

PROGESTERON İÇİN ENZİMİMMUNASSAY (EIA) TEKNİĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ*

Development of Enzymeimmunoassay (EIA) for Progesterone

B. GÜVEN** S. ÖZSAR** E. SABAN*** S. ÖZDEMİR***

ÖZET

Bu çalışmada total sütte progesteron tayini için çift antikorlu mikrotitrasyon plak EIA yöntemi geliştirildi. 6 β -OH-progesteron-hemisuccinate, HRP enzimi ile işaretlendi ve sephadex G-25 kolon kromatografisinden geçirilerek saflaştırıldı. Tavşanlarda progesteron-7 α -CTE-BTG'ye karşı üretilmiş olan antikor teste kullanıldı. Keçilerde tavşan IgG'sine karşı ikinci antikor üretildi ve antiserumdan IgG fraksiyonu affinite kromatografisinden geçirilerek saflaştırıldı.

Testin hassasiyetinin 2 pg/kuyu, deney içi ve deneyler arası varyasyon katsayılarının %14'den düşük olduğu bulundu. Östrus siklusundaki bir inekten toplanan süt örnekleri RIA ve EIA ile analiz edildiğinde iki teknik arasındaki korelasyon %96 olarak tesbit edildi. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen sonuçlar göz ile de değerlendirilebilmekte olup 80 örneğin analizi 4 saate tamamlanabilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Enzimimmunoassay, Progesteron, Total süt.

SUMMARY

In this study a double antibody microtitration plate EIA was developed for the determination of progesterone in whole milk. 6 β -OH-Progesterone-hemisuccinate was labelled with HRP and purified through the column chromatography (sephadex G-25). Antiserum produced against progesterone-7 α -CTE-BTG in rabbits was used. A second antibody against rabbit IgG was produced in goats and IgG fraction of antiserum was isolated through affinity chromatography.

The sensitivity of the assay was 2 pg/well. The intra and inter assay coefficients of variation were <14%. Milk samples collected from a cow in estrus cycle were analysed using both EIA and RIA, the correlation between two techniques was obtained as 96%. The resulting color is measured by using spectrophotometer as well as by naked eye and it is possible to analyse 80 samples within 4 hours.

Key Words: Enzymeimmunoassay, Progesterone, Whole milk.

GİRİŞ

Sütte progesteron tayini ineklerde gebelik teşhisi (1), östrus zamanının tesbiti (2) ve fertilitte kontrolünde (3) yaygın olarak kullanılmaktadır. Radioimmunoassay (RIA) ve enzimimmunoassay (EIA) (4-7) yöntemleri sütte progesteron tayini için kullanılmakla beraber daha ucuz olması ve radyoaktif madde içermemesi nedeniyle EIA yöntemi daha çok tercih edilmektedir. Sütte progesteron tayini, süttten ekstrakte edilerek (8), yağsız süt (9), süt yağı (10) ve total sütte (11) olmak üzere sütün çeşitli fraksiyonlarında yapılmaktadır. Bu analizlerde tek veya çift antikorlu sistemler kullanılmış olup çift antikorlu EIA sisteminin daha güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (12).

Bu çalışma, total sütte progesteron tayini için çift antikorlu EIA yöntemini geliştirmek amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Progesteron Antikorumun Üretimi:

Progesteron-7 α -Carboxyethylthioether-Bovine thyroglobuline antijeni Dr. D. F.M. van de Wiel'den (Research Institute for Animal Husbandry, Zeist, Hollanda) temin edildi. Bu antijene karşı 6 adet tavşan Tablo 1'deki yöntemle immunize edildi ve her immunizasyondan 1 hafta sonra tavşanlardan kan alınarak EIA ile titre tespiti yapıldı. Tavşanların birinden elde edilen antiserumun test için uygun titresinin 1:85.000 olduğu tespit edildi ve antiserumun çeşitli steroidlerle (testosteron, östradiol, östriol, östron, kortisol, Aldosteron, Hidrokortizon) çapraz reaksiyonunun % 0.1'den az olduğu hesaplandı. Son immunizasyondan 1 hafta sonra kanatma yapılarak elde edilen antiserum alikotlara ayrılıp -70 °C'de saklandı.

* Bu çalışma DPT (91 K 120180) ve Türkiye Atom Enerjisi Kurumu tarafından desteklenmiş olup, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından ruhsatlandırılmıştır.

** KAU Vet. Fak.Fizyoloji Bilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

*** TAEK, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü Lalahan, Ankara-TÜRKİYE

Tablo 1. Progesteron antikorunun üretimi.

Enjeksiyon No	Enjeksiyon Şekli	Enjek.Süresi Hafta	Antijen Miktarı	Freunds Adjuvant
1	Subcutan	0	250µg	Complete
2	Subcutan	2	250µg	Incomplete
3	Subcutan	4	300µg	Incomplete
4	Subcutan	7	300µg	Incomplete
5	Subcutan	10	300µg	Incomplete
6	Subcutan	13	300µg	Incomplete
7	Subcutan	16	300µg	Incomplete

Keçilerde Tavşan IgG'ine Karşı Antikor Üretimi ve IgG'nin Saflaştırılması:

İki adet erkek Ankara keçisi (10 aylık)tavşan IgG'si (Sigma, USA) ile Tablo 2'de gösterilen şekilde immunize edildi.

Tablo 2. Tavşan IgG'ye karşı keçilerde ikinci antikor üretimi.

Enjeksiyon No	Enjeksiyon Şekli	Enjek.Süresi Hafta	Antijen Miktarı	Freunds Adjuvant
1	Subcutan	0	2mg	Complete
2	Subcutan	4	1mg	Incomplete
3	Subcutan	6	1mg	Incomplete
4	Subcutan	8	1mg	Incomplete
5	Intramuscular	10	1mg	Incomplete
6	Intramuscular	12	1mg	Incomplete

Titre artışı durduğunda toplanan kan plazmasından IgG fraksiyonu affinite kolonundan (cyanogen bromür ile aktive edilmiş agarosa bağlı tavşan IgG) geçirilerek saflaştırıldı (13). Bu amaçla, affinite kolonu (1.5x15 cm) 10 ml Tavşan IgG-Agarose (Sigma A-2909) suspansiyonu ile dolduruldu. Kolon 10 ml fosfat tamponu (0.66 M KH₂PO₄, pH:7.2) ile yıkandı ve 20 ml tavşan IgG'sine karşı üretilen keçi antiserumu kolona aktarıldı (akış hızı 200µl/dk). antiserumun geçişi tamamlandıktan sonra kolon 10 ml fosfat tampon ile yıkandı ve sırası ile 10 ml 0.5 M NaSCN pH:8.0, 10 ml 0.1 M glisin pH:3.5 ve 15 ml 0.1 M glisin pH:2.0, kolondan geçirilerek IgG saflaştırıldı. IgG solusyonu 24 saat fos-

fat tampona karşı diyalize edildi. Diyaliz edilen solusyondaki protein miktarı biüret yöntemiyle tayin edildi. İkinci antikorun test için uygun titresinin 1 µg IgG/kuyu olduğu tespit edildi.

Progesteron-HRP Konjugatının Hazırlanması:

Progesteronun horse radish peroxidase (HRP) enzimi ile işaretlenmesinde "mixed anhydride" yöntemi (9) kullanılmış olup aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

A Solusyonu

1 mg 6β-OH-Progesetrone-hemisuccinate (Steroloids, USA) 0.5 ml N, N di-

methyiformamide içinde çözüldü ve buna 6.25 µl methyilmorpholine ilave edilerek çözelti önce 0 °C'ye daha sonra -15 °C'ye kadar soğutuldu.

B Solusyonu

5 mg HRP enzimi (Sigma, USA) 500 µl distile suda çözüldü ve içine 375 µl N, N-dimethylformamide ilave edilerek çözelti 0 °C'ye soğutuldu.

Reaksiyon

A solusyonuna 6.25 µl iso-butylchloroformate ilave edilerek 3 dakika -15 °C'de karıştırıldı. Daha sonra B solusyonu A solusyonuna damla damla ilave edildi ve pH 8.0'e 1 N NaOH ile ayarlandı. Karışım 1 saat -15 °C'de ve 2 saat 0 °C'de karıştırıldı ve daha sonra reaksiyon 10 mg NaHCO₃ ile durduruldu. Konjugat önce dialize edilip daha sonra sephadex G-25 kolon kromatografisinden (1.6x90 cm, akış hızı 0.5 ml/dk) geçirilerek saflaştırıldı. Konjugatın test için uygun dilusyonu 1:15.000 olarak tespit edildi ve konjugat -70 °C'de saklandı.

Süt Örneklerinin Hazırlanması:

Süt örnekleri koruyucu olarak kullanılan K₂ Cr₂ O₇ (0.033 g/10 ml süt için) kapsayan tüplere toplandı ve test yapılana kadar +4 °C'de saklandı. Test için süt örneklerinin oda ısısına gelmesi beklendi ve daha sonra 10 µl süt 390 µl deney tamponu (0.04 M Na₂ HPO₄, 0.14 M NaCl, %0.02 thimerosal, pH 7.2) ile 1:40 oranında sulandırıldı. Bundan da 20 µl/kuyu olarak testte kullanıldı, böylece 0.5 µl sütte analiz yapılmış oldu.

Progesteron Standartlarının Hazırlanması:

Post partum 10. gündeki bir inekten alınan süt örneği RIA (9) ile analiz edilip progesteron içermediği tespit edildikten sonra standart hazırlamada kullanıldı. Bu süt numunesine 2,4,6,8, 16,32 ng/ml'de olacak şekilde progesteron konuldu ve 1: 40 oranında deney tamponu ile sulandırıldı. Hazırlanan standartlar +4 °C'de saklandı.

Mikrotitrasyon plaklarının IgG ile kaplanması:

Affinite kolonundan geçirilip saflaştırılan anti tavşan-keçi IgG'sinden 100 µg alınarak 10 ml karbonat tamponu (0.05 M NaHCO₃, pH 9.6) ile sulandırıldı. Mikrotitrasyon

plaklarına (Costar) bu solusyondan 100 µl/kuyu olacak şekilde pipetlendi ve plak +4 °C'de 18 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonucu plak içeriği boşaltıldı ve özgül olmıyan bağlanmayı azaltmak için plağa 300 µl/kuyu % 0.1 sığıır serum albumini (BSA) ihtiva eden deney tamponu konuldu ve plak 60 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu ikinci inkubasyondan sonra plak içeriği boşaltıldı ve plak 4 kere yıkama solusyonu (%0.05 Tween 80, distile su içinde) ile yıkanarak kurutuldu ve -20 °C'de saklandı.

Testin Yapılışı:

IgG kaplı plak, süt standartları, HRP-progesteron konjugatı, progesteron anti-serumu ve numuneler oda ısısına gelinceye kadar beklendi. 1/40 oranında sulandırılmış olan süt örnekleri ve standartlar 20 µl/kuyu olarak pipetlendi. HRP-progesteron konjugatının 1:15.000'lik dilusyonundan 100 µl/kuyu olarak tüm plağa pipetlendi. Daha sonra tüm kuyulara 100 µl progesteron antikor (1:85.000) ilave edildi ve plak 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. Plak içeriği boşaltıldı ve 4 kere yıkama solusyonu ile yıkandı. Plağa 150 µl/kuyu olacak şekilde asetat tamponundan (0.1 M sodium acetat, pH 5.5) hazırlanan substrattan (%0.01, 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine, %0.004 H₂O₂) konularak plak 40 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon 50 µl/kuyu 4 N H₂SO₄ ile durduruldu ve renk yoğunluğu fotometrede (Titertek, Multiskan MC) 450 nm'de okundu. Süt örneklerindeki progesteron miktarı standart eğriden hesaplanarak değerlendirildi.

SONUÇLAR

Testin hassasiyetinin 2 pg/kuyu olduğu (sıfır standarttan istatistiksel olarak önemli dereceden farklı olarak tayin edilebilen en küçük miktar) hesap edildi. Üç adet kontrol örneğinde yapılan analizlerde deney içi ve deneyler arası varyasyon katsayıları Tablo 3 ve 4'de gösterilmektedir.

EIA tekniğinin karşılaştırılması RIA ile yapılmış olup 200 adet süt örneği her iki yöntemle analiz edildi ve korelasyon r=0.96 olarak bulundu.

Bir ineğin seksüel siklusundan günlük olarak toplanan süt örnekleri RIA ve EIA teknikleri ile analiz edildi ve her iki yöntemle elde edilen sonuçlar birbirine çok yakın bulundu (Şekil 1).

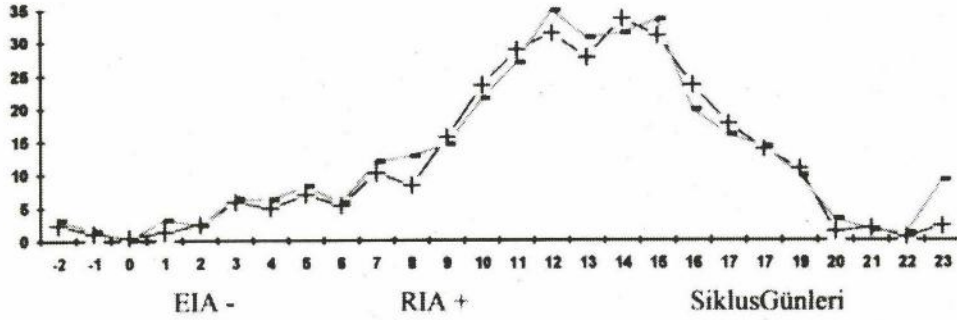
Tablo 3. Deney içi varyasyon katsayıları.

EIA (n=8)	Progesteron ng/ml	%CV
Kontrol 1	0.8	13.1
Kontrol 2	2.5	5.7
Kontrol 3	4.7	7.1
Ortalama	%CV	8.6

Tablo 4. Deneylerarası varyasyon katsayıları

EIA (n=8)	Progesteron ng/ml	%CV
Kontrol 1	1.3	9.4
Kontrol 2	3.4	6.8
Kontrol 3	5.1	4.7
Ortalama	%CV	6.9

Progesteron ng/ml total süt

**Şekil 1.** EIA ve RIA ile tayin edilen bir inepteki süt progesteron düzeyleri.

TARTIŞMA

Mikrotitrasyon plaklarının hormona özgül antiserum (Ig fraksiyonu) ile kaplandığı tek antikorlu sistemde çok değerli olan antiserumdan fazla miktarda kullanmak gerekirken, çift antikorlu EIA'da ise daha az oranda antiserum kullanılmakta ve bu da, çift antikorlu sistemin EIA testinin presizyonunu geliştirmesi yanında diğer bir önemli avantaj olmaktadır (13,14). Çalışmamızda da plakları anti-progesteron-Ig ile kapladığımızda 1:16.500'lük dilusyon kullanılırken bu oran çift antikorlu sistemde 1:85.000'e çıkmış ve yaklaşık 1/5 oranında daha az progesteron antiserumu kullanılmıştır.

Bugüne kadar 6 β -OH-progesteron-

HS-HRP enzim konjugatı ve progesteron 7 α -CTE-BSA antiserumunun kullanıldığı çift antikorlu heterolog EIA sistemi serumda (14) ve yağsız sütte (12) progesteron analizi için geliştirilmiş olup total sütte ise bu heterolog sistem, tek antikorlu EIA'da kullanılmıştır (15). Çalışmamızda ise heterolog sistem çift antikorlu EIA'da total sütte progesteron tayini için kullanılmıştır. Yağsız süt fraksiyonunu ayırmak için gerekli olan santirifüj safhası total sütte çalışmakla elimine edilmiştir. Fakat EIA'da serum ve süt enzimi etkilemekte ve aktivitesini düşürmektedir (16). Bu etkiyi minimuma indirmek için serum veya sütün sulandırılması gerekmektedir. Çalışmamızda ise süt 1/40 oranında sulandırılmış bundan da 20 μ l/kuyu kullanılmıştır. Böylece 0.5 μ l sütte

analizler yapılarak sütün enzim üzerine olan olumsuz etkisi minimuma indirilmiştir. Bu kadar küçük miktarda (0.5 µl süt/kuyu) analiz yapmak için testin hassasiyetinin çok yüksek olması gerekmektedir. Nitekim testimizin hassasiyeti 2 pg/kuyu olarak bulunmuş ve bu da heterolog sistem EIA yöntemi sayesinde elde edilebilmiştir. Bir çok araştırmacı da heterolog sistem EIA'nın homolog sistemden daha hassas olduğunu bildirmişlerdir (11,14-16).

Sonuç olarak geliştirilmiş bulunan EIA yöntemi ile progesteron hormonu total sütte hassas ve doğru olarak tayin edilebilmekte ve sonuçlar göz ile de değerlendirilebilmektedir. İthal edilen kitlerle karşılaştırıldığında 1/10 oranında daha ucuza mal olan bu sistemin rutin uygulamaya sokulması süt ineklerinin gebelik teşhisinde ve fertilitate problemlerinin çözümünde önemli katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Pope, G.S., Majzlik, I., Ball, P.J.H., Leaver, J.D.: Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. Vet. J.*, 132:497-506, 1976.
2. Günzler, O., Rattenberger, E., Gorlack, A., Hahn, R., Hocke, P., Claus R., Karg, H.: Milk progesterone determination as applied to the concentrations of oestrus, the detecting of cycling and as an aid to veterinarian and biotechnical measures in cows. *Br. Vet. J.*, 135:541-549, 1979.
3. De Kruif, A.: Factor influencing the fertility of a cattle population. *J. Reprod. Fert.* 54:507-518, 1978.
4. Boer, G., Etches, R.J., Walton, J.S.: A solid phase radioimmunoassay for progesterone in bovine plasma. *Can. J. Anim. Sci.*, 60:783-786, 1980.
5. Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction. Technical Reports Series No:223. IAEA. Vienna 85-111, 1984.
6. Munro, C., Stabenfeldt, G.: Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.*, 101:41-49, 1984.
7. Nakao, T., Suguhashi, A., Saga, N., Tsunoda, N., Kawato, K.: An improved enzyme immunoassay of progesterone applied to bovine milk. *Br. Vet. J.*, 139:109-118, 1983.
8. Van de Wiel, D.F.M., Kamonpatana, M., Ngramsurijaroy, Ch., Kooops, W., Singhanjan, S.: Enzymeimmunoassay of milk progesterone: its application to oestrus confirmation and early pregnancy diagnosis in cattle. *Vet. Q.*, 4:72-78, 1982.
9. Meyer, H. H. D., Güven, B., Karg, H.: Enzymimmuntests (EIA) auf mikrotitrationsplatten zur progesteronbestimmung in magermilchproben. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 73:86-94, 1986.
10. Claus, R., Karg, H., Rattenberger, E., Pirchner, F.: Analyse von Fortpflanzungsproblemen bei Kühen mit Hilfe der Progesteronebestimmung in Milchfett. *Zuchthyg.* 17:203-213, 1982.
11. Sauer, M.J., Foulkes, J.A., O'Neill, P.M.: Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: Application of heterologous systems for improved sensitivity. *Br. Vet. J.*, 138:522-531, 1982.
12. Prakash, B.S., Meyer, H.H.D., and Van de Wiel, D.F.M.: Sensitive enzyme immunoassay of progesterone in skim milk using second-antibody technique. *Anim. Reprod. Sci.*, 16:225-235, 1988.
13. Meyer, H.H.D., Güven, B.: Improvement of microtitration plate enzymeimmunoassays for steroid determination by a second antibody technique. *J. Steroid Biochem.*, 25 (suppl.) 139, 1986.
14. Prakash, B. S., Meyer, H. H.D., Schallenberger, E., Van de Wiel, D. F. M.: Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J. Steroid Biochem.* 28:623-627, 1987.
15. Van de Wiel, D.F.M., Kooops, W.: Development and validation of an enzymeimmunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma. *Anim. Rep. Sci.*, 10:201-213, 1986.
16. Meyer, H.H.D.: Possible ways of improving enzymeimmunoassay (EIA) techniques and their application in animal production. IAEA-SM-292/31, 255-262, 1986.