

İMMÜNOLOJİK TEST YÖNTEMİYLE CTNI PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Jale ŞAHİN*
Merve ÖZTUĞ ŞENAL
Doç.Dr.Müslüm AKGÖZ**

TÜBİTAK UME, Baris Mah. Dr. Zeki Acar Cad. Pk54, 41470 Gebze/KOCAELİ
Tel: 0262 679 50 00
E-Mail* : jale.sahin@tubitak.gov.tr
E-Mail** : muslum.akgoz@tubitak.gov.tr

ÖZET

Amerikan Ulusal Metroloji Enstitüsü, NIST tarafından organize edilen bu uluslararası karşılaştırmada ELISA yönteminin farklı laboratuvarlar tarafından uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ulusal Metroloji Enstitüleri arasında düzenlenen bu çalışmada kardiyak biyobelirteç Troponin I (cTnI) protein miktarının, Troponin Standart Referans Malzemesi kullanılarak immünojenik test yöntemi ELISA ile kantitatif ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçları, belirsizlik bütçeleri oluşturularak hesaplanan belirsizlik değerleri ile birlikte verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: cTnI, Troponin I, ELISA

ABSTRACT

The international comparison study that was organized by The National Institute of Standards and Technology, NIST, aims to investigate the applicability of the ELISA method in different laboratories. By using Cardiac Troponin I standard referans material, a cardiac biomarker Cardiac Troponin I protein concentration of unknown samples were measured quantitatively with a immunological test method, ELISA, which is a simple, powerful immunological technique. The measurement results of cTnI protein were given with calculated uncertainty budgets.

Key Words: cTnI , Troponin I, ELISA

1. Giriş

Hastalıkların erken teşhis ve tedavisinde en doğru veriye en kısa zamanda ulaşmak büyük önem taşımaktadır. Biyobelirteç olarak bilinen, belli bir hastalıkta özel olarak salgılanan ya da miktarında artış görülen biyomoleküllerin miktarı, erken teşhis ve hastalığın takibinde önemlidir [1]. Bu moleküllerin miktar tayini için geliştirilen biyolojik tanı yöntemlerinden antikor-antijen etkileşimini temel alan immünojenik test yöntemi, kullanımı en yaygın tekniktir. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), antikor-antijen etkileşimine dayalı kantitatif immünojenik test yöntemi olup her moleküler biyoloji ve klinik laboratuvarında yapılabilecek basit ve hassasiyeti yüksek bir tekniktir.

Bunlara ek olarak, yapılan testlerin sonuçlarının doğru yorumlanması için standart referans malzemelerin (SRM) varlığı büyük önem taşımaktadır. SRM üretimi, test yöntemleri geliştirilmesi ve bunların izlenebilirliğinin sağlanması ulusal metroloji enstitüleri tarafından yapılmaktadır. Bu amaca yönelik yapılan çalışmalardan bir tanesi ise uluslararası karşılaştırmalardır. TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü (UME) olarak Amerika Ulusal Metroloji Enstitüsü (NIST) tarafından düzenlenen P58.1: "İmmünojenik test yöntemiyle (ELISA) kardiyak troponin I (cTnI) proteininin nicel ölçümü" başlıklı karşılaştırmaya katılım sağlandı.

Çalışma sonunda, cTnI SRM'i ile çizilen standart eğri denklemi kullanılarak hesaplanan bilinmeyen örneklerdeki cTnI miktarı bulunup, belirsizlik bütçesi oluşturularak çıkan sonuçlara belirsizlik değerleri eklendi (Tablo 1.).

2. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

cTnI protein miktarı tayini immunolojik test yöntemlerinden sandviç ELISA protokolü kullanılarak yapıldı. Deney iki günde gerçekleştirilmiş olup işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

- İlk gün, ortamda bulunan cTnI moleküllerini tutmakla görevli yakalayan antikor, 96 kuyucuklu mikropalakalara eklendi ve gece boyunca +4°C'de bekletildi.
- İkinci gün plakaların tabanına tutunmayan fazla antikorlar yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra bloklama solüsyonu eklenip 90 dakika oda sıcaklığında mikropalaka çalkalayıcıda 30 rpm hızda çalkalandı. Yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra gravimetrik yöntemle tartılan örnekler ve standartlar, eşit miktarda yakalayan antikorlar üstüne eklenip 30°C'de 60 dakika mikropalaka çalkalayıcıda 30 rpm hızda çalkalandı. Yakalayan antikor-cTnI molekülü immünokompleksini tanıyan, ucunda alkalın fosfataz enzimini taşıyan algılama antikoru reaksiyon karışımına eşit miktarda eklendi ve 60 dakika 30°C'de 30rpm hızda çalkalandı. Ortama 4-MUP substratı eklendi ve 30 dakika 30°C'de bekletilen örneklerde alkalın fosfotaz enzimi 4-MUP'deki fosfatı kesmesiyle ortaya çıkan floresan ışması DTX 880 Multimode Okuyucu cihazında ölçüldü.

3. SONUÇ

Ölçüm sonunda standart solüsyonlardan elde edilen değerlerle, her bir örnek için iki farklı günde standart eğri oluşturulmuş bilinmeyen örneklerdeki cTnI protein miktarı bu standart eğrilere göre hesaplanmıştır. Buna göre bilinmeyen örneklerin derişimi Örnek1 için 733 ng/L , Örnek2 için 2097 ng/L ve Örnek3 için 9157 ng/L olarak ölçülmüştür.

Ayrıca her bir örnek için belirsizlik bütçeleri oluşturulmuştur. Buna göre cTnI proteininin miktar tayini için belirsizlik bileşenleri: Stok çözelti belirsizliği, kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik ve tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik olarak belirlenmiştir.

Deney sonunda elde edilen derişimler için birleşik standart ölçüm belirsizlik değerleri yukarıda belirtilen her bir belirsizlik bileşeni kullanılarak Tablo 2'de verilen denkleme göre hesaplanmıştır. Genişletilmiş ölçüm belirsizliği ise % 95 güven aralığı için kapsam faktörü olan k=2 ile çarpılarak hesaplanmıştır.

$$u_{b_s} = \sqrt{\left(\frac{u_{tekrar}}{C_{örnek}}\right)^2 + \left(\frac{u_{ip}}{C_{örnek}}\right)^2 + \left(\frac{u_{kalib}}{C_{örnek}}\right)^2 + (u_{hazırlama})^2 + (u_{312})^2 \times C_{örnek}}$$

u_{b_s} : birleşik standart ölçüm belirsizliği

u_{tekrar} : tekrarlanabilirlikten gelen ölçüm belirsizlik

u_{ip} : aratekranabilirlikten gelen ölçüm belirsizlik – günler arası

u_{kalib} : kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik

$u_{hazırlama}$: örnek hazırlamadan gelen belirsizlik

u_{312} : stok çözeltiden gelen belirsizlik

$C_{örnek}$: örneğin derişimi

$$U_{örnek} = u_{b_s} \times k$$

Örnek :örneğin standart ölçüm belirsizliği
k : kapsam faktörü

	cTnl Miktarı Ortalama (ng/L)	Belirsizlik Değeri (ng/L)	% Belirsizlik Değeri
ÖRNEK 1	733	119	16
ÖRNEK 2	2097	677	32
ÖRNEK 3	9157	2702	29

Tablo 1. Bilinmeyen örneklerdeki cTnl miktarı ve belirsizlik değerleri.

KAYNAKLAR

- [1] Hayashi Y., Matsuda R., Maitani T., Ito K., Nishimura W., Imai K., Maeda M., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36 (2004): 225–22
- [2] Noble J.E., Wang L., Cerasoli E., Knight A.E., Porter R.A., Gray E., Howe C., Hannes E., Corbisier P., Wang J., Wu L., Altieri I., Patriarca M., Hoffman A., Resch-Genger U., Ebert B., Voigt J., Shigeri Y., Vonsky M.S., Konopelko L.A., Gaigalas A.K., and Bailey M.J.A., Clin Chem Lab Med 2008;46(7): 1033–1045
- [3] EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying uncertainty in analytical measurement, 3rd Edition, 2012
- [4] Kimyasal Ölçümlerde Belirsizlik Hesaplamaları, UME- Kimya Grubu Laboratuvarları- Haziran 2011.
- [5] Brody E.N., Gold L., Lawn R.M., Walker J.J., Zichi D., Expert Reviews Ltd, ISSN 1473-7159, 2010

ÖZGEÇMİŞ

Jale ŞAHİN

Jale ŞAHİN, lisans eğitimini Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Biyoloji Bölümü'nde ana dal, Kimya Bölümü'nde yan dal olmak üzere 1997-2002 yılları arasında yaptı. Daha sonra yüksek lisans derecesini Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde, Doç. Dr. Kamruddin Ahmed danışmanlığında "Moraxella catarrhalis bakterisinde bulunan ABC tip transportun ATPaz komponentinin moleküler karakterizasyonu" konusunda 2002-2004 yılları arasında gerçekleştirdiği tez çalışmasıyla aldı. 2005-2010 yılları arasında doktora derecesini Almanya'da, Leibniz Institute for Neurobiology'de Moleküler Biyoloji ve Nörokimya alanlarında, "Sinapto-nükleer mesajcı protein Jacob'un subselüler dağılımı" tezi yüksek onur derecesiyle tamamladı. 2010-2011 yılları arasında Seul Ulusal Üniversitesi Beyin ve Bilişsel Bilimler Enstitüsü'nde, hafızanın ve öğrenmenin moleküler mekanizmaları konusu üzerinde doktora sonrası araştırmacı olarak görev yapan ŞAHİN, 2011 Haziran ayından itibaren TÜBİTAK, UME, Kimyasal Metroloji Laboratuvarları Biyoanaliz Laboratuvarı'nda uzman araştırmacı olarak görev yapmaktadır. Nörobiyoloji, Biyokimya ve Moleküler Biyoloji alanlarında uluslararası bilimsel dergilerde yayınlanmış 5 adet makalesi bulunmaktadır.

Merve ÖZTUĞ ŞENAL

Merve Öztuğ ŞENAL, lisans eğitimini Boğaziçi Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde 2006 yılında tamamladı. 2006 yılında, ABD, California State University, Long Beach' te okul ücreti muafiyet bursuyla yüksek lisans öğrenimine başlayan ŞENAL, Prof. Dr. Paul WEERS yönetimindeki "Apolipoprotein III / Lipopolisakkarit (LPS) komplekslerinin karakterizasyonu" başlıklı yüksek lisans tezini 2009 yılında tamamladı. ŞENAL, yüksek lisans yaptığı süre boyunca genel kimya laboratuvar derslerinde öğretim asistanı olarak görev yaptı. 2009-2011 yılları arasında University of California, Los Angeles (UCLA)' da Diferansiyel Proteomiks Laboratuvarları'nda araştırmacı olarak görev yapan

ŞENAL, Eylül 2011' den beri TÜBİTAK, UME, Kimyasal Metroloji Laboratuvarları'nda çalışmaktadır. Biyokimya, Moleküler Biyoloji alanlarında uluslararası bilimsel dergilerde yayınlanmış 2 makalesi vardır.

Müslüm AKGÖZ

Müslüm AKGÖZ, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 1993 yılında mezun olmuştur. Yüksek lisans öğrenimini Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 1996 yılında tamamlamıştır. Milli Eğitim Bakanlığı'ndan kazandığı yurtdışı doktora bursu ile 2001 yılında A.B.D. Worcester Polytechnic Institute'den Biyokimya alanında doktorasını almıştır. 2001-2004 yılları arasında Washington Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anestezi Araştırma Ünitesi'nde doktora sonrası çalışmalar gerçekleştirmiştir. 2004 yılında ülkemize dönerek Kars Kafkas Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde akademik ve araştırma faaliyetleri gerçekleştirmiş ve 2008 yılında doçentlik kadrosuna atanmıştır. 2008 yılında TÜBİTAK UME Kimya Grubu'na katılmış olup Biyoanaliz Laboratuvarları'nın altyapısının kurulması çalışmalarına katkıda bulunmuştur. Biyoanaliz Laboratuvarı'nda biyometroloji alanında çalışmalar yürütmekte olup DNA, RNA ve protein biyomoleküllerinin miktarlarının yüksek doğrulukla ve düşük belirsizlikle belirlenmesine yönelik çalışmalar yapmaktadır. Biyometroloji alanında TÜBİTAK 1001 ve FP7-EMRP projelerinde araştırmalara katkıda bulunmaktadır.