

**ARABIDOPSIS THALIANA BİTKİSİNDE SİTOKİNİN SİNYAL YOLLARINDA
GÖREV ALAN AHP1 PROTEİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKORLARIN
ÜRETİMİ, SEÇİMİ VE KARAKTERİZASYONU ***

*Production, selection and characterization of monoclonal antibodies against AHP1
protein that has function in Arabidopsis thaliana signaling pathway*

Ş. Ersen KOLDEMİR
Kimya Anabilim Dalı

S. Seyhan TÜKEL
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada *Arabidopsis thaliana* bitkisinde sitokinin sinyal yollarında görev alan AHP1 proteinine karşı monoklonal antikorlarının üretimi, seçimi ve immünoanalizi yapılmıştır. Monoklonal antikorlar Ni Sepharose yüksek performanslı kromatografi kolonu kullanılarak monoklonal antikorlar saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen monoklonal antikorların karakterizasyonu ELISA ve Western Blot teknikleri kullanılarak incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda üç monoklonal antikorun monospesifik, diğer iki monoklonal antikorun ise polispesifik karakterde olduğu tespit edilmiştir. İzotipleme yöntemi ile monoklonal antikorların IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGM ve IgGA ikincil antikorları ile etkileşimi incelenerek; monoklonal antikorların ikincil antikordardan hangisi ile daha iyi reaksiyon verdiği absorbans değerlerinin kıyaslanmasıyla belirlenmiştir. Monoklonal antikorlar kaba özütler üzerinde denenerek monospesifik karakterli antikordardan ikisinin sadece AHP1 proteiniyle reaksiyon verdiği, diğer monospesifik karakterli monoklonal antikorun AHP1 proteininin yanı sıra AHP6 proteiniyle çapraz reaksiyon verdiği, polispesifik karakterli antikorların ise AHP1,2,3,4,5,6 proteinleriyle reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Monoklonal antikordara hassasiyet testi yapılarak monoklonal antikorların seyreltme oranları hesaplanmıştır. Monoklonal antikordardan birisinin epitop haritalandırılması gerçekleştirilmiştir. AHP1 antijeninin bu monoklonal antikora KVDPHVHQLK epitopu üzerinden bağlandığı MS/MS spektrofotometrisi ile belirlenmiştir

Anahtar Kelimeler: AHP1 proteini, sitokininin sinyal yolları, monoklonal antikor.

ABSTRACT

In the present study; production, selection and characterization of monoclonal antibodies against AHP1 protein that has function in *Arabidopsis thaliana* signaling pathway are completed. Monoclonal antibodies are purified by using Ni Sepharose high performance chromatography column. Monoclonal antibodies were characterized by using ELISA and Western Blot techniques and three of them are classified as monospesific and two of them classified as polyspecific. Using by isotyping method; monoclonal antibodies are tested on IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGM and IgGA (secondary antibodies) to find out which

* Yüksek lisans-MSc Thesis

secondary antibody gives best reaction with antibodies. Antibodies are tested on crude extracts and as a result; two of the monospecific antibodies are only specific to AHP1 protein, other monospecific antibody is specific to AHP1 and has cross reaction with AHP6 and polyspecific antibodies are specific to AHP1,2,3,4,5,6 proteins. Sensitivity test is used for each antibodies and best dilutions are calculated. Besides these epitope mapping is completed. According to MS/MS analysis; AHP1 protein is bounded to one of the antibody on KVDPHVHQLK epitope.

Key Words: AHP1, cytokinin signal pathway, monoclonal antibody

Giriş

Sitokininler, bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde pek çok etkisi olan bitki hormonlarıdır. Hücre bölünmesi, sürgün başlatma, yaprak ve kök farklılıkları, kloroplast biyogenez ve yaşlanmayı etkilemektedirler. (Hwang, 2001)

Arabidopsis thaliana bitkisindeki sitokinin sinyali kısaca şöyle gerçekleşir: Sitokinin; hibrid sensörünün kinaz bölümü üzerinde bulunan histidin artığının oto fosforilasyonunun gerçekleştiği hücre zarı üzerinde algılanır. Bunun ardından fosforil grubu, sensörün alıcı bölümüne dahil olan aspartat artığı üzerine transfer olur. Bunu; fosforil grubunun AHP proteini üzerinde bulunan histidin artığına moleküller arası transferi izler. Aktive edilmiş AHP çekirdeğe doğru yer değiştirir ve fosforil grubunu yanıtlayıcı düzenleyicideki (ARR) aspartat artığına transfer eder. B tipi ARR alıcı bölüm kendi transkripsiyonunun gerçekleşmesini engeller. Fosforilasyon üzerindeki bu baskı sonucu B tipi ARR'lar, A tipi ARR'ların ve diğer birincil yanıtlayıcı genlerin ekspresyonunun artmasını sağlar. A tipi ARR'lar sitokinin sinyalinin iletimine negatif yönde etki eder ve kendi transkripsiyonlarını gerçekleştirir. ARR4; karanlıktan gelen PhyB'nin negatif yönde regüle edildiği, ışığın bulunduğu ortamda birikir. (Ferreira ve Kieber, 2005)

Monoklonal antiokor üretimi aşamasında hibritleştirme teknolojisi kullanılarak lenfosit ve miyelom hücreleri füzyona uğradığında, oluşan hibritler hem önceden belirlenmiş özgünlüğe sahip antikörleri üretebilme özelliğine hem de sürekli büyüme özelliğine sahip olabilmektedirler. İmmunoglobulinleri üretebilen ve kültür ortamında yaşamalarını sürdürebilme yeteneğine sahip hibritleşmiş hücreleri elde etmek için immunize konakçının (örn, fare) dalak hücreleri miyelom hücreleri ile füzyona uğratılır. Dalak hücreleri arasındaki antikör üretebilen B lenfositler hibritleşmiş hücrelere immunoglobulin sentezleyebilme yeteneğini sağlayan hücrelerdir. B lenfositlerle füzyona uğrayan miyelom hücreleri (aynı türden alınmış miyelom hücreleri) ise hibritleşmiş hücrelere ölümsüz olma özelliğini sağlamaktadırlar. Miyelom hücreleri purin nukleotid biyosentezinde yan yolda görev alan bir enzim olan hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT) enzimini kodlayan gende bir mutasyona sahiptir. Füzojen (örneğin polietilen glikol, PEG) kullanılmasıyla komşu miyelom hücrelerindeki ve / veya antikör salgılayan hücrelerdeki plazma membranları kaynaştırılırlar, ve iki veya daha fazla çekirdekli tek bir hücre oluşur. Bunu takip eden mitoz aşamasında kromozomlar kardeş hücrelere ayrılırlar. Hibritleşmiş hücreler hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT)

içeren ortamda kültüre edilir. Aminopterin DNA ve RNA sentezi sırasında ana yolları engeller. Sentezin gerçekleşmesi ise RNA yolu için hipoksantin, DNA yolu için timidinin varlığıyla olur. Miyelom hücrelerinde HPRT enziminin olmaması nedeniyle miyelom hücreleri HAT içeren ortamda büyüyemezler ve füzyona uğramamış miyelom hücreleri ölürler. B hücreleri ürün oluşumunu sağlamak için yan yolu kullanılabilecek yapıdadırlar ancak kültürde uzun süre canlı kalamazlar. Bu nedenle sadece proliferasyon yapan hücreler hibritleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler tek hücreli klonlar oluşturmak üzere klonlanabilirler. Ve bu klonlar antijenik etkenlere karşı direkt etkili olabilecek monoklonal antikolar oluşturur.

Materyal ve Metod

Materyal

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck, Fluka ve Sigma-Aldrich firmalarından sağlanmıştır.

Araç ve Gereçler: Spektrofotometre (Spectronic Unicam), Mini-Protean 3 aparatı, PowerPac Basic güç kaynağı (bio-Rad), Power Pac P25 güç kaynağı (Biometra), "semidry" elektrottransfer aparatı: Fast blot 33 (Biometra), Biometra WT 12, Mikrotiter plakaları için Spektrofotometre – Sunrise (Tecan), Thermomixer 5437 (Eppendorf), karıştırıcı inkübatör Multitron II (HT Infors), FPLC ÄKTA, Frac-950 (GE Healthcare), Hiload 16/60 Superdex-75 (GE Healthcare), Ultrasantrifüj cihazı J-301 (Beckman), Ultrasonik Sonikatör UP 100 H prob MS/ (Hielscher), PVDF membran (Immobilon™), mikrolaka (Sarstedt), Ni Sepharose High Performance kolonu (Amersham Bioscience), santrifüj filtrasyon kolonu Amicon® Ultra-4 30 000 NMWL (Milipore).

Metod

Protein Tayini

Protein derişiminin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Bu yöntem için gerekli kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için standart olarak saf BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. Seyreltilmiş lizat veya saflaştırılmış proteinin 10mL'si alınır. Reaksiyon karışımı 790 mL saf su ve 200 mL Bradford Coomassie Brilliant Blue Protein eklenir. Karışım iyice karıştırılır ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 595nm dalga boyunda absorbansı ölçülür. Örneğin protein derişimi kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanır.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Örneklerin SDS-PAGE analizleri için Laemmli (1970) tarafından bildirilen yöntem bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır.

Alt jelin bileşimi: Bis-akrilamid çözeltisi (% 30), 2500 µL; Jel tamponu (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 1250 µL; saf su, 1200 µL; SDS (%10), 50 µL; Amonyum persülfat (% 10), 50 µL; TEMED (Hazır Çözelti), 3 µL.

Karışım iyice karıştırılır ve daha önce hazırlanmış iki cam arasına doldurulur. Yukarıdan 2,5 cm boşluk bırakılır. Oksijenle reaksiyonunun engellenmesi için su eklenir ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için bekletilir.

Üst jelin bileşimi: Bis-akrilamid çözeltisi (% 30), 250 µL; Jel tamponu (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 400 µL; saf su, 800 µL; SDS (%10), 16 µL; Amonyum persülfat (% 10), 25 µL; TEMED (Hazır Çözelti), 1 µL.

Oksijenle tepkimeyi engelleyen su çıkarılır. Üst jel için hazırlanan karışım eklenir. İstenilen sayıda kuyucuğa uygun tarak takılır. Polimerizasyon işlemi için en az 20 dakika beklenir. Yürütücü tampon olarak 25mM Tris-Cl pH 8,3, 192 mM glisin, % 0,1 SDS'den oluşan çözelti kullanılır. Elde edilen örnekler 200 mM TrisCl pH 6,8, 400 mM DTT, % 8 SDS, % 0,4 bromfenol mavisi, % 35 gliserol'den oluşan çözelti 4:1 oranında eklenir, vortekslenir ve 95°C'de 10 dakika inkübe edilir. Hazırlanan örnekler kuyucuklara enjekte edilir. Güç kaynağı 25mA'e ayarlanır ve örnekler 1 saat süresince yürütülür. Elektroforez işlemi sonunda jeller comassie brilliant blue ile boyanır veya Western Blot analizinde kullanılır.

Western-Blot Analizi

PVDF membran kağıtları kesilerek hazırlanır. Membran kağıdının hidrofobik özelliğini azaltmak için metanol içerisinde 15 dakika inkübe edildikten sonra 10 dakika transfer çözeltisinde bekletilir. Elektrotransfer cihazının anot kısmından başlamak koşuluyla sırasıyla; iki filtre kağıdı, membran, jel ve iki filtre kağıdı konularak membranın cm²'sinden 2mA'lik akım geçecek şekilde akım uygulanır ve başlangıç voltajı 100-120V arasında olmalıdır. Proteinlerin membrana transferinin tamamlanmasından sonra membran bir gece hazırlanan bloklama çözeltisi (TBST(50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl,, % 0,1 Tween-20) içerisinde% 5'lik süt (100 mL için 5 g süt tozu + 95 g TBST)) içerisinde bekletilir. Gün aşımından sonra çözelti ortamdan uzaklaştırılır ve birincil (üretilen monoklonal antikorlar) antikor membrana eklenir. Oda sıcaklığında 1 saat süren inkübasyon işleminden sonra TBST çözeltisi ile membran 3 kere beşer dakikalık sürelerle yıkanır. Daha sonra membran uygun oranda (1/20) TBST çözeltisi ile seyreltilmiş ikincil antikor(alkalin fosfat ile konjuge edilmiş anti-fare IgG serumu) eklenir ve bir saat inkübe edilir. Membran tekrar aynı şekilde yıkanır. 30 mL belirleme (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) çözeltisi eklenir ve 10 dakika inkübe edildikten sonra karanlık odada taze hazırlanan kromojenik substrat (30 mL belirleme çözeltisi, 150 µL NBT (4-nitroblue tetrazolium, konsantrasyonu %70 DMF içerisinde 100 mg/mL), 100 µL BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate, konsantrasyonu %100 DMF içerisinde 50 mg/mL)) eklenir. 5 dakika içerisinde sonuç elde edilir ve su ile yıkanılarak reaksiyon durdurulur. Membran kağıt havlu üzerinde kurutulur.

Elisa (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Mikroplaka 200 µL saf su ile yıkanır. Ters çevrilerek suyun tamamının uzaklaştırıldığından emin olunur. Antijen BiC çözeltisi içerisinde 5 µL/mL oranında seyreltilir. Karıştırıcıda iyice karıştırılarak 4 °C'de bir gece inkübe edilir. 96 kuyucuk

yıkama çözeltisi 200 µL eklenerek 4 kere yıkanır. Kağıt havlu üzerine ters çevirilerek sıvının uzaklaştırılması sağlanır. Fakat mikropolanın tamamen kurumasına izin verilmemelidir. Mikropola kuyucuk başına 150 µl bloke edici çözelti ile bloklanır. 37 °C'de 1 saat karıştırıcı içerisinde inkübe edilir. Bu işlemden sonra microplate tekrar yıkanır. Birincil antikor 100 µL/kuyucuk oranında kuyucuklara eklenir. 37 °C'de 1 saat karıştırıcı içerisinde inkübe edilir. Microplate yıkanır ve ikincil antikor eklenir. 37 °C'de 1 saat karıştırıcı içerisinde inkübe edilir. Microplate tekrar yıkanır ve 100 µL TMB substratı eklenir. 37 °C'de karıştırıcı içerisinde 10 dakika inkübe edilir. Eklenen substrat ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlık ortamda uygulanmalıdır. Daha sonra yıkanmadan 50 µL durdurucu çözelti eklenir ve 450 nm dalga boyunda 30 dakika içerisinde absorbanans ölçümü yapılır.

Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

Elisa ve Western Blot teknikleri uygulanarak seçilen hibridomalar kültür ortamında yeterince geliştikten sonra saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Supernatantların hacmi 60-100 mL arasındadır. Supernatantlar kromatografik kolona yüklenmeden önce 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip mikrofiltrelerden geçirilmiştir. Saflaştırma kolonu olarak protein G immobilize edilmiş matris kullanılmıştır. Kolon 20 mM sodyum fosfat çözeltisi ile yıkanmıştır. Böylece IgG antikorlarının, protein G'ye bağlanabilecekleri nötr ortam sağlanmıştır. Süpernatantların kolona girişi için 200 µL/dakika hızı seçilmiştir. Daha sonra tekrar 20 mM sodyum fosfat çözeltisi ile yıkanır. Böylece Protein G'ye bağlanmayan proteinler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra Glisin – HCl pH 2,7 çözeltisi kullanılarak antikorlar kolondan ayrılmıştır. Nötralizasyon için 1 M Tris – Cl ph 9,0 çözeltisi kullanılmıştır. Daha sonra antikorlar membran içeren antikor derişimini arttırmak için elüat ayırma tüplerinde santrifüj edilmiştir. Daha sonra konsantrasyonları Bradford metodu ile belirlenmiştir.

Epitop Haritalandırılması

50 µL'lik tripsin ile çöktürme reaksiyonu için 25 µL tripsin 22 µL tampon kullanılır. Bir gece 50 °C altında inkübasyon işlemi uygulanır. 5 µL alınır ve MS işleminde kontrol işlemi için saklanır. 0,5 µL 10 mM'lık leupeptin eklenir ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. 100 µg antikor eklenir ve 400 µL PBS ile çözülür. 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. 100 µL protein A/G gel slurry eklenir ve bir gece 4 °C sıcaklıkta 20 rpm dönme hızında inkübe edilir. Immunoprecipitation işlemi için A/G protein (Pierce) protokolü uygulanır. IP tamponu hazırlanır. Yıkama işlemi için Glisin tamponu (düşük pH, MS analizi sırasında girişimde bulunabileceğinin hatırlanması gereklidir) kullanılır. İki aşamada yıkama işlemi gerçekleştirilir. Yıkama işlemi için toplamda maksimum 30 µL tampon kullanılabilir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Hibridomaların Füzyonu

İlk füzyon sonucunda test edilen süpernatantlardan pozitif sonuç elde edilemedi. Bu yüzden ikinci fareye tekrar aşılama yapıldı ve füzyona uğratıldı. Elde edilen süpernatantların test edilmesi sonucunda ikinci fareden elde edilen dalak hücrelerinin füzyonunun başarılı olduğu görüldü. Üretilen monoklonal antikorlar ikinci füzyon sonucu elde edilen hücrelerden elde edilmiştir.

Monoklonal Antikorların Seçimi ve Saflaştırılması

Süpernatantların seçimi için 1500 süpernatant ELISA yöntemi ile test edildi. ELISA yöntemi ile 264 pozitif sonuç elde edildi ve bu pozitif sonuçlar arasından en spesifik ve en verimli olanlarını ayırmak için Western Blot yöntemi uygulandı. Sonuç olarak 3 monospesifik ve 2 polifespisifik olmak üzere 5 monoklonal antikor seçildi. Protein G tutturulmuş kromatografik kolon kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

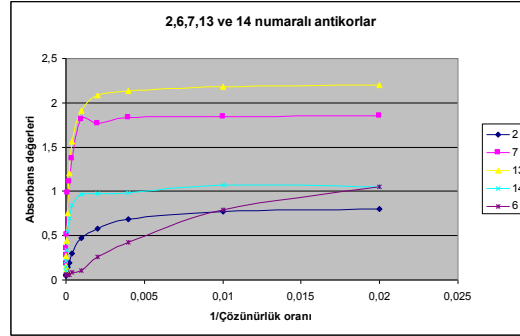
İzotipleme

Çizelge 1. ELISA testi sonucunda elde edilen monoklonal antikorların değişik ikincil antikorlar ile denenmesi sonucu elde edilen absorban değerleri.

Antijen	Örnek	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgGM	IgGA
AHP1	2/2	1,8528	2,5812	1,4469	1,5108	1,6197	1,6561
AHP1	6/1	1,881	1,919	2,7349	1,6535	1,866	1,6893
AHP1	7/1	1,4331	1,2413	2,3732	0,9895	1,2861	0,96
AHP1	13/1	2,8797	1,5196	1,2182	1,4446	1,327	1,0448
AHP1	14/1	2,6024	1,2017	0,8758	1,1547	1,2197	0,9184
AHP1	negatif	1,1846	0,3158	0,0406	0,0431	0,0408	0,0454

Bu aşamada saflaştırma öncesinde seçilmiş bütün süpernatantların AHP1 ile kodlanmış 96 kuyucuklu mikropalakada farklı ikincil antikorlara ilgisi araştırılmıştır. Alınan sonuçlar ışığında polispesifik karakterli olan 13/1 ve 14/1 numaralı süpernatantların IgG1 ikincil antikoruyla daha iyi etkileştiği, monospesifik karakterli diğer süpernatantların (2/2, 6/1 ve 7/1 numaralı) IgG2a ve IgG2b ikincil antikorları ile diğer ikincil antikorlara oranla daha yüksek oranda etkileştiği gözlenmiştir.

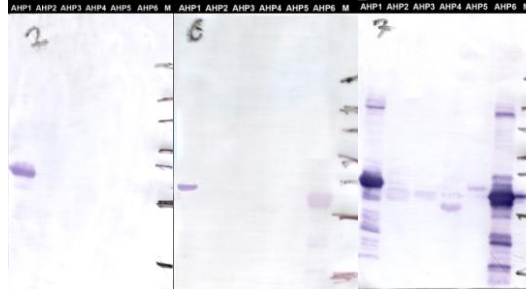
Hassasiyet



Şekil 1. 2,6,7,13 ve 14 numaralı antikorların hassasiyetinin ölçümüne ait grafik. Antikora ait 1/seyreltme oranına karşılık absorbansın değişimini gösterir.

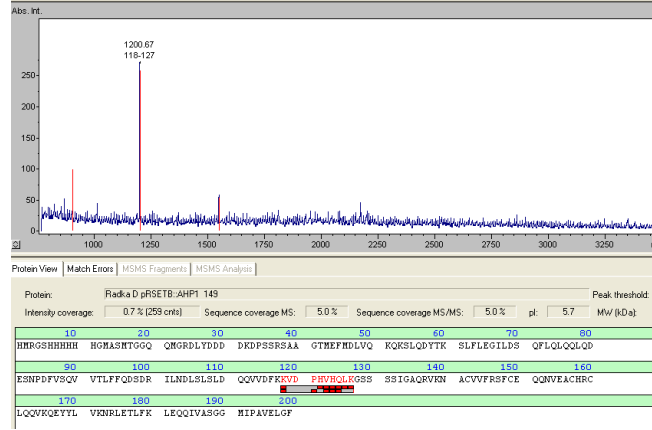
Değişik oranlarda seyreltilen antikorların en iyi oranda kullanılabilmesi için uygulanmıştır. Çözünürlük oranının absorbansa etki etmediği (absorbansın sabitlendiği) noktanın yarısı hesaplanır. Bu hesaplanan noktadaki seyreltme oranı ideal seyreltme oranıdır ve antikorun bu oranda seyreltilerek kullanılması en iyi sonucu verir. Bu durumda şekil 1'e göre; 2 numaralı antikor için 1:500, 6 numaralı antikor için 1:50 (Absorbansın sabitlendiği nokta gözlenememiştir), 7 numaralı antikor için 1:2500, 13 numaralı antikor için 1:1000, 14 numaralı antikor için 1:2500 oranında seyreltmenin en iyi sonucu vereceği saptanmıştır.

Monospesifik Karakterli Antikorların Karakterizasyonu



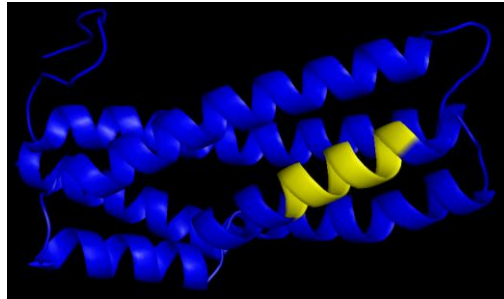
Şekil 2. Monospesifik karakterdeki 2, 6 ve 7 olarak etiketlenmiş antikorlar.

Şekil 2'deki membranlarda sadece AHP1 proteini içeren kaba özütün bulunduğu sütunda tek bir bant gözlemlendiğinden, 2 ve 6 numaralı antikorların monospesifik karakterde olduğu belirlenmiştir. 6 numaralı antikorun AHP6 ile de bant oluşturduğu gözlenmiştir. Fakat bu bant, AHP1 ile oluşan banda oranla hemen hemen yok sayılabileceğinden 6 numaralı antikorun karakterini etkilememektedir. 7 numaralı antikorun ise AHP1 ve AHP6 ile bant oluşturduğu



Şekil 5. Tripsin ile çöktürülmüş AHP1 proteininin 2 numaralı antikor ile reaksiyonu sonucunda elde edilen epitop haritalanmasına ait grafik.

Şekil 5'teki grafikte görülen 1200,67 kDa'daki pik epitopu gösterir. Protein sekansını gösteren bölümdeki kırmızı işaretli aminoasitler (118-127 arası) epitopu oluşturan aminoasitleri gösterir. Grafik şekil 4.6'daki kontrol amaçlı grafikte kıyaslandığında 1548,7 kDa'da elde edilen pikin kontaminasyonlardan kaynaklandığını görürölür.



Şekil 6. AHP1 proteininin PyMOL programı kullanılarak çizilmiş üç boyutlu yapısı.

Şekil 6'da AHP1 proteinine ait üç boyutlu yapı görülmektedir. Epitop haritalandırılması işlemi sonucunda elde edilen veriler kullanılarak, PyMOL programı sayesinde, 2 numaralı antikoru bağlandığı KVDPHVHQLK epitopu sarı renkle renklendirilmiştir. İşaretlenen epitop proteinin 4. heliksinde bulunur.

Tartışma

AHP1 antijeni ile aşılanmış farelerden alınan serumun kontrolünde aşılama işleminin başarılı olduğu saptanmıştır. Daha sonra fareden alınan ve HAT ortamına

dayanıklı antikor üretebilen dalak hücreleri, yaşam süresi sınırsız miyelom hücreleri ile füzyona uğratılmıştır. Elde edilen hibritleşmiş hücreler uygun ortamda AHP1 antijenine cevap verebilecek şekilde büyütülmüştür. İlk füzyon sonucu elde edilen süpernatantlardan pozitif sonuç elde edilemezken ikinci füzyon sonucu elde edilen süpernatantlara uygulanan Western Blot ve ELISA testlerinden antikorların varlığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir. İlk önce ELISA testi uygulanmıştır. ELISA testinden elde edilen sonuçlar ışığında seçilen süpernatantlara Western Blot testi uygulanmıştır. Western Blot testi ile bir veya daha fazla AHP antijenine karşı süpernatantlar test edilerek antikorların özgüllüklerini saptamak mümkün olmuştur. Elde edilen analiz sonuçları ile en verimli beş monoklonal antikor saflaştırılmıştır. Antikorların özgüllüğü AHP1,2,3,5 proteinlerine ve *Arabidopsis thaliana* bitkisinden alınan bakteri stoklarından hazırlanan kaba özütler üzerinde test edilmiştir. Bu sayede monoklonal antikorlar tüm AHP'lere karşı denenmiştir. Sonuçta 2 ve 6 numaralı antikorların sadece AHP1 antijenine karşı etkili olduğu, 13 ve 14 numaralı antikorların ise bütün AHP'lere karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Bu durumda 2 ve 6 numaralı antikorların monospesifik karakterde olduğu, 13 ve 14 numaralı antikorların ise polispesifik karakterde olduğu söylenebilir. 7 numaralı antikor ise AHP1 ve AHP6 ile yüksek derecede etkileşirken diğer antijenlerle membranlar üzerinde zayıf bantlar oluşturduğu gözlenmiştir. Daha sonra hassasiyet ölçümü yapılmıştır. Hassasiyet ölçümünde, antikorların her birinin optimum seyreltme oranının hesaplanması amaç edinilmiştir. Farklı seyreltme oranlarında denen en antikorlar için elde edilen grafikten yola çıkarak en iyi seyreltme oranlarının 2 numaralı antikor için 1:500, 6 numaralı antikor için 1:50 (Absorbansın sabitlendiği nokta gözlenememiştir), 7 numaralı antikor için 1:2500, 13 numaralı antikor için 1:1000, 14 numaralı antikor için 1:2500 olduğu hesaplanmıştır. Daha sonra epitop haritalandırılması gerçekleştirilmiştir. Diğer antikorlarla çökeltme işlemi başarısız sonuçlandığından sadece 2 numaralı antikoru epitop haritalandırılabilmiştir. Antikoru epitopu, AHP1 proteininin tripsin ile hidroliz edilmesi sonucunda haritalandırılmıştır. AHP1 proteinine, 2 numaralı antikoru KVDPHVHQLK aminoasit dizisinden bağlandığı MS/MS analizi ile belirlenmiştir.

Elde edilen monoklonal antikorlar *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki sitokinin sinyal iletiminin daha iyi anlaşılmasına yönelik çalışmalarda kullanılabilirler. Aynı zamanda monoklonal antikorlar tıp alanında; hastalıkların teşhisi, tedavisi ve hatta pasif bağışıklık kazandırılması amacıyla kullanılabilirler.

Kaynaklar

- BRADFORD, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227: 680–685.
- HWANG, I., CHEN, C., SHEEN, J., 2002. Two-Component Signal Transduction Pathways in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 129:500–515

Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi Yıl:2012 Cilt:27-4

FERREIRA, F. J., KIEBER, J. J., 2005. Cytokinin signaling, Current opinion in plant biology 8:518-525

FREYSDOTTIR, J., 2000. Production of monoclonal antibodies, Methods in molecular medicine, Humana Pres 40:267-279

GOLDSTEIN, G., SANDERS, M., 1983. Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Clinical Immunology Newsletter 4(6):69-71