	8009	PEGO-13/06	6,15	-	25	60,44	9,11	13,41	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
74	8010	PEGO-13/06	3,08	-	12,5	32,51	6,07	6,02	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
75	8011	PEGO-13/06	18,45	-	75	107,23	26,00	19,13	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
76	8012	PEGO-13/06	18,45	-	75	127,14	29,00	26,48	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
77	8013	PEGO-13/06	24,60	8.335	100	178,65	42,59	39,15	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
78	8014	PEGO-13/06	12,30	-	50	124,80	28,77	28,06	Farklı Kons. Den. (O Tipi)
79	8015	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	139,82	5,11	15,91	Farklı Kons. Den. (met. 8, Eski Kolon)
80	8016	PEGA-13/07	17,45	9.144	100	153,40	4,50	16,23	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
81	8017	PEGA-13/07	8,72	-	50	98,31	2,96	11,91	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
82	8018	PEGA-13/07	4,36	-	25	60,49	1,68	6,17	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
83	8019	PEGA-13/07	2,18	-	12,5	32,54	0,26	4,25	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
84	8020	PEGA-13/07	13,08	-	75	114,48	3,16	12,07	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
85	8021	PEGA-13/07	13,08	-	75	118,32	2,58	12,89	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
86	8022	PEGA-13/07	8,72	-	50	100,47	2,54	11,21	Farklı. Kons. Den. (A Tipi)
87	8023	SOV24 (O)	11,62	14.213	100	281,56	21,73	54,46	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
88	8024	SOV24 (O)	5,81	-	50	191,71	16,74	37,61	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
89	8025	SOV24 (O)	2,91	-	25	129,56	11,11	26,55	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
90	8026	SOV24 (O)	1,45	-	12,5	83,15	8,06	16,07	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
91	8027	SOV24 (O)	1,45	-	12,5	61,71	6,56	11,81	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
92	8028	SOV24 (O)	5,81	-	50	149,83	11,61	29,10	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
93	8029	SOV24 (O)	8,72	-	75	230,25	17,84	44,15	Farklı. Kons. Den. (O Tipi konsantre)
94	8030	PEGO-13/05	3,33	-	25	60,48	5,28	17,51	Farklı Kons. Den. (met. 8, Eski Kolon)
95	8031	PEGO-13/05	1,67	-	12,5	40,75	3,97	4,56	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
96	8032	PEGO-13/05	1,67	-	12,5	33,28	4,32	2,40	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
97	8033	PEGO-13/05	3,33	-	25	37,57	5,38	4,33	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
98	8034	PEGO-13/05	6,66	-	50	64,47	10,03	5,06	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
99	8035	PEGO-13/05	10,00	-	75	90,53	16,31	7,39	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
100	8036	PEGO-13/05	13,33	5640	100	106,16	21,40	9,73	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
101	8037	PEGO-13/05	13,33	5640	100	110,38	23,42	10,06	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
102	8038	PEGO-13/05	10,00	-	75	74,29	16,26	7,11	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
103	8039	PEGO-13/07	74,54	23.948	100	308,23	41,38	61,36	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
104	8040	PEGO-13/07	37,27	-	50	240,82	29,09	47,33	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
105	8041	PEGO-13/07	18,64	-	25	134,69	14,22	25,30	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
106	8042	PEGO-13/07	9,32	-	12,5	86,29	8,95	14,95	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
107	8043	PEGO-13/07	55,91	-	75	293,30	34,08	58,43	Farklı. Kons. D. (O Tipi Fark. seri num.)
109	9001	PEGO-13/07	74,54	23.948	100	1968,48	170,41	382,81	Enjek. H: 0,5 mL, (O, metot 9, fraks.)
111	9003	PEGA-13/07	17,45	9144	100	678,73	16,79	102,03	Enjek. H: 0,5 mL, (A, metot 9, fraks.)

Çizelge 4.6.'da alanları hesaplanan piklerden 3. pik 146 S antijenini içeren pik olarak belirlenmişti. İlerleyen aşamalarda 146 S testi ile yapılacak karşılaştırmalarda 3. pik alanı kullanılacaktır.

4.3.2. Sukroz Gradient yöntemi sonuçları ile hesaplanan pik alanlarının regresyon analizi ile değerlendirilmesi

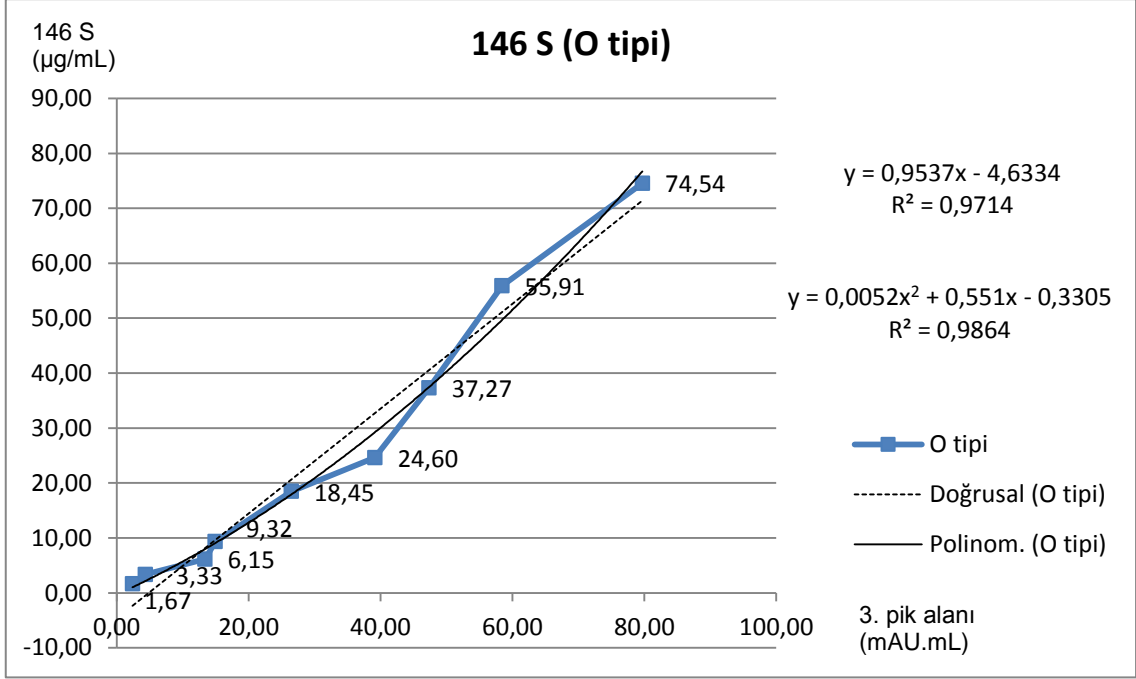
Bu aşamada Şap Enstitüsünde yapılan sukroz gradient yöntemi yani 146 S testi ile yapılan 146 S antijen miktarı sonuçları ile aynı numunenin kromatografi yöntemi ile ayrılan pik alanı karşılaştırılmıştır. Bu aşamada üç basamaklı gradient metodu ile yapılan deney sonuçları kullanılmıştır. Karşılaştırma işlemi ve regresyon analizi Microsoft Excel programının grafik ekleme modülü ile yapılmıştır. Farklı numunelerin 146 S testi değerleri ile 3. pik alanının değerleri karşılaştırılmıştır. A tipi antijen ile O tipi antijen deney sonuçları ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

O tipi antijen deney sonuçlarının değerlendirilmesi

Çizelge 4.7.'de O tipi antijen için kullanılan veriler yer almaktadır. Bu veriler seçilirken farklı seri O tipi antijenleri olmasına dikkat edilmiş ve farklı 146 S değerine sahip olan numune deneylerinin sonuçları seçilmiştir. Grafik çizimine uygun olması için çizelgede veriler küçükten büyüğe dizilmiştir. Şekil 4.17.'de Çizelge 4.7.'deki verilerin grafiği ve regresyon analiz sonuçları bulunmaktadır.

Çizelge 4.7. O tipi antijen numunesi deneyleri grafik verileri

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	Numune (hacimce) (%)	X eksen 3.Pik Alanı (mAU.mL)	Y eksen 146-S (µg/mL)
96	8032	PEGO-13/05	12,5	2,40	1,67
97	8033	PEGO-13/05	25	4,33	3,33
73	8009	PEGO-13/06	25	13,41	6,15
106	8042	PEGO-13/07	12,5	14,95	9,32
76	8012	PEGO-13/06	75	26,48	18,45
77	8013	PEGO-13/06	100	39,15	24,60
104	8040	PEGO-13/07	50	47,33	37,27
107	8043	PEGO-13/07	75	58,43	55,91
66	8002	PEGO-13/07	100	79,71	74,54



Şekil 4.18. O tipi antijen için 3. pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.

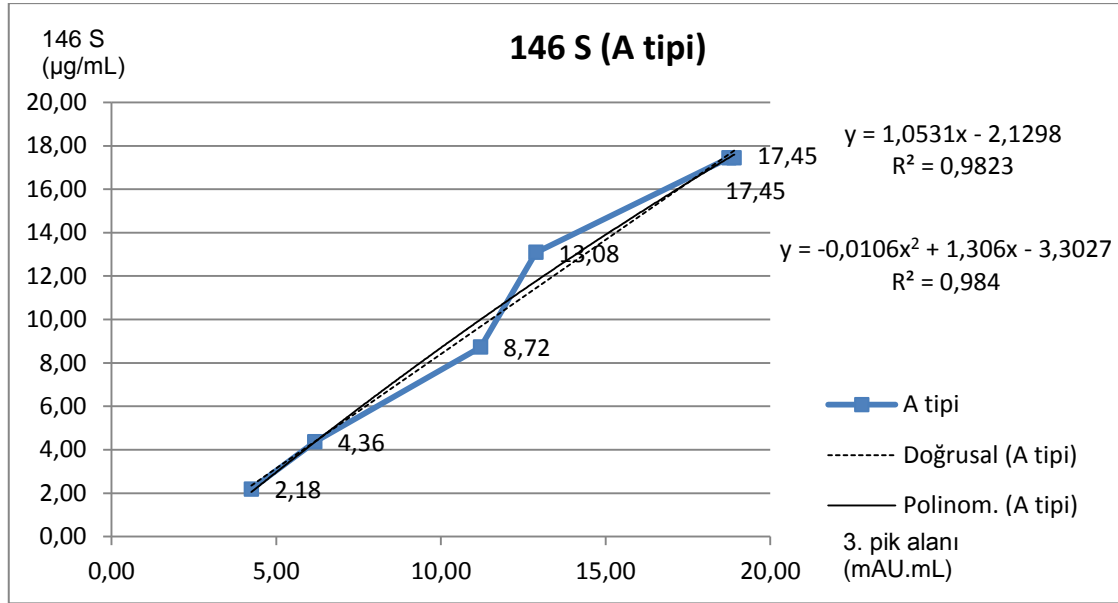
Şekil 4.18.'de görüldüğü üzere veriler karşılaştırılmasında oldukça düzgün ve anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Regresyon analizine göre R^2 değeri, doğrusal denklem ile değerlendirildiğinde 0,9714, 2. dereceden fonksiyon (polinom) ile değerlendirildiğinde ise 0,9864 olmaktadır. Elde edilen bu R^2 değerleri oldukça ideal ve güvenli değerlerdir.

A tipi antijen deney sonuçlarının değerlendirilmesi

Çizelge 4.8.'de A tipi antijen için kullanılan veriler yer almaktadır. A tipi antijen deneylerinin değerlendirmesinde tek bir seri A tipi antijeni ile çalışıldığından (PEGA-13/07) yalnızca o seriye ait veriler kullanılmıştır. Bu seriye ait farklı 146 S değerindeki numune deneylerinin sonuçları seçilmiştir. Şekil 4.19.'da Çizelge 4.8.'deki verilerin grafiği ve regresyon analiz sonuçları bulunmaktadır.

Çizelge 4.8. A tipi antijen numunesi deneyleri grafik verileri

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	Numune (hacimce) (%)	X eksen 3.Pik Alanı (mAU.mL)	Y eksen 146-S (µg/mL)
83	8019	PEGA-13/07	12,5	4,25	2,18
82	8018	PEGA-13/07	25	6,17	4,36
86	8022	PEGA-13/07	50	11,21	8,72
85	8021	PEGA-13/07	75	12,89	13,08
51	4048	PEGA-13/07	100	18,75	17,45
69	8005	PEGA-13/07	100	18,91	17,45



Şekil 4.19. A tipi antijen için 3. pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.

O tipi antijen değerlendirmelerinde olduğu gibi A tipi için de Şekil 4.19.'da görüldüğü gibi oldukça düzgün ve anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. A tipi için regresyon analizine göre R^2 değeri, doğrusal denklem ile değerlendirildiğinde 0,9823, 2. dereceden fonksiyon (polinom) ile değerlendirildiğinde ise 0,984 olmaktadır. A tipi antijen için bu aşamada yapılan çalışmada tek bir serinin farklı derişimdeki numune sonuçları değerlendirildiğinden daha yüksek R^2 sonuçlarına ulaşılmıştır. Elde edilen bu R^2 değerleri oldukça ideal ve güvenli değerlerdir.

4.3.3. Pik alanından 146 S antijeni miktarı hesaplanması

Bir önceki çalışmada 3. pik alanı (x) ile 146 S değeri (y) verilerine göre grafik çizilmiştir. Bu grafikte oluşan eğrinin eğim denklemi Microsoft Excel programı aracılığı ile hem doğrusal olarak hem de 2. derece fonksiyon olarak hesaplanmıştır. Bu denklem ile 'x' değişkeni yerine deney sonucu elde edilen kromatogramın 3. pik alanı değeri koyularak 146 S antijeni miktarı hesaplanabilir. Böylece geliştirilen bu kromatografik test metodu ile 146 S antijen miktarı bulunabilir. Çizelge 4.9. ve Çizelge 4.10.'da O tipi ve A tipi için 3. pik alanına göre 146 S değeri ayrı ayrı hesaplanmış ve gerçek 146 S değeri ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.9. O tipi antijen için hesaplanan 146 S değerleri

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	3.Pik Alanı (mAU.mL)	Hesaplanan 146-S (µg/mL)	Gerçek 146-S (µg/mL)
96	8032	PEGO-13/05	2,40	1,02	1,67
97	8033	PEGO-13/05	4,33	2,16	3,33
73	8009	PEGO-13/06	13,41	7,99	6,15
106	8042	PEGO-13/07	14,95	9,07	9,32
76	8012	PEGO-13/06	26,48	17,91	18,45
77	8013	PEGO-13/06	39,15	29,21	24,60
104	8040	PEGO-13/07	47,33	37,40	37,27
107	8043	PEGO-13/07	58,43	49,61	55,91
66	8002	PEGO-13/07	79,71	76,63	74,54

Çizelge 4.10. A tipi antijen için hesaplanan 146 S değerleri

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	3.Pik Alanı (mAU.mL)	Hesaplanan 146-S (µg/mL)	Gerçek 146-S (µg/mL)
83	8019	PEGA-13/07	4,25	2,05	2,18
82	8018	PEGA-13/07	6,17	4,36	4,36
86	8022	PEGA-13/07	11,21	10,00	8,72
85	8021	PEGA-13/07	12,89	11,77	13,08
51	4048	PEGA-13/07	18,75	17,46	17,45
69	8005	PEGA-13/07	18,91	17,60	17,45

Çizelge 4.9.'da O tipi antijen miktarının hesabı için kullanılan denklem, R^2 değeri yüksek olduğundan ve düşük miktarlarda diğer denkleme göre daha hassas olduğundan 2. derece fonksiyon (polinom) denklemi olarak belirlenmiştir. Geliştirilmiş olan testin 3. pik – 146 S miktarı çevrimi için bu denklemin kullanılması kararlaştırılmıştır. Görüldüğü gibi gerçek değerlere oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.10.'da A tipi antijen miktarı hesabı için de R^2 değeri yüksek olduğundan ve düşük 146 S miktarlarında daha hassas olduğundan 2. derece fonksiyon (polinom) denklemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile A tipi antijen miktarı hesabının gerçek 146 S miktarına daha yakın değerler verdiği görülmektedir.

4.4. Elde Edilen Yeni Kromatografik Test Yönteminin Doğrusallığının Değerlendirilmesi

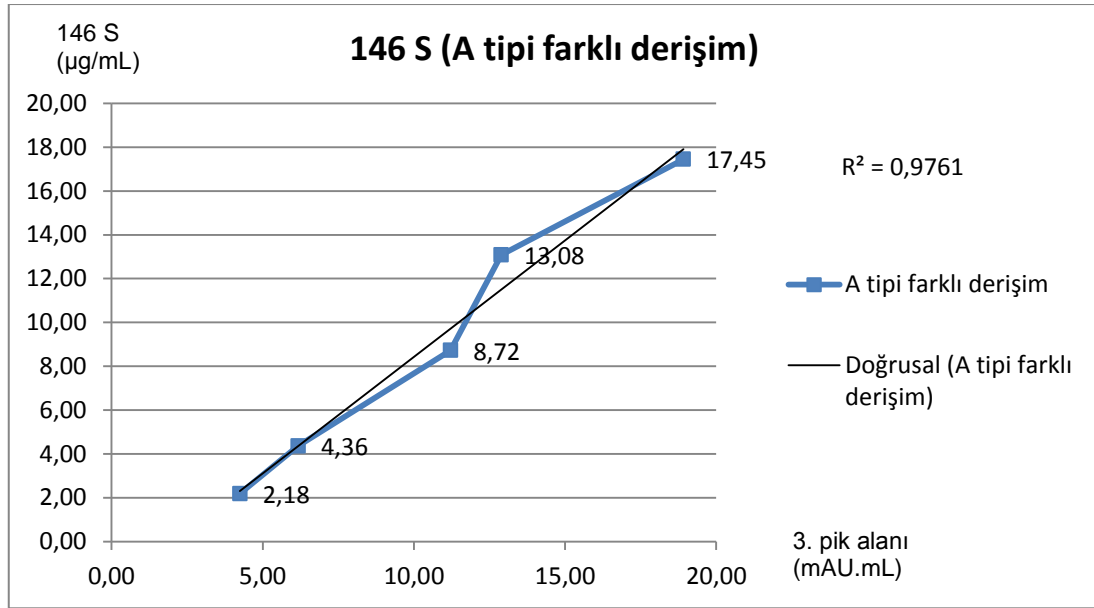
Geliştirilen kromatografik test yönteminin doğrusallığını değerlendirmek için farklı antijen numuneleri ile farklı derişimlerde çalışılmış ve elde edilen kromatogramlardan 3. pik alanı hesaplanmıştır. Deney sonuçları yine Microsoft Excel programı kullanarak regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

4.4.1. Farklı antijen derişimlerinde yapılan deneylerin regresyon analiz sonuçları

Farklı derişim deneyleri için %100, %75, %50, %25 ve %12,5 antijen derişimlerinde numuneler hazırlanmıştır. Bu numuneler HiTrap Q XL 5 mL kolonu ve üç basamaklı gradient metot kullanılarak yürütülmüştür. Elde edilen kromatogramdan 3. pik alanı hesaplanmış ve 146 S değeri ile oluşturduğu grafiğin doğrusallığı incelenmiştir. Aşağıdaki çizelgelerde (Çizelge 4.11., Çizelge 4.12., Çizelge 4.13. ve Çizelge 4.14.) ve grafiklerde (Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22. ve Şekil 4.23) farklı antijen tipleri (A tipi ve O tipi) ve serilerin değerlendirme sonuçları görülmektedir.

Çizelge 4.11. A tipi antijen numunesi için farklı derişim deneyleri grafik verileri

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	Numune (hacimce) (%)	X eksen 3.Pik Alanı (mAU.mL)	Y eksen 146-S (µg/mL)
69	8005	PEGA-13/07	100	18,91	17,45
85	8021	PEGA-13/07	75	12,89	13,08
86	8022	PEGA-13/07	50	11,21	8,72
82	8018	PEGA-13/07	25	6,17	4,36
83	8019	PEGA-13/07	12,5	4,25	2,18



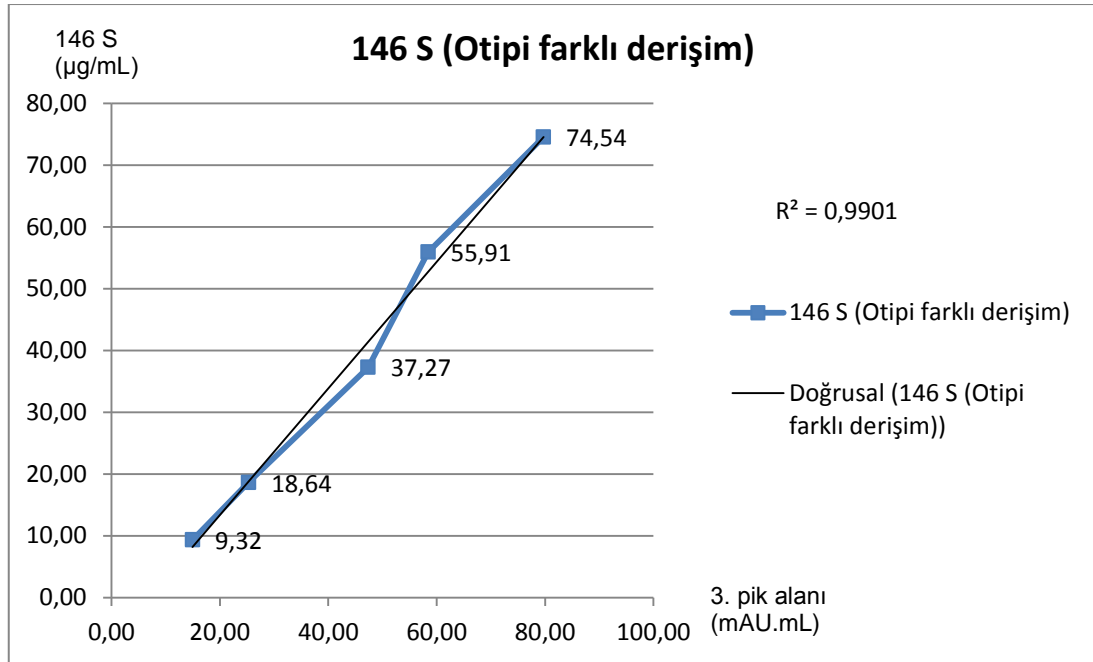
Şekil 4.20. A tipi antijen farklı derişimler için 3. pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.

A tipi antijen için yapılan deney sonuçlarının regresyon analizi Şekil 4.20.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi doğrusallığı oldukça yüksektir. R² değeri Microsoft Excel programı tarafından 0,9761 olarak hesaplanmıştır. Bu değerin oldukça yüksek güvenilirlikte bir değer olduğu kanaatine varılmıştır.

Şekil 4.21.'de O tipi antijenin farklı derişimlerdeki deney sonuçları görülmektedir.

Çizelge 4.12. O tipi antijen numunesi farklı derişim deneyleri grafik verileri

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	Numune (hacimce) (%)	X eksen 3.Pik Alanı (mAU.mL)	Y eksen 146-S (µg/mL)
66	8002	PEGO-13/07	100	79,71	74,54
107	8043	PEGO-13/07	75	58,43	55,91
104	8040	PEGO-13/07	50	47,33	37,27
105	8041	PEGO-13/07	25	25,30	18,64
106	8042	PEGO-13/07	12,5	14,95	9,32



Şekil 4.21. O tipi antijen farklı derişimler için 3. pik alanı, ile 146 S değeri grafiğı ve regresyon analiz sonucu.

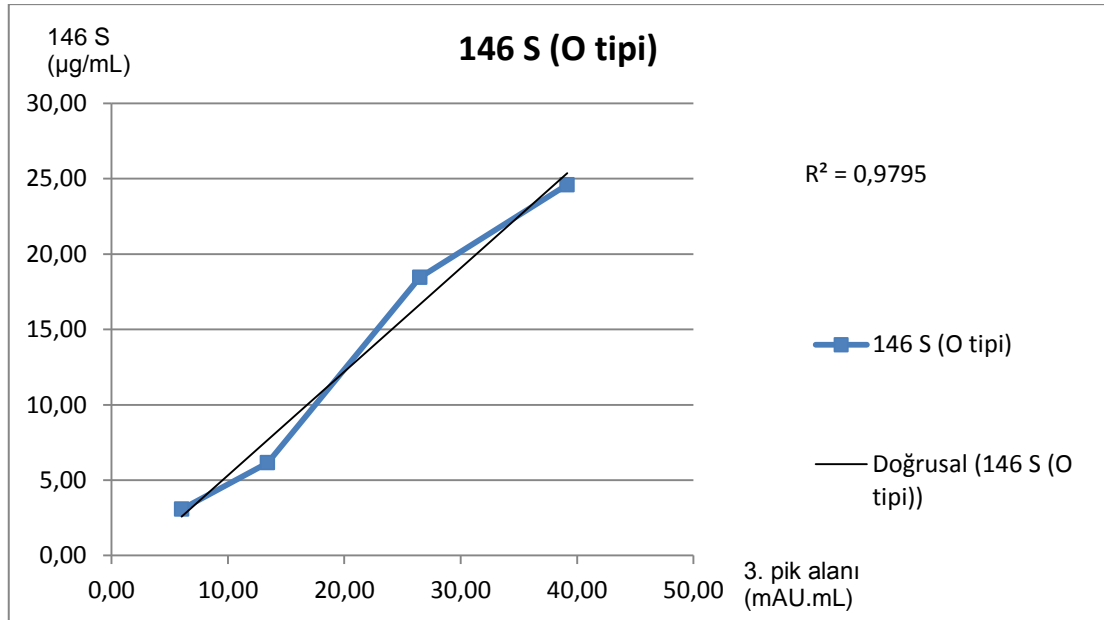
Çizelge 4.12.'deki verilerin Microsoft Excel programı ile grafiğıe dönüşümü ve regresyon analizi Şekil 4.21.'de görölmektedir. O tipi antijen için yapılan bu çalışma sonucunda A tipi antijen çalışmasına göre daha yüksek bir doğrusallık izlenmektedir. Regresyon analizi sonucu elde edilen R^2 değeri (0,9901) oldukça

yüksektir. Bu çalışmadan da görüldüğü gibi geliştirilen test metodu oldukça güvenilirdir.

Aşağıda farklı seri O tipi antijen için farklı derişim deneylerine ait sonuçları içeren çizelge ve şekiller bulunmaktadır.

Çizelge 4.13. O tipi farklı seri antijen numunesi farklı derişim deneyleri grafik verileri

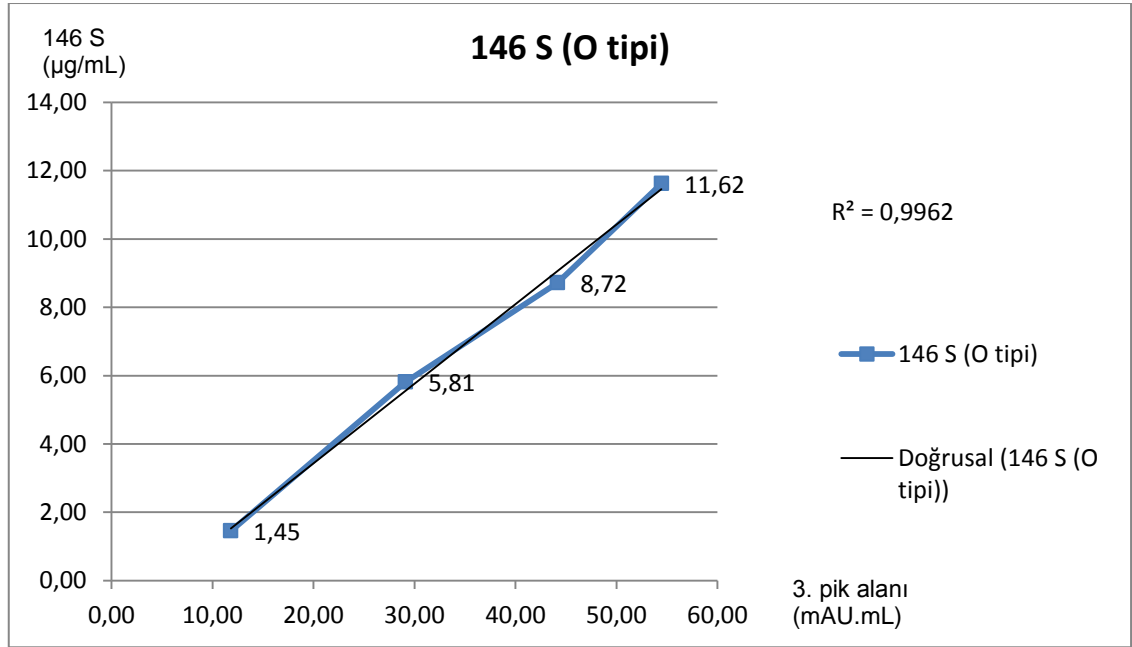
Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	Numune (hacimce) (%)	X eksen 3.Pik Alanı (mAU.mL)	Y eksen 146-S (µg/mL)
77	8013	PEGO-13/06	100	39,15	24,60
76	8012	PEGO-13/06	75	26,48	18,45
73	8009	PEGO-13/06	25	13,41	6,15
74	8010	PEGO-13/06	12,5	6,02	3,08



Şekil 4.22. O tipi farklı seri antijen (PEGO-13/06) farklı derişimler için 3. pik alanı, ile 146 S değeri grafiği ve regresyon analiz sonucu.

Çizelge 4.14. O tipi farklı konsantre antijen numunesi farklı derişim deneyleri grafik verileri.

Den. No	Deney Kodu	Antijen Serisi	Numune (hacimce) (%)	X eksenı 3.Pik Alanı (mAU.mL)	Y eksenı 146-S (µg/mL)
87	8023	SOV24 (O)	100	54,46	11,62
93	8029	SOV24 (O)	75	44,15	8,72
92	8028	SOV24 (O)	50	29,10	5,81
91	8027	SOV24 (O)	12,5	11,81	1,45



Şekil 4.23. O tipi farklı seri antijen (SOV24) farklı derişimler için 3. Pik alanı, ile 146 S değeri grafiğı ve regresyon analiz sonucu.

Şekil 4.22. ve Şekil 4.23.'de gösterilen sonuçlara bakıldığında da oldukça iyi neticeler elde edilmiştir. Hesaplanan R² değerleri yüksektir. Çizelge 4.13.'de %50 derişimdeki antijen deneyi sonucu ile Çizelge 4.14.' de %25 derişimdeki antijen deneyi sonucu anlamsız olduğundan kullanılmamıştır.

4.5. Elde Edilen Sonuçların Tartışılması

Sonuç olarak çalışmayı kısaca özetlersek;

- Q Sepharose XL materyali 146 S antijeninin ayrılması için uygun bir materyaldir.
- FPLC cihazı ile bu ayırım başarılı bir şekilde yapılabilmektedir ve FPLC cihazı geliştirilen test yöntemi için uygun bir cihazdır.
- HiTrap Q XL 5 mL (GE Healthcare) kolonu ile hızlı ve verimli bir şekilde ayırım yapıldığından test yöntemi için uygun bir kolondur.
- Aşağıda belirtilen deney koşulları test yöntemi için en uygun koşullardır.
 - Kolon : HiTrap Q XL 5 mL
 - Akış Hızı : 5 mL /dk
 - Numune Hacmi : 100 µL
 - A Tamponu : 20 mM Tris-HCl, pH :7,50
 - B Tamponu : 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl, pH:7,50
 - Gradient : Basamaklı Gradient
 - Dedektör : UV(254 nm)
- Basamaklı gradient elüsyon metodu ile 146 S antijeni oldukça saf bir şekilde ayrılmaktadır.
- Basamaklı gradient elüsyon ile elde edilen kromatogramdaki 3. basamakta kazanılan 3. pik 146 S partikülüne ait piktir.
- Nükleaz enzimi muamelesinin 146 S pik alanını etkilemediği görülmüştür.
- Kromatogramlardan elde edilen 3. pik alanları ile Enstitüde ölçülen 146 S miktarları grafiksel olarak karşılaştırıldığında oldukça doğrusal ve R^2 değeri yüksek yaklaşımlar elde edilmiştir.
- Geliştirilen test yöntemi ile 146 S antijen miktarı halen Şap Enstitüsü'nde kullanılmakta olan testten daha hızlı ve hatasız olarak ölçülmektedir.

Elde edilen sonuçlar literatürde bulunan benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında literatürde inaktif şap virüsü ile FPLC cihazında iyon değişim yöntemi ve Q Sepharose XL kolonları ile çalışılmadığı görülmüştür. Özduval ve arkadaşlarının HiPrep Q XL 16/10 kolonu çalıştıkları görülmüştür [52]. Ancak çalışma HPLC cihazında yapılmış ve konakçı hücre DNA'sını tespit amaçlanmıştır. Numune olarak da bitmiş ürün, yani antijen-adjüvant karışımı aşı

kullanılmıştır. HPLC ile yapılan deneylerin kromatogramları ile çalışmada elde edilen kromatogramlar karşılaştırıldığında benzerliğinin olmadığı görülmüştür. Bunun nedeninin, farklı cihazlarda çalışılmış olması ve çalışılan numunelerin bir çalışmada ara ürün, diğerinde bitmiş ürün olması olarak değerlendirilmiştir.

Benzer diğer bir çalışmada Spitteler ve arkadaşları 146 S antijen miktarını FPLC cihazı kullanarak jel filtrasyon (size exclusion) kromatografisi yöntemi ile tespit etmeye çalışmışlar ve konakçı hücre DNA'sının olumsuz etkisini bertaraf etmek için nükleaz enzimi kullanmışlardır [4]. Bu sonuç çalışmamızla karşılaştırıldığında iyon değişim kromatografisi ile DNA moleküllerinin de ayrıldığı düşünülmektedir. Çünkü nükleaz enzimi kullanıldığında herhangi bir etki görülmemiştir.

Sunulan tez çalışmasında iyon değişim kromatografisi yöntemi ile şap virüsü antijeni (146 S partikülü) başarılı bir şekilde ayrılmıştır. FPLC cihazı ile çalışılmış olup kolon olarak Q Sepharose XL kolonları kullanılmıştır. Deneylerde çalışılan numunelerin başarılı bir şekilde ayrıldığını RT-PCR test sonuçları ispatlamaktadır. 146 S antijeninin miktarının pik alanından hesaplanabileceği öngörülmüş ve bu paralellikte çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak piklerin alanları hesaplanmış ve Şap Enstitüsünde yapılan sukroz gradient santrifüj yöntemi ile tespit edilmiş 146 S değerleri ile karşılaştırılmıştır. 146 S piki alanı ile 146 S değerleri eşleştirilmiş ve grafiğe dökülmüştür. Microsoft Excel programı ile grafiklerin doğrusallığı değerlendirilmiştir. Bulunan yüksek R² değerleri ile test yönteminin doğrusallığının ve güvenilirliğinin yüksek düzeyde olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmalarda elde edilen sonuçlardan bazılarının anlamsız olduğu görülebilir. Örneğin farklı numunelerin 146 S değerlerine göre 3.pik alanının beklenen paralellikte olmadığı görülebilmektedir. Bu olumsuzluklar birkaç nedene bağlanabilir.

- 1- Kesin 146 S miktarı bilinen referans bir numunenin bulunmaması nedeni ile Şap Enstitüsünde yapılan sukroz gradient santrifüj yöntemine güvenilmiş ve bu test sonuçları geliştirilecek olan yöntem referans olmuştur.

- 2- Şap Enstitüsünde sukroz gradient santrifüj yöntemi ile yapılan 146 S testinin sonuçlarının değişken olması; testin, yapan kişilere, kullanılan cihaza, sukroz çözeltisine ve UV' ye göre farklı sonuçlar verebilmesi.
- 3- Deney esnasında numuneler içerisindeki antijen miktarının zamanla azalması. Bu sıkıntıdan en az etkilenmek için art arda yapılan deneylerde beklemeler esnasında numuneler buz kalıpları içerisinde muhafaza edilmiştir.
- 4- FPLC cihazının UV lambasının zaman zaman UV' stabil olamaması.

5. GENEL SONUÇLAR

Şap hastalığı bir ülkenin hayvansal ürün (et, süt, deri vb.) ticaretini doğrudan etkileyen ekonomik önemi büyük bir hastalıktır. Öyle ki Türkiye'nin Avrupa Birliğine üyeliği müzakerelerinde uyum süreci paketleri arasında adı geçen bir hastalıktır [64]. Şap hastalığı salgın bir hastalık olması ve çok büyük ekonomik kayıplara neden olmasından dolayı mücadelesi çok önemlidir. Hastalıkla mücadelenin en önemli aşamalarından birisi aşılama yapmaktır. Bu nedenle aşı üretimi çok büyük önem arz etmektedir. Şap Enstitüsü'nde Türkiye'nin ihtiyacı olan şap aşısının hemen hemen tamamı üretilmektedir. Şap aşısının üretim prosesi birçok aşamaları içerir ve oldukça zordur. Üretim tesisinin işletme maliyetleri de fazladır. Üretim prosesinde 146 S antijen titresi proses verimliliğinin nihai göstergesidir. 146 S antijeni miktar tayini testinin doğruluğu çok önemlidir. Yanlış ölçülen bir değer (olduğundan az veya çok) iki açıdan da çok kritiktir. Olduğundan çok ölçülen bir değer nihai ürün aşının içerisinde yeteri miktarda antijen olmamasına, dolayısıyla aşının korumamasına neden olur. Olduğundan az ölçülen değer ise gereğinden çok antijen kullanılmasına, dolayısıyla ekonomik zarara neden olacaktır.

Bu çalışma ile Şap Enstitüsünde kullanılan ve birçok zorlukları olan 146 S testine alternatif veya bu testin doğrulaması olabilecek bir test yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilmiş olan bu test çok daha hızlı, uygulaması kolay ve operatör hatalarından daha az etkilenen bir testtir.

Çalışma ile şap virüsü antijeni iyon değişim kromatografisi yöntemi ile başarılı bir şekilde ayırılmıştır. Q Sepharose XL kolon materyalinin şap virüsü ayırımı için ideal bir matriks olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile sadece bir test yöntemi geliştirilmiş olmamaktadır. Aynı zamanda Şap Enstitüsü Müdürlüğü üretim prosesi steril dolum aşamasından önceki aşaması olan antijen saflaştırma işlemi için gerekli olan kolon kromatografi yönteminin geliştirilmesine de ışık tutacak bir çalışma gerçekleştirilmiş ve gelecekteki yapılması planlanan bu aşama için bir pilot çalışma olmuştur. İnaktif viral aşı prosesleri incelendiğinde (grip aşısı vb.) antijen saflaştırma işleminin son basamağı olarak kolon kromatografinin

uygulandığı görülür [61]. Özellikle de endüstriyel uygulamalar için ideal ve diğer kromatografik yöntemlere göre daha az maliyetli olduğundan iyon değişim kromatografisi yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Şap Enstitüsü de prosesine bu aşamayı dahil etmek istediğinde bu çalışmadan faydalanabilecektir.

Avrupa'da bulunan şap aşısı üreten tesisler benzer kromatografik yöntemlerini kesinlikle paylaşmadıklarından, bu çalışma ile Şap Enstitüsü'nde antijen saflaştırılması için önemli bir yapma bilgisi (know-how) elde edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmanın neticesinde aşağıda ön görülen beklentilere ulaşılmıştır.

- Viral antijen miktarı ölçümü için geçerli ve doğruluğu yüksek,
- Uygulaması daha kolay ve daha hızlı,
- Personel hatalarının ve personele bağımlılığın en az,
- Aşı formülasyonundaki antijen miktarının daha spesifik ve daha hassas ölçülmesiyle aşının etkinliğinin yüksek veya gereksiz yere fazla miktarda antijenin kullanılmasının önleyerek maliyet artışının önüne geçen,
- İleride yapılması planlanan büyük ölçekli antijenlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması çalışmaları için yol gösterici niteliğinde kromatografik bir test yöntemi geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Racaniello, V. R., *Picornaviridae: The viruses and their replication*. In: Fields Virology, 5th Edition, Vol. I, Knipe, D. M., Howley, P.H. (eds), Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. pp. 795-838, **2007**.
- [2] Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution, *Nature*. 23:337(6209), 709–716, **1989**.
- [3] OIE, (Office International des Epizooties/World Organization for Animal Health), Foot-and-mouth disease, Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Vol 1, Pt 2, Chapter.2.1.5. available at: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.01.05_FMD.pdf, (**Mart 2009**).
- [4] Spitteler M.A., Fernández I., Schabes E., Krimer A., Régulier E.G., Guinzburg M., Smitsaart E., Levy M.S., Foot and Mouth disease (FMD) virus: Quantification of whole virus particles during the vaccine manufacturing process by size exclusion chromatography, *Vaccine*. 22;29(41):7182-7. **2011**.
- [5] Tuncer M., *Protein Safılaştırma 1: Kromatografik Teknikler*, Mersin Üniversitesi yayını, **2008**..
- [6] Grubman, M.J., and Baxt, B., Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 17 (2), 465–493, **2004**.
- [7] Fenner, F.J. et al., *Veterinary Virology*, Academic Press, New York, N.Y. p 403-430, **1993**.
- [8] Doel, T.R., FMD vaccines. *Virus Research*. 91, 81-99, **2003**.
- [9] Stram, Y., Molad T., Chai, D., Gelman, B., Yadin, H., Detection and subtyping of foot-and-mouth disease virus in infected cattle by polymerase chain reaction and amplified VP1 sequencing. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 52-55, **1995**.
- [10] Racaniello, V.R., *Picornaviridae: The viruses and their replication*, Fields Virology, 4th edn., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Riezman B. and Straus S. E., (eds.), Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 685–722, **2001**
- [11] Curry, S. et al., Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity, *Structure* 4, 135–145, **1996**.
- [12] Sobrino, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M.A., Núñez J.I., Rosas, M.F., Baranowski, E., Ley, V., Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet. Res.* 32, 1–30, **2001**.
- [13] Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P.V., McGinn, B., Rowlands, D.J., Brown, F., The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J. Gen. Virol.*, 70, 625–637, **1989**.

- [14] Rueckert, R.R., *Picornaviridae: the viruses and their replication*, Fields virology, 3rd edn., Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa, 609–654, **1996**.
- [15] Brown, F., Antigenic structure of foot-and-mouth disease virus, *Immunochemistry of Viruses: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines*, Regenmortel M.H.V., Neurath, A.R., (eds), *Elsevier*, 265–280, **1985**.
- [16] Bachrach H. L., “Foot-and-mouth disease,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 22, pp. 201–244, **1968**.
- [17] Leforban, Y., Prevention measures against foot-and- mouth disease in Europe in recent years, *Vaccine*, 17, 1755–1759, **1999**.
- [18] Ergin, G., *Şap Virüsü Üretiminin Dolgulu Reaktörlerde Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [19] R’emond M., Kaiser C., and Lebreton F., “Diagnosis and screening of foot and mouth disease,” *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 25, no. 5-6, pp. 309–320, **2002**.
- [20] Traub E. and Mohalman H., “Foot-and- mouth disease typing with complement fixation test first communication. Experiment with serum and antigen of guinea pigs,” *Zentbl Bakteriöl Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig*, vol. 150, pp. 289–300, **1943**.
- [21] Darbyshire H., Hedger R. S., and Arrowsmith E. M., “Comparative complement-fixation studies with subtype strains of foot-and-mouth disease virus,” *Journal of Hygiene*, vol. 70, no. 1, pp. 171–180, **1972**.
- [22] Ferris N. P. and Dawson M., “Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases,” *Veterinary Microbiology*, vol. 16, no. 3, pp. 201–209, **1988**.
- [23] House C. and House J. A., “Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines,” *Veterinary Microbiology*, vol. 20, no. 2, pp. 99–109, **1989**.
- [24] Revenson and Segura M., “Multiplication of foot-andmouth disease virus in roller tube culture BHK-21 cells of hamster kidney,” *Revenue Canada Investigation*, vol. 18, pp. 293–299, **1963**.
- [25] Sellers R. F., “Growth and titration of the viruses of foot-and mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures,” *Nature*, vol. 176, pp. 121–124, **1955**.
- [26] Nair S. P., “Studies on the susceptibility and growth pattern of foot-and-mouth disease virüs vaccine strains in two pig kidney cell lines,” *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, vol. 8, no. 2, pp. 76–81, **1987**.
- [27] Mishra N., Rai D. V., and Pattnaik B., “Strain differentiation of foot-and-mouth disease virus type ‘Asia1’,” *Indian Journal of Animal Sciences*, vol. 65, pp. 368–375, **1995**.

- [28] Goel A. C. and Rai A., "Growth curve, plaque assay and inactivation studies of FMD virüs subtypes O5, O1 and O6 of Indian origin," *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, vol. 6, no. 1, pp. 16–28, **1985**.
- [29] Barteling S. J., Wagenaar F., and Gielkens A. L.J., "The positively charged structural virus protein (VP1) of foot-and-mouth disease virus (type O1) contains a highly basic part which may be involved in early virus-cell interaction," *Journal of General Virology*, vol. 62, no. 2, pp. 357–361, **1982**.
- [30] Abu Elzein E. M. E. and Crowther J. R., "Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot-and-mouth disease virus research," *Journal of Hygiene*, vol. 80, no. 3, pp. 391–399, **1978**.
- [31] Crowther R. and Abu Elzein E. M. E., "Application of the enzyme linked immunosorbent assay to the detection and identification of foot-and-mouth disease viruses," *Journal of Hygiene*, vol. 83, no. 3, pp. 513–519, **1979**.
- [32] Ouldridge E. J., Barnett P., and Rweyemamu M. M., "The relative efficiency of two ELISA techniques for the tritration of FMD antigen," *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, vol. 22, pp. 142–151, **1982**.
- [33] Have P., Lei J. C., and Schjerning-Thiesen K., "An engyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the primary diagnosis of foot-and-mouth disease: characterization and comparison with complement fixation," *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, vol. 25, no. 2, pp. 280–296, **1984**.
- [34] Grubman M. J. and Baxt B., "Foot-and-mouth disease," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 2, pp. 465–493, **2004**.
- [35] Mullis K. B. and Faloona F. A., "Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase-catalyzed chain reaction," *Methods in Enzymology*, vol. 155, pp. 335–350, **1987**.
- [36] Rodriguez A., Nunez J. I., Nolasco G., Ponz F., Sobrino F., and De Blas C., "Direct PCR detection of foot-and-mouth disease virus," *Journal of Virological Methods*, vol. 47, pp. 345–349, **1994**.
- [37] Moonen P., Boonstra J., Hakze-van der Honing R., Boonstra-Leendertse C., Jacobs L., and Dekker A., "Validation of a LightCycler-based reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of foot-and-mouth disease virus," *Journal of Virological Methods*, vol. 113, no. 1, pp. 35– 41, **2003**.
- [38] Moss A. and Haas B., "Comparison of the plaque test and reverse transcription nested PCR for the detection of FMDV in nasal swabs and probang samples," *Journal of Virological Methods*, vol. 80, no. 1, pp. 59–67, **1999**.
- [39] Hoffmann B., Beer M., Reid S. M. et al., "Areviewof RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health," *Veterinary Microbiology*, vol. 139, no. 1-2, pp. 1–23, **2009**.
- [40] Callahan J. D., Brown F., Osorio F. A. et al., "Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of

- foot-and-mouth disease virus," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 220, no. 11, pp. 1636–1642, **2002**.
- [41] Bustin S. A., Benes V., Nolan T., and Pfaffl M.W., "Quantitative real-time RT-PCR—a perspective," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 34, no. 3, pp. 597–601, **2005**.
- [42] Reid S. M., Ferris N. P., Hutchings G. H., Samuel A. R., and Knowles N. J., "Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction," *Journal of Virological Methods*, vol. 89, no. 1-2, pp. 167–176, **2000**.
- [43] Guha S., Leonard F., Brorson K. A., Tarlova M. J., Zachariah M. R., Evaluation of electrospray differential mobility analysis for virus particle analysis: Potential applications for biomanufacturing *Journal of Virological Methods* 178, 201– 208, **2011**.
- [44] Leonard F., Daniel I. Lipin, De-Hao Tsai, Michael R. Zachariah, Linda H.L. Lua, Michael J. Tarlov, Anton P.J. Middelberg, Quantitative characterization of virus-like particles by asymmetrical flow field flow fractionation, electrospray differential mobility analysis, and transmission electron microscopy, *Biotechnology and Bioengineering DOI* 10.1002/bit.22085, **2008**.
- [45] Fraenkel Conrat H, Kimball P.C., Levy J.A, *Virology Second Ed.* Prentice Hall New Jersey, **1988**.
- [46] Dulbecco R. Ginsberg H.S, *Virology Second Edition* Lippincott Company Philadelphia, **1988**.
- [47] Pease L. Physical analysis of virus particles using electrospray differential mobility analysis, *Trends in Biotechnology*, Vol.30 No:4, **2012**.
- [48] Denizli A. Küfrevioğlu Ö.İ., *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, **2010**.
- [49] Bahnemann, H.G., Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its applications for vaccine production, *Archives of Virology*, 47, 47-56, **1975**..
- [50] Atha, D.H., Ingham, K.C., Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in term of excluded volume, *Journal of Biological Chemistry*, 256, 12108-12117, **1981**.
- [51] Wagner, G.G., Card, J.L., Covan K.M., Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VII. Characterisation of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation, *Archiv fur die gesamte Virusforschung*, 343, 352, **1970**.
- [52] Özdural, A. R., Tanyolaç, D., Özdural, N., Şap aşısı üretiminde aşı popülasyonundaki muhtemel yan etkileri önlemek amacıyla virus saflaştırılması: Konvansiyonel tanjant akış filtrasyonu ile akuple sürekli annular kromatografi sisteminin tasarım ve işletme parametrelerinin tespiti, *Tubitak* ,Proje No: 105T510, **2009**
- [53] Weggeman M., Van Corven E.J.J.M., Virus purification methods, United States, Patent Application Publication, Pub.No:US20070207461A1, **2007**.

- [54] Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Sukroz yoğunluk gradient santrifügasyon yöntemi (146 S testi) protokolü, Ankara, **2010**.
- [55] Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Şap hastalığının Real Time RT-PCR ile teşhisi ve serotiplendirilmesi protokolü, Ankara, **2010**.
- [56] Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Şap Hastalığı'nın antijen ELISA ile teşhisi ve tip tayini protokolü, Ankara, **2010**.
- [57] Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Mikro-komplement fiksasyon (mComplement fixation test, mCFT) protokolü, Ankara, **2010**.
- [58] Şap Enstitüsü Müdürlüğü, BCA (Bicinchoninic acid) yöntemi ile toplam protein tayini protokolü, Ankara, **2010**.
- [59] Eriksson K., Elizabeth A., Palladino J., Herzer S., Moore P., Davis A.R., Rapid adenovirus purification using Q Sepharose XL, https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28405692AA_20110831103657.pdf (Mayıs **2012**).
- [60] Agustin A., Del Cainizo N., Mazza M., Bellinzoni R. and Cascone O., Foot and Mouth disease virus concentration and purification by affinity chromatography, *Appl Biochem Biotechnol.* 61(3):399-409, **1995**.
- [61] Purifying human influenza virüs vaccine – owards a generic strategy https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdoc11000846_p20-21_20110831034336.pdf (Mayıs, **2012**).
- [62] Purify Selection Guide (Kolon seçim Klavuzu) <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-uk/service-and-support/purify-web-app?GUID=MTM4MDk5OQ%3d%3d> (Haziran, **2012**).
- [63] Real-Time PCR Applications Guide, Bio-Rad Laboratories, 39s, 2006, http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf (Mayıs, **2015**)
- [64] Commission Staff Working Paper, EU FMD http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/eufmd_workingpaper.pdf (Nisan, **2015**).

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ali DEMİRTAŞ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Yılı : 1979
Medeni Hali : Evli
E-posta : alid@sap.gov.tr
Adresi : Şap Enstitüsü Müdürlüğü Çukurambar Mah.
Dumlupınar Bulvarı No:35 Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lisans : 1995-2000 Uludağ Üniversitesi Müh. Mim. Fak. Makine Müh.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, İyi

İş Deneyimi :

1996 – 2001 Kars Tarım İl Müdürlüğü, Veteriner Sağlık Teknisyeni
2001 – 2004 Ankara TEDGEM, Makine Mühendisi
2004 – Devam Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Makine Mühendisi

Deneyim Alanları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar