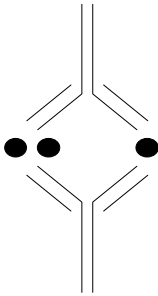
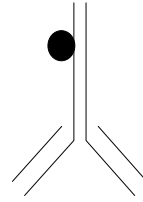


Uygulamalı İMMÜNOSİTOKİMYA TEKNİKLERİ



Hazırlayan
Yrd.Doç.Dr. Alp CAN

Mayıs 1996
Ankara

İçindekiler

Önsöz	5
Başlarken	6
1. İmmünotokimya'ya Giriş	8
2. Antikor Yapısı, Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar	10
İmmün Sistem Hücreleri	10
İmmüoglobulinler	10
Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar	12
3. Materyal Hazırlama ve Saklama, Laboratuvar Kullanımı	14
Antikorların Kullanımı	14
Satın Alma	14
Depolama	14
Kullanım	15
Antikor Titresi ve Dilüsyon	15
Diğer Ajanların Kullanımı ve Laboratuvar Düzeni	16
4. Fiksasyon, Gömme ve Diğer İşlemler	18
Kan Yaymaları	19
Hücre Kültürleri	19
Kriyostat Kesitleri	20
Parafin Kesitler	20
Formaldehit tabanlı fiksatifler	20
Civa Klorür tabanlı fiksatifler	21
5. Enzim İşaretler ve İmmünoenzimatik Boyama Yöntemleri	22
Enzimler	22
Sübstratlar ve Kromojenler	23
Genel Boyama Kuralları	23

İmmünoenzimatik Boyama Yöntemleri	24
Direkt Yöntem	24
İndirekt Yöntemler	24
İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi	26
Enzim-Antienzim Kompleksi Yöntemleri (PAP, APAAP)	27
Avidin (Streptavidin)-Biyotin Yöntemleri (ABC ve StrepABC)	29
6. Flüoresan İşaretler ve İmmünoflüoresan Boyama Yöntemler	31
Flüoresan Mikroskobunda Görüntü Oluşturma Prensipleri	32
Flüoresan İşaretler (Flüorokromlar)	32
İmmünoflüoresan Boyama Yöntemleri	35
Direkt Yöntem	35
İndirekt Yöntem	35
Çoklu İmmünoflüoresan Boyama	35
7. Altın-Gümüş İşaretleme Yöntemleri	37
8. Kontroller, Fon Boyanması	39
Kontroller	39
Ajan Değişirme Testleri	39
Doku Değişirme Testleri	39
Fon Boyanması	40
Hidrofobik Bağlanmalar	40
İyonik (Elektrostatik) Bağlanmalar	40
Serumdaki Doğal Antikorlar	41
Diğer Nedenler	41
Endojen Enzim Aktiviteleri	41
9. Problemler ve Çözümleri	42
10. İmmünohistokimyasal Terimler	43
11. Ekler	45
12. Kaynaklar	51

Önsöz

Sayın Meslektaşlarımız,

8-10 Mayıs 1996 tarihinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarlarında teorik ve pratik uygulamalı olarak yürütülecek olan “Uygulamalı İmmünositokimya Teknikleri Kursu”na ve Ankara’ya hoş geldiniz. Bu kurs Yrd. Doç.Dr. Alp CAN tarafından yürütülecektir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan, gelecekte de belki daha yaygın çalışma alanı bulacak olan adı geçen tekniklerin artık tüm meslektaşlarımızca bilinmesi gerektiği ve bu kursun iyi bir başlangıç olduğu düşüncesindeyiz.

Bilgi alma ve beceri kazanma yanında meslektaşlar arasında tanışmalar, yeni dostluklar ve arkadaşlıkların kurulacağı ayrıca kursun bir başka yönüdür.

Kurs yürütücülerine ve tüm katılımcılara başarı diliyor saygılarımızı sunuyoruz.

Prof.Dr. Ülken Örs
Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği Bşk.
Prof.Dr. Meral Tekelioğlu
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD Bşk.

Başlarken...

İmmünohistokimya tekniklerinin rutin histoloji laboratuvarlarına girmesiyle doku ve hücre boyama yöntemlerinde yeni bir dönem başlamış oldu. Antijen-antikor birleşmesi reaksiyonuna dayanan ve işaretli antikor komplekslerinin kullanıldığı çok duyarlı ve özgül olan bu boyama yöntemleri sayesinde o güne kadar saptanamayan birçok yapı görüntülenebilir oldu. İmmünohistokimyasal yöntemler tanı amacıyla klinik uygulamalarda yerini alırken araştırma amacıyla da kendini sürekli geliştirerek günümüze geldi.

İmmünohistokimya tekniklerini uygulamanın klasik histokimya yöntemlerine kıyasla daha pahalı ve karmaşık olması ülkemizde bu yöntemin uygulamasında gecikmeye neden olmuştur. Kullanılan maddelerin kısa ömürlü olması, saklama koşullarının daha özenle seçilmesi gibi ek sınırlamalar nedeniyle birçok merkez bu tür bir yöntemi kullanmaya başlamaktan kaçınmıştır. Ancak bir tekniği kullanmada gerekli olan bilgi ve deneyim ise en önemli faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Klasik histokimyada olduğu gibi araştırmacının birkaç kez kendi başına yapacağı uygulamadan sonra yönteme alışması ve bundan sonraki uygulamaları kendi başına planlayabilmesi olasıdır. Ancak tetikleyici gücü ve cesareti bulmak çoğu zaman güç olmaktadır.

Bu kursun amacı, ışık mikroskopik düzeydeki immünohistokimyasal yöntemleri uygulamaya yeni başlayanlara yukarıda sözü edilen tetikleyici gücü vermek, bu teknikleri daha önce birkaç kez kullanmış ama bu konudaki bilgisinin yetersiz ve güvenilir olmadığını düşünenlere de pratik yapma ve tartışma olanağı yaratmaktır. Üç günlük kurs boyunca kursiyerler ve eğitmenler birarada pratik uygulama yapma ve problemlere yanıt bulmaya çalışacaklardır. Bir uygulamanın başarılı sonuç vermesi kadar başarısız sonuç vermesi de en az o kadar öğretici olacaktır. Çünkü immünohistokimya tekniklerinin bir özelliği de boyanmanın varlığı ya da yokluğudur. Kullanılan yöntemlerin doğası gereği iki madde arasındaki reaksiyon ya vardır ve sonuç alınır ya da yoktur ve sonuç alınmaz. Olumsuz sonuçlanan boyama deneyleri araştırmacıda ciddi bir karamsarlığa neden olabilir. Bu örnekleri birlikte çalıştığımız araştırmacılar da zaman zaman gözlemekteyiz. İmmünohistokimya tekniklerinin uygulamada diğer yöntemlere kıyasla en belirgin dezavantajı hatanın kaynaklanabileceği faktörün çok olmasıdır. Primer antikorun dilüsyon katsayısından sekonder antikorun çapraz reaksiyona girme olasılığına kadar birçok değişken özgül boyanmada

belirleyici rol oynar. Çok sayıdaki değişkenin denenerek optimum sonuçların alınması zaman, emek ve paraya malolur. Bu kursta bu tür faktörlerin her zaman göz önünde bulundurulması gereği ve hiçbir uygulamanın bir başkasına benzemeyeceği de vurgulanacaktır. Yanı sıra, pratikte çok önemli olan materyal hazırlama, saklama ve laboratuvar kullanımına ilişkin bilgiler üzerinde durulacak ve sonuçları doğrudan etkileyen bu faktörlere bizim uygulamalarımızdan örnekler verilecektir. Elinizdeki kurs notları kurs sırasında anlatılan dersleri, ayrıntılı boyama işlemlerini ve gösterilen slaytların bir özetini içermesi açısından laboratuvar uygulamalarınızda kolay başvuracağınız bir kaynak olarak hazırlanmıştır.

Başta Prof.Dr. Ülken Örs olmak üzere Türk Histoloji-Embriyoloji Derneği Yönetim Kuruluna derneğin katkılarından dolayı, kursun düzenlenme fikrinin ortaya atılması ve yapıcı öneriyle Prof.Dr. Meral Tekelioğlu'na, düzenleme ve organizasyondaki katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölüm Başkanı Prof.Dr. Canan Akbay'a, teorik derslerin sunumundaki katkıları nedeniyle Doç.Dr. Haluk Ataoğlu ve Yrd.Doç.Dr. Esra Erdemli'ye, düzenlemede örnek bir işbirliği sergileyen Dr. Ayça Işık ve Dr. Okan Toygar'a, tüm kimyasal materyalin özenle sağlanması ve mali katkılarından dolayı DATEKS A.Ş.'e içten teşekkürler ederim.

Amacımız, çağdaş bir bilimsel araştırma yöntemini tanıtmak ve yaygınlaştırmaktır. Yararlı olması ümidiyle...

Yrd. Doç. Dr. Alp Can

Kurs Yürütücüsü
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.
Öğretim Üyesi
Mayıs, 1996 - Ankara

1. İmmünohistokimya'ya Giriş

İmmünohistokimya (İHK), hücre ve dokularda yer alan bir molekül (çoğunlukla protein) in situ olarak lokalize edebilmek amacıyla bu moleküle karşı özel yöntemlerle hazırlanmış işaretli antikorların ışık veya elektron mikroskopik düzeyde kullanılması tekniğidir^{1,2}. Biyolojik bilimlerin her alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem yardımıyla herhangi bir molekülün hücrenin/dokunun neresinde ve kabaca ne oranda yer aldığı gösterilir.

İlk immünohistokimyasal uygulama 1941'de Albert Coons ve arkadaşları³ tarafından flüoresan bir boyayla bir antikorun birleştirilip doku kesitlerinde bir antijeni göstermek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Antijen-antikor birleşme reaksiyonundaki yüksek duyarlılığa dayalı olan bu yöntemde doku ve hücre komponentlerinin yerleşimleri kolaylıkla belirlenebilmektedir. Ancak çapraz reaksiyon, nonspesifik fon boyanması, antijenin ya da antikorun stabilitesindeki değişimler gibi genel problemler bu tekniğin uygulamasında bir takım sınırlamalar ve zorlukları beraberinde getirmektedir.

Geçtiğimiz 15 yıl içinde özellikle moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler, gerek immünohistokimyasal prensibe dayanan mikroskopik görüntüleme yöntemlerinin duyarlılığında ve güvenilirliğinde gerekse bu teknikler yardımıyla gösterilen oluşumların sayısında çok hızlı artışa neden olmuştur.

İHK'da en önemli rolü oynayan ajanlar antikorlardır. İHK, antikor moleküllerini doğal ortamlarından alıp onları dokudaki antijenleri tanımları için kullanır. Eğer antikor söz konusu antijeni tanırsa buna bağlanır. Antikor moleküllerinin yapısı oldukça karmaşık olmakla beraber temel yapısı "Y" şeklinde iki zincirden oluşur, Y'nin iki adet olan kısa bacakları antijene bağlanır. İHK'da iki tür antikor kullanılır; bunlar monoklonal ve poliklonal antikorlardır.

¹ Polak JM, Noorden SV: An introduction to immunocytochemistry: current techniques and problems. *Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks*, 1988.

² Osborn M: Immunofluorescence microscopy of cultured cells. "*Cell Biology. A Laboratory Handbook*" (J.E. Celis), Academic Press, San Diego, 1994, pp:347.

³ Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47: 200-202.

Poliklonal antikorlar, bir hayvanın (genellikle tavşan) ilgili protein molekülüyle immünize edilmesi sonucu oluşan antikorlardır. Tavşanın immün sistemi zerk edilen proteini yabancı madde olarak tanır ve buna karşı antikorlar yapar. Antikorlar antijen molekülünün küçük bir bölgesini tanırlar, bu nedenle bir protein molekülünün farklı bölgelerini tanıyan çok sayıda antikor meydana getirilmiş olur. Yani söz konusu proteinle karşılaşmış hayvanın kanında bu proteinin farklı bölgelerine karşı reaksiyon veren antikorlardan oluşan bir poliklonal antikor kokteylinin (poliklonal serum) varlığı söz konusudur.

Poliklonal antikorların yeterince özgül olamaması nedeniyle 1970'li yılların sonlarına doğru daha özgül olan monoklonal antikorlar geliştirildi. Monoklonal antikor (Mab) üretim tekniğinin gelişimi immünotokimya alanındaki en önemli gelişmelerden birisidir. Antikor üreten normal bir B lenfositin çekirdeğiyle bunun malign karşılığı olan multiple myeloma hastalarından izole edilen ve tek bir klona ait sonsuz sayıda antikor üreten bir hücrenin çekirdeğinin birleştirilmesi (hibridlenmesi) sonucunda Köhler ve Milstein⁴ tarafından geliştirilen bu teknik (bu araştırmacılar bu yöntem sayesinde Nobel ödülünü almışlardır) kullanılarak üretilen monoklonal antikorlar günümüzde rutin olarak tanı, tedavi ve araştırma amacıyla kullanılan ileri derecede özgül moleküllerdir. Monoklonal antikorlar hedef moleküldeki bir bölgeye (epitop) özgülürler ve burayı tanıyarak yapışırlar. İSK, monoklonal antikorların yaygın olarak kullanıldığı alanlardan sadece birisidir. Bunun dışında hücre akışkan tekniği (flow cytometry), immünoelektroforez, immüno blotting, immüno presipitasyon gibi çok yaygın kullanılan tekniklerin vazgeçilmez ajanlarından birisidir. MA üretimi ve kullanımıyla ilgili daha ayrıntılı bilgiyi kurs notlarının bundan sonraki bölümünde bulabilirsiniz. Özgülük testleriyle kantite, kalite ve özgülük dereceleri saptanır ve buna göre sınıflandırılırlar. Bu denli önemli olmaları nedeniyle bu kursun başında (bkz. Bölüm 2) temel immünolojik kavramlardan ve antikor yapısından söz edilecektir.

İSK'da kullanılan yöntemlerden en yaygın olanları immünoenzimatik ve immüno flüoresan yöntemlerdir. Enzimatik yöntemlerde antikorun enzime bağlanması, daha sonra da enzimin substratı ile reaksiyona girip renkli görünür ürün oluşturması prensibi kullanılır. En yaygın kullanılan enzimler horseradish peroxidase (bayır turbu peroksidaz) ve alkalın fosfataz'dır. Piyasada bu iki enzimle de konjuge edilmiş antikorlar mevcuttur. Primer antikor uygulandıktan sonra enzim işaretli sekonder antikor uygulaması ve arkasından uygun substrat eklemesiyle istenen doku antijeni görünür hale gelir. Dokuda ne kadar çok antijen varsa o kadar çok bağlanma olacak ve dolayısıyla o kadar koyu boyanma olacaktır. Ancak immünoenzimatik veya immüno flüoresan yöntemlerle işaretlenmiş doku kesitlerinde kantitatif analiz yapmak pek kullanışlı ve güvenilir bir yol sayılmayabilir. Son yıllarda kullanıma giren bilgisayar yardımıyla görüntü analizi yöntemleri optimum boyanma koşullarında bir oranda bu açığı giderebilmektedir.

Bugün immünotokimya rutin hale gelmiştir. Elektron mikroskopik düzeyde daha iyi preparasyon hazırlama yöntemleri denenmekte ve her geçen gün iyileştirilmektedir. Son yıllarda immünotokimya prensiplerini kullanarak protein yerine mRNA'nın görüntülenebildiği *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle proteinlerin sentezlenip hızla hücreden salındığı durumlarda, proteinlerin geçici süreyle var olduğu durumlarda ya da güvenilir antikorların mevcut olmadığı koşullarda başvurulmuş bir yöntemdir. Gerek immünotokimya gerekse *in situ* hibridizasyon, doku ve hücrelerdeki protein ekspresyonlarına ilişkin eşsiz bilgilerin oluşmasını sağlayan tekniklerdir.

⁴ Köhler G, Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497.

2. Antikor Yapısı, Monoklonal ve Poliklonal Antikorlar

İmmüno kimyayı yeterince anlayabilmek, kullanım alanlarını ve sınırlarını kestirebilmek için önce temel immünoloji bilgisine gerek duyulur. Bu amaçla, bu bölümde kısaca immün sistem hücreleri, antikor yapısı, yapay olarak oluşturulan poliklonal ve monoklonal antikorların özellikleri aktarılacaktır.

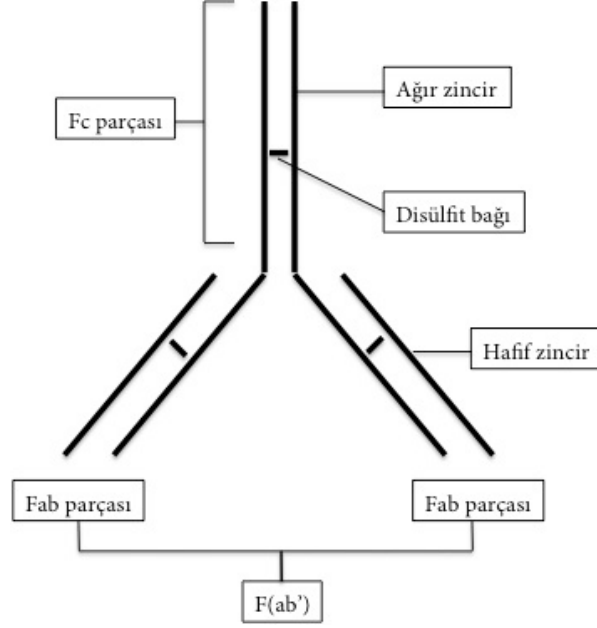
İmmün Sistem Hücreleri

İmmün sistem vücutta çok iyi çalışan bir orkestraya benzetilebilir. Bu orkestranın üyeleri çok sayıdaki immün sistem hücresi ve bunlardan salgılanan mediyatör maddelerdir. Bu hücrelerin hepsi kemik iliğinde bulunan pluripotent kök hücrelerinden köken alır ve farklılaşmaları lenfoid ve myeloid olmak üzere iki yoldan gerçekleşir. İmmünolojik yanıtta en önemli rolü oynayan T ve B lenfositler lenfoid yolla gelişirler. T lenfositler kemik iliğini terk ettikten sonra timusa gelip burada gelişmelerini sürdürür ve daha sonra dolaşıma çıkarlar. B lenfositler ise kemik iliğinde gelişip buradan kana verilirler ve daha sonra B lenfositlerine dönüşürler. Yaşam süreleri yıllarla ifade edilir. İnsanda T ve B lenfositlerin birbirine oranı 3/2'dir. Karşılıklı etkileşimlerle bu denge sabit tutulur. T lenfositlerinin temel fonksiyonu *lenfokin* denen bir dizi madde salgılayıp doku düzeyinde immünojik yanıt oluşturmak, B lenfositlerinin temel fonksiyonu da sistemik bir yanıt oluşturan *immünoglobulinler* adı verilen bir grup protein salgılamaktır. B lenfositin immünoglobulin sentezi T lenfositlerinin alt tipleri olan T-helper ve T-suppressor hücrelerin kontrolü altındadır. Antikor dediğimiz proteinler immünoglobulin yapısındadır ve immüno kimyasal ajanların temelini oluşturur.

İmmünoglobulinler (Ig)

Serumda bulunan immünoglobulinler çoktan aza göre 5 sınıftır; IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE olmak üzere. Bunlar, MA 50.000-75.000 olan iki ağır zincir ve MA 25.000 olan iki hafif zincirden oluşan simetrik yapılu protein molekülleridir. Her bir tip Ig molekülünde her iki ağır zincir ile her iki hafif zincir birbirinin aynısıdır. Ağır zincir, molekülün antijenik ve yapısal özelliğini tayin eder. Beş tip ağır zincir vardır; gamma (γ)=IgG, alfa (α)=IgA, mu(μ)=IgM,

delta (δ)=IgD ve epsilon (ϵ)=IgE olmak üzere. Buna karşın iki tip hafif zincir vardır; lamda (λ) ve kapa (κ) olmak üzere. Kapa ve lamda zincirlerinin dağılımı Ig sınıflarını ve türler arasındaki farkı belirler. İnsanda IgG'deki kapa'nın lamdaya oranı 2:1'dir. Buna karşın faredeki IgG'in %95'i kapa yapısındadır. Hafif ve ağır zincirler ile ağır zincirlerin birbiri arasında disülfid köprüleri vardır. Bu köprülerin sayısı her IgG molekülleri alt tipinde farklılık gösterir.



İSK'da kullanılan IgG tipi IgG ve IgM'dir. IgG iki adet gamma ve iki adet kapa veya iki adet gamma ve iki adet lamda molekülünden oluşur. Şekil 1'de bir IgG molekülünün yapısı şematik olarak gösterilmiştir. Hafif zincirlerin ağır zincir uçlarıyla birlikte bulunduğu heterojen uçlar antijene bağlanan Fab uçlar olarak adlandırılır (antigen binding fragments). İki Fab parçası birlikte $F(ab')_2$ olarak adlandırılmıştır. Homojen ağır zincir uçlarıysa Fc olarak adlandırılır (crystalline fragments). Fc parçası bir diğer antikor molekülüne bağlanabilir. Tüm bu parçalar IgG molekülünün bir takım hidrolitik enzimlerle fonksiyonel olarak parçalanabilmesi sonucu ortaya çıkmıştır.

IgM molekülüyse 180kD'lik 5 adet IG molekülünden meydana gelen 900kD büyüklüğünde dev bir moleküldür. Mu ve kapa/lamda zincirlerinden yapılmıştır. Hayvanda genel immünitede en çok bulunan antikor tipi IgG iken, bir antijene ilk yanıt veren antikor tipinin IgM olduğu saptanmıştır. Antijenin uygulanmasından 1. haftanın sonuna kadar geçen sessiz dönemde IgM varlığı söz konusuysa iki hafta içinde IgG molekülleri belirlemeye başlar.

Antijen ile antikor arasındaki bağ çok sayıda zayıf nonkovalent ilişkiden meydana gelir. Bunlar arasında elektrostatik bağlar, hidrojen bağları, Van der Waals ve hidrofobik bağlar sayılabilir. Tipik dissosiasyon sabiti 10^{-5-10^7} dur. Ag-Ab bağları genellikle pH'nın 4-9 olduğu zaman veya geniş iyon konsantrasyonlarında (0-1M NaCl) sabittir.

Poliklonal (Pab) ve Monoklonal (Mab) Antikorlar

	Poliklonal Antikorlar	Monoklonal Antikorlar
Özgüllük (<i>specifity</i>)	Antijen molekülünün yüzeyinde çok sayıdaki antijenik determinant bölgesine bağlanan birçok klonal ürünü barındırır. Bu nedenle antijen molekülündeki ufak farklar (örn. Genetik polimorfizm vs) Pab'ın bağlanmasında pek bir değişiklik yapmaz	Genellikle antijen molekülündeki belli bölgelere bağlanır. Bu nedenle antijen yüzeyindeki değişimler bağlanmayı engelleyebilir.
Afinite (<i>affinity</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Farklı afiniteye sahip ($>10^6$ ve $>10^9$ litre/mol) antikorlar barındırır. O nedenle yapısındaki değişimler (örn konjugasyon) afinitelerini anlamlı ölçüde etkilemez Bağlanmış antikoru gidermek için yapılan şiddetli yıkamalar bile problem oluşturmaz, bağlanma geniş pH (4-9) ve tuz konsantrasyonunda (0-1 M NaCl) bile korunur 	<ul style="list-style-type: none"> Her klonal ürünün afinitesi tanımlanmıştır. O nedenle aynı klondan elde edilen antikorların afiniteleri de homojendir. Bu özellikleri afinite ile ayırıştırma yöntemlerinde bir avantajdır (affinity purified antibody). Yapısındaki değişimler afinite kaybına neden olabilir. Antijen-antikor afinitesi düşükse şiddetli yıkamalar ayrılmaya neden olabilir
Bağlanma kinetiği (<i>kinetics of binding</i>)	Çok önemli değil	Antijene bağlanma değerleri farklıdır. Bağlanma 15-90 dk arasında değişir. Kantitasyon ve tutarlı boyanma derecelerini sağlayabilmek için inkübasyon sürelerini sabit tutmak gerekir
Çapraz bağlanma (<i>cross binding</i>)	Antikor heterojenitesi çapraz bağlanmayı kolaylaştırır	Mab'lar 2 veya daha fazla antikor bağlayan bölgesi olan antijenlere çapraz bağlanabilir
Çapraz reaksiyonlar (<i>cross reactions</i>)	Birbirine yakın türler arasında çok sık görülür (örn anti-fare IgG sıklıkla anti-sıçan IgG ile reaksiyona girer)	Genellikle azdır

İyi bir antikorda bulunması gereken üç koşul şunlardır;

1. Antijene yüksek afinite göstermesi. Bağlanmadan sonraki yıkamalarda bağlanmamış olanların ayrılıp, bağlanmış olanların kalmasını sağlar.

2. Yüksek özgüllük. Antikora antijeninden başka bir molekülün bağlanması ve istenmeyen fon boyanmasının engellenmesini sağlar.
3. Yüksek titre/dilüsyon. Yüksek dilüsyonlarda kullanılabilen antikorlar özgül olmayan reaksiyonların giderilebilmesine olanak verirken daha ekonomik bir kullanım da sağlarlar.

Tablo 1. Antikor tiplerinin incelenen komponentlere göre seçimi.

	IgG fraksiyonu	F(ab') ₂ fragmanı	Fab fragmanı	Affinity purified antikor	Affinity purified F(ab') ₂ antikoru
Hücre içi boyama		+	+		+
Doku/hücre kültüründe boyama	+	o	o	+	o
Doku kesitinde boyama	+	+	+	+	+
Blot boyaması	+	o	o	+	o
Hücre ayrıştırma (akım sitometresi)	o	o	o	+	+
Flüoresan immünessey	+	o	o	+	o

+ = tavsiye edilir o = kabul edilebilir

3. Materyal Hazırlama, Saklama, Laboratuvar Kullanımı

Antikorların Kullanımı

ISK'da optimum sonucu alabilmek için antikor kullanımında belli koşulları yerine getirmek zorunludur. Doğru yöntemlerle hazırlanmış maddeleri, stabilitesi bozulmadan aylarca hatta yıllarca saklamak mümkündür. Satın alınan maddeyle birlikte gelen prospektüslerde ve şişelerin üzerinde yazılı olan üretici firmanın uyarıları ve tavsiyelerine mutlaka uyulmalıdır. Yanı sıra kullanıcıya ait deneyimler de bir yere not edilmeli ve kullanımlarda göz önüne alınmalıdır.

Satın Alma

Ticari olarak elde edilen antikorların çoğu yıllarca dayanacak özelliktedirler. Yine de kullanıcının önlemleri bu süreyi azaltabilir veya artırabilir. Ülkemizde çok sınırlı olarak üretilen bazı poliklonal antikorlar dışında genel amaçlı monoklonal antikor üretimi henüz yoktur. O nedenle gereksinim duyulan antikorların çoğu yurt dışından satın alma veya hibe yoluyla elde edilmektedir. Bu amaçla yaygın olarak aracı firma kullanılmaktadır. Üretici firmalar antikorları genellikle iki şekilde paketleyip piyasaya sunarlar. Bunlar toz veya sıvı şeklindedir. Toz şeklinde liyofilize edilmiş antikorlar (genellikle sekonder antikorlar) ortam ısısında (ambient temperature) nakledilir. Sıvı olanlarsa buz içinde bir pakette gelirler. Konvansiyonel buz erimedığı sürece ortam ısısını yaklaşık 0°C'de tutar. Kuru buz ise ömrünün daha uzun ve ısısının daha düşük olması nedeniyle tercih edilir. Nakliye koşulları sınırlı olduğu için buz içinde nakledilen maddelerin nakliye tutarları diğerlerine göre yüksektir. Laboratuvara ulaşan antikorlar için bir bilgi kayıt formu tutulması sonsuz faydalar sağlar. Özellikle çok kullanıcı laboratuvarlarda bu bilgi formları ortak bir dil oluşturur, böylece kavram karışıklıkları minimum düzeye indirilir. Yanı sıra maddeyle birlikte gelen prospektüsleri (specification sheet) de dosyalayıp saklamak yararlı olur. Kurs notlarının sonunda yer alan Ekler bölümünde bizim laboratuvarımızda yıllardır kullanmakta olduğumuz bir bilgi formu örneğini bulabilirsiniz. Bu formu kendi gereksinimlerinize göre değiştirebilirsiniz.

Depolama

Antikorların kullanıcı tarafından teslim alındıktan sonraki depolanma aşamasında iki faktör önemli rol oynar. Bunlar saklanacak ortam ve ortamın ısısıdır. Toz olarak gelen antikorlar eğer hemen kullanılmayacaksa genellikle +4°C'de kendi ambalajlarında saklanırlar. Eğer kullanılacaksa stok solüsyon hazırlamak için sulandırılırlar. Buz içinde sıvı olarak gelen antikorların depolanması için en iyisi hemen küçük parçalara ayırıp -20°C'de saklamaktır. Yine de saklama koşulları ve ısısına ilişkin üretici firmanın uyarıları ön planda tutulmalıdır. Küçük parçalara bölünen sıvı antikorlar protein emme özelliği en az olan polipropilen, polikarbonat veya borosilikat şişelerde

veya tüplerde saklanmalıdır. Çok düşük konsantrasyonlarda protein içeren maddeler (10-100 µg/ml) genellikle bol miktarda ilave edilen bir başka proteinle birlikte (örn. %0.1-1 bovin albumini) depolanır. Böylece polimerizasyon sırasında proteinin kaybı ya da kap tarafından emilimi engellenir. Ağız sıkıca kapalı olması gereken bu kaplar ayrıca bir kutuya ya da torbaya konabilir. Zamanla buharlaşma nedeniyle kayıp olma tehlikesine karşı bölme işleminin 10 µl'nin altında yapılması önerilir. Bu nedenle depolama amacıyla no-frost soğutucu ve derin donduruların kullanımı tavsiye edilmez. Günlük kullanım amacıyla stok solüsyonlarının sulandırılmasıyla oluşturulan seyreltilmiş protein solüsyonları +4°C'de saklanır. Günlük kullanımda sıkça dondurma ve çözme işlemleri proteinin stabilitesine olumsuz etki yapar. O nedenle seyreltilmiş antikorların bir kez daha dondurulması önerilmez. -20°C'de saklanan konsantre antikorlar yavaş çözdürülmeli, bu işlem sırasında yüksek ısı kullanılmaktan kaçınılmalıdır. Antikorlar ışıktan olabildiğince korunarak saklanmalıdır. Işık (buzdolabının lambası vs) bazı proteinlerin yapısında yıkılıma neden olabilir. Ayrıca flüoresan işaretlerle konjuge edilmiş antikorlar da ışık etkisiyle zaman içinde flüoresan ışımaya özelliklerini kaybederler. O nedenle genellikle antikor yapısındaki proteinleri ışık almayan kaplarda saklamak yerinde olur.

Kullanım

Kullanımda üç temel kuralı göz önüne almak gerekir. Bunlar; kontaminasyonun engellenmesi, sıcağın ve ışıktan korumadır. Kontaminasyon genellikle kirli pipet uçlarıyla olur. O nedenle tüm işlemlerde temiz, daha önce kullanılmamış pipet ucu kullanılmalıdır. Antikor solüsyonlarında zamanla bakteriyel kontaminasyon görülebilir. Özellikle antiserumlar bunun için uygun adaylardır. Bu amaçla üretici firmalar piyasaya sürdükleri protein solüsyonlarına belli oranlarda koruyucu ve antibakteriyel ajanlar eklerler (örn. sodyum azide= NaN_3). Eğer mikrobiyal kontaminasyon meydana gelmişse bunu gidermeye çalışmak yerine solüsyonu çöpe atmak yerinde olur. Bakteriler yaygın fon boyanması meydana getirirler. Eğer kontamine olmuş solüsyon çok değerliyse orta derecede bir santifüjden sonra düşük protein tutucu 0.22µm göz aralıklı filtrelerden süzmek olumlu sonuç verebilir. Günlük kullanım için oda ısısına çıkarılan antikorlar mümkünse buz içinde tutulmalı ve kullanımı sona erdiğinde hemen depolama ısısına transfer edilmelidir. Böylece kullanım ömrü artacaktır. Eğer kullanım sırasında istemeden yukarıda belirtilenlere uyulmamış ise o antikor solüsyonunu çöpe atmak yerinde olur. Çünkü işe yaramayan bir antikorla yapılacak boyama zaman ve emek kaybından başka birşey değildir.

Antikor Titresi ve Dilüsyon

İSK'da antikor titresi, antiserumun optimum boyanma derecesi ve en az fon boyanması yaratacak en fazla seyreltilmiş şekli olarak tanımlanır. Optimum seyreltme, sadece boyanmanın en kuvvetli olması değil aynı zamanda zeminin de en az boyanması anlamına gelir (maksimum signal to noise ratio). Seyreltme derecesine etkili iki faktörden birincisi poliklonal veya monoklonal antikor solüsyonu içindeki özgül antikor moleküllerinin miktarıdır. Poliklonal antikor solüsyonlarında antikor miktarları mililitre serumda mikrogram cinsinden verilir. Bu bilgi yararlı olmakla birlikte pratikte çoğu zaman pek birşey ifade etmez. İkinci faktör antikor molekülünün antijene yapışma afinitesidir. Eğer seyreltme oranı sabit tutulursa yüksek afiniteli antikorla yapılacak boyanma daha kısa sürer ve parlak olur.

Bir hibridoma hücresi kültüründen elde edilen monoklonal antikorun ilk deneme dilüsyonu 1:5 ile 1:100 arasında olmalıdır. Biz laboratuvarımızda ilk kez kullanacağımız bir antikoru eğer kültür hücreleri için kullanacaksak 1:50, parafin kesitler için kullanacaksak 1:10 oranında sulandırmaktayız. Sekonder antikorlar daha yüksek seyreltme derecelerinde kullanılır. Örneğin peroksidaz enzimi ile bağlı sekonder antikorlar 1:200 ve yukarısı, peroksidaz anti-peroksidaz kompleksi solüsyonları 1:200-1:1000 arasında sulandırılarak kullanılırlar. Seyreltme oranı kullanılacak doku tipi, kesit tipi (dondurma veya parafin) ve kullanılacak ısıya göre değişir. Tablo

2'de doku ve/veya hücre hazırlama şekilleri antikor solüsyonu içindeki inkübasyon sürelerinin uzunluklarına göre sıralanmışlardır. En kısa süspansiyon kültürleri, en uzun küçük doku blokları inkübe edilir. Tablo 3'de ise, yaygın olarak uygulanan inkübasyon ısıları ve süreleri verilmiştir. Bunların dışında doku veya hücrenin tipi de inkübasyon koşullarını belirler. Deneyimlerimiz küçük kemirici hayvanlardan elde edilen hücrelerin maymun ve insan hücrelerine göre daha uzun inkübasyon süreleri gerektirdiğini göstermiştir.

Tablo 2. İSK'da kullanılan hücre/doku preparasyon tipleri

süspansiyon kültürleri
monolayer hücre kültürleri
yayma hücre preparasyonları (kan vs.)
ince frozen kesitler (2-6 µm)
kalın frozen kesitler (7-15 µm)
ince parafin kesitler (4-7 µm)
kalın parafin kesitler (8-15 µm)
küçük doku blokları

Tablo 3. Antikor inkübasyon koşulları

+4°C'de 6-24 saat
oda ısısında 1-6 saat
37°C'de 30 dk-2 saat

Seyreltmeler özel durumlar dışında fosfat tamponlu tuzlu suyla (PBS=phosphate buffered saline) veya fon bloklaşması için kullanılan protein çözeltileri ile yapılır. Hangisinin daha iyi sonuç vereceği kullanıcı tarafından denenerek bulunmalıdır. Ayrıca seyreltme çözeltisinin içine antikorun penetrasyonunu artırıcı, koruyucu bazı ajanlar da eklenebilir.

Seyreltme işlemi dondurucudan çıkarılan küçük miktardaki stok antikorun erimesinden sonra mikropipet yardımıyla yapılır. Genellikle 1:200'e kadar olan seyreltmeler doğrudan yapılırken bundan daha yüksek derecelerdeki seyreltmeler için iki aşama kullanılır. Örneğin önce 1:100'lük çözelti hazırlanır daha sonra ikinci aşamada bu sıvı 1:10 seyreltilerek 1:1000'lik çözelti hazırlanır.

Diğer Ajanların Kullanımı ve Laboratuvar Düzeni

Bir İSK laboratuvarında bulunması gereken ana sınıf sarf maddeler ve saklama koşulları Tablo 4'de verilmiştir. Buna göre oda ısısında saklanacak maddeler için karanlık ve kuru bir dolap, +4°C'da saklanacaklar için soğutucu ve -20°C'de saklanacaklar için derin dondurucu gerekir. Hazırlanmış bir preparasyonun da çoğunlukla soğutucu veya dondurucuda saklanması gereği hatırlanacak olursa soğutucu-dondurucu hacminin dar tutulmamasında sonsuz faydalar vardır (ortalama 250 litre). Bunların dışında çeşitli inkübasyonlar için gerekli 37°C'lik bir inkübatör veya ılık tabla, vorteks, çalkalayıcı-döndürücü, ısıtıcı sıcak tabla, manyetik karıştırıcı, pH metre, ayarlanabilir mikropipetler (1-1000 µl) gerekir. Başka uygulamalar için kullanılan benzer cihazlar paylaşılabilir. Bunların dışında, kesit almak için mikrotom, kriyostat; gözlem için mikroskop gibi aygıtların laboratuvar içinde ya da yakınında bulunması faydalı olur.

Tablo 4. Bir İSK laboratuvarında bulunan sarf malzemeler ve saklama sıcaklıkları.

Madde türü	Saklama Isısı (°C)
Primer ve sekonder antikorlar stok	-20
seyreltilmiş	+4
Non immün serumlar	-20
Enzim kompleksleri	-20
Kromojenler	-20
Tamponlar	+4 ve OI*
Koruyucu ajanlar	OI
Fiksatifler	-20, +4, OI
Fon boyları	OI
Kapatma sıvıları	+4, OI
Deterjanlar	+4

* oda ısısı

Sarf malzeme ve temel cihazların yanı sıra cam ve metal malzemeler sıklıkla gerekir. Boyamaların bazı aşamalarında gerekli olan cam şaleler, genel amaçlı ölçümler, karışırtmalar ve depolamalar için cam veya plastik mezürler, beher, balon joje ve erlen mayerler, lam, lamel, ince uçlu penset, cam veya plastik desikkatörler, özellikle antikor depolamak amacıyla Ependorf tüpleri (0.75-1.5ml), termometre, parafin filmler kullanılır. Laboratuvar içinde su kaynağının olduğu bir ıslak bankonun varlığı çok faydalıdır. Boyamalar sırasında kullanılan pek çok cam ve metal malzemenin rutin histoloji laboratuvarında kullanılanlardan ayrı tutulması özellikle boya kontaminasyonlarını önlemek açısından önemlidir.

4. Fiksasyon, Gömme ve Diğer İşlemler

Bir dokuda sınırlı sayıda antijen molekülü vardır. Takip sırasında uygulanacak her basamak, dokudaki antijenik yapıların bir miktar kaybıyla veya bozulmasıyla sonuçlanır. Sonuçta uygulanan İSK yöntemiyle sadece geriye kalan epitoplara işaretlenmiş olur. Fiksasyon, antijenik bölgenin yapısı üzerine en etkili kimyasal girişimlerden birisidir. O nedenle İSK’da fiksasyon çok önemlidir ve araştırılan epitopa göre uygulama farklılıkları gösterir. Araştırmacının her koşulda kullanması gereken fiksasyon yöntemini gözden geçirmesi yerinde olur. Unutulmamalıdır ki, mikroskopide halen mükemmel bir fiksasyon düzeyine ulaşamamıştır. Kaldı ki, kimyasal bir girişim olan fiksasyon ne kadar mükemmel olursa olsun doğal yapıyı bir oranda değiştirmektedir. Bu noktalar göz önünde bulundurulursa, sadece fiksasyondan kaynaklanabilecek yapay görünümün ortaya çıkışına ve yanlış değerlendirilmelere biraz olsun engel olunmuş olur.

Fiksasyonda yapılan, protein molekülünün koagülasyon yoluyla denatürasyonudur. İSK’da amaç proteinleri görünür hale getirmek olduğuna göre proteinin antijenik bölgesini (epitop) korumak gerekir. Protein yapısında aşırı denatürasyon, molekülün bir bölümünün ya da tamamının yapısının bozulmasına ya da maskelenmesine (örn. aldehit grubu fiksatifler kullanılırsa) neden olur. Öte yandan yeteri kadar fikse edilmeyen protein molekülleriyle yıkamalar sırasında akıp gidecektir. Eğer proteinler fikse olup da çevre oluşumlar fikse olmazlarla işaretli yapının doku/hücre içindeki yerleşimi doğru yapılamaz. Bu nedenle minimum zaman ve konsantrasyonda optimum fiksasyon gerekir.

Fiksasyonda işaretlenecek oluşumun *molekül büyüklüğü, sayısı, yeri ve yapısı* önemlidir. Antijenik molekülün küçük olması, bu molekülün orijinal yerinden ayrılıp başka yerlere yayılmasını kolaylaştırır, bu da yanlış değerlendirmeye neden olur. O nedenle, özellikle küçük moleküllerin işaretlenmesi istendiğinde kuvvetli fiksatörler kullanılmalıdır (örn. formaldehit). Öte yandan antijenik yapı büyük ve kompleks yapıdaysa fiksatifin bu yapıyı bozup immün boyanmayı engellemesi daha kolaydır. O nedenle bu tür moleküllerin fiksasyonunda daha hafif fiksasyon yöntemleri uygulanmalıdır (örn. paraformaldehit). Molekülün sayısı da yapılacak fiksasyon yöntemine etkilidir. Her fiksasyonda bir miktar epitop kaybı olduğu düşünülürse epitopun sayıca çok az olduğu durumlarda fiksasyon ile bunun tamamen kaybı söz konusu olabilir. Bu durumlarda ek yöntemlere başvurulur. Eğer ışık mikroskopik yöntemler yeterli olamıyorsa elektron mikroskopik işleme ve görüntülemeye geçilebilir. Ancak onun da kendine göre dezavantajları ve sınırlamaları vardır.

Fiksasyon ajanı ve yöntemini seçerken göz önüne alınması gereken bir başka faktör de epitopun yeridir. Hücre yüzeyinde veya hücre dışı ortamda bulunan bir epitopun fiksasyonu hücre içindeki bir molekülün fiksasyonu arasında bir takım farklar vardır. Örneğin, kesit değil de hücre zarı bütünlüğü bozulmamış bir kültür hücresi içindeki bir epitop işaretlenmek istenirse gerek fiksatörün gerekse antikorların hücre zarını geçip hücre içine girebilmesi için fiksasyon sırasında hücre zarı geçirgenliğini artırıcı bir ek girişime gerek duyulabilir (örn. triton uygulaması). Öte yandan hücre zarı üzerindeki bir epitopu işaretlemek gerektiğinde hücre zarı yapısına minimum zarar verecek hafif bir fiksasyon yöntemi uygulanır (örn. metanol, aseton).

Küçük moleküller olan antijen-antikor birleşme reaksiyonu prensiplerine dayanan İSK tekniklerinde, işlemler sırasında ısıdan da olabildiğince kaçınılır. Parafin blok uygulaması çoğunlukla olumlu sonuç vermekle birlikte defalarca 56-60°C'ye çıkılması nedeniyle ısıya duyarlı bazı moleküllerin işaretlenmesinde parafin bloğa gömme uygulanmaz. Bunun yerine dondurma-kesme (frozen section, kriyotomi) yöntemine başvurulur. Böylece materyal hem fikse edilmiş hem de kesilmiş olur. Dondurma-kesme yöntemi günümüzde doku bloklarının fiksasyonu ve kesilmesi için en sık kullanılan yöntemdir. Parafin ve dondurma blokların dışında kültürü yapılmış hücrelerin ya da lam üzerine yayılmış kan, beyin-omurilik gibi sıvı dokuların da uygun fiksasyonu yapılarak işleme başlanılır.

Bu bölümde sırayla kan ve diğer vücut sıvılarından yapılan yayma preparatların (smear), monolayer hücre kültürlerinin, kriyostat kesitlerinin ve parafine gömülü dokuların fikse edilip takip edilme aşamaları aktarılacaktır.

Kan Yaymaları

- antikoagülan bir madde ile (sodyum sitrat, heparin, EDTA vs) enjektöre alınan periferik kan veya kemik iliği, diğer sitolojik yaymalar alkol ile temizlenmiş ve kurutulmuş bir lam üzerine damlatılarak ya da püskürtülerek yayılır,
- havada kurutulur (oda ısısında yaklaşık 2 saat) (bu aşamada saklamak için lamlar alüminyum foile sarılıp -20°C'de 3-6 saklanabilir ve tekrar kullanmak istendiğinde sarılı lamlar oda ısısına getirildikten sonra açılır),
- metanol, aseton gibi ajanlarla 1-10 dk oda ısısında fikse edilir (1:1 aseton:metanol karışımı kullanılabilir),
- kurumaya yüz tutan lamlar TRIS tamponu (0.05M pH=7.6) (hazırlanışı için Ekler bölümüne bakınız) veya PBS içine alınır ve burada 5 dk. tutulur,
- immün boyama işlemleriyle devam edilir.

Not:

1. Smearler için sadece kurutma da çok nadiren yeterli olabilir.
2. Kurutulmuş hücrelerde genellikle zayıf immün boyanma gösterirler. Bu nedenle antikor ve kromojen inkübasyonlarında daha uzun süre tutulmaları gerekebilir.
3. Sitolojik smearlerde ilk kurutma yapılmaksızın oda ısısında 15 dk %95'lik etanol fiksasyonu kullanılabilir. Daha sonra havada kurutup immün boyamaya devam edilir.

Hücre Kültürleri

Yayma preparasyonlara uygulanan fiksasyon yöntemleri bunlara da uygulanabilir. Seçilecek fiksasyon yöntemi incelenen antijene göre seçilir. Hücre yüzeyinde yerleşmiş moleküllerin fiksasyonu için aseton ve metanolün yanı sıra paraformaldehit de kullanılabilir. Ayrıca aseton/metanol/formaldehit (%40) 19:19:2 oranında karıştırılarak kullanılabilir.

- kültür yapılan hücreler PBS ile kısaca yıkanır,

- %3'lük paraformaldehit (PFA) ile oda ısısında 30 dk. fikse edilir.
- PFA atıldıktan sonra hücreler sıvı ortamda saklanmalı (PBS kullanılabilir) veya kısa bir PBS yıkamasından sonra immün boyamaya devam edilmelidir.

Not:

1. Hücre zarı penetrasyonunu artırmak için fiksatifin içine %0.1 oranında Triton X-100 eklenebilir.

Kriyostat Kesitleri

İSK'da kriyostat kesitler parafin kesitlere göre daha iyi bir antijenik koruma sağlarlar. Ancak morfolojik ayrıntılar ve rezolüsyon açısından parafin bloklar daha iyidir. Kriyostat kesitlere birçok fiksatif uygulanabilir, ancak en yaygın ve bizce de en güvenilir ve kolay olan işlem sırası şöyledir;

- canlıdan alınan 5x5x5 mm boyutundaki doku parçası sıvı nitrojene daldırılır (bir kağıt parçası üzerine konan doku bloğunun üzerine 1-2 damla OCT bileşiği damlatılır) ve 30 saniye sonra donmuş doku alınarak plastik veya metal bir kapaklı kaptan -70°C'de uzun süre saklanabilir. Eğer hemen kesit alınacaksa kriyostatın doku tutucu metal bloğu üzerine alınan parça 4-5 µm kalınlığında kesilir (eksi 10-20°C'de),
- kesitler poli-L-lizin'in %0.1'lik sudaki çözeltisi ile kaplı (opsiyonel) lam üzerine aktarılır,
- oda ısısında 12 saat boyunca (bir gece) kurutulur (bu aşamada fikse etmeden saklamak istenirse lamlar sırt sırta getirilip alüminyum foile sarılarak paketlenir ve -20°C'de 3-6 ay saklanabilir, immün boyama öncesi asetonla fikse edilir),
- +4°C'de 10 dk soğuk asetonla fikse edilir ve havada kurutulur,
- paketlenerek -20°C'de saklanır veya bir sonraki işlemle devam edilir,
- TRIS tamponu (0.05M pH=7.6) veya PBS içine alınır ve burada 5 dk. tutulur,
- immün boyama işlemleriyle devam edilir veya paketlenerek -20°C'de saklanır.

Not:

1. Eğer kesitler hemen boyanacaksa kesit aldıktan sonra 1-2 saatlik kurutmayı takiben aseton fiksasyonundan sonra boyanmaya başlanabilir.
2. Aseton fiksasyonu yerine kızıl-ötesi ışın lambasıyla veya mikrodalga fırın yardımıyla yüksek ısıda fiksasyon yapılabilir. Kızıl ötesi ışında 5 saniye 70°C'de veya mikrodalga fırında 600-700 Watt güçte 5'er dakikalık iki devrede fiksasyon yapılır ve kesit tekrar oda sıcaklığına getirilerek immün boyamaya devam edilir.

Parafin Kesitler

En çok kullanılan doku bloklama yöntemidir. Bu yöntemde çok sayıda fiksatif kullanılır. Burada bunlardan en yaygın olanları yer almaktadır. Özel uygulamalar için literatüre başvurulmalıdır.

Formaldehit tabanlı fiksatifler

En yaygın kullanılanı %37-40'lık formaldehitin %10'luk tamponlu çözeltisidir (hazırlanışı için Ekler bölümüne bakınız). Formaldehit, fiksasyonu sırasında bazik amino asitler arasında çapraz metilen köprüleri oluşur ve bu da antijenik bölgenin maskelenmesine ve immünolojik ajanların moleküle ulaşmasını engeller. O nedenle formaldehit fiksasyonu yapılan durumlarda proteolitik uygulamaya gerek duyulur. Bunun için %0.01'lik proteaz¹ veya %0.1'lik tripsin² kullanılır

¹ Rangdaeng S, Troung LD (1991) Comparative immunohistochemical staining for desmin and muscle specific actin. *Am J Clin Pathol* 96: 32-45.

² Ordóñez NG, Manning JT, Brooks TE (1988). Effects of trypsinization on the immunostaining of formalin fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* 12: 121-129.

(hazırlanışı için **Ekler** bölümüne bakınız). Formaldehit içeren diğer bir fiksatif Bouin solüsyonudur (hazırlanışı için Ekler bölümüne bakınız). Bouin solüsyonu kullanıldığında dehidrasyon öncesi doku bloğunu %70 etanolle 3 kez yıkamak gerekir. Ayrıca kesitlerdeki sarı pikrik asit rengini gidermek için %5'lik sodyum tiyosülfat kullanılmalıdır.

Formaldehitin iki farklı etkisiyle antijenik bölge maskelenebilir. Formaldehit ile yapılan fiksasyonlardan sonra sonuç alınamama durumlarında bu iki etken akla gelmelidir. Birincisi formaldehitin doğrudan epitopa bağlanması ve onun antikora bağlanmasını bloke etmesidir. Bu etki bir ölçüde diğer fiksatifler için de geçerlidir. İkincisi formaldehitin epitopun yakınında ya da kendisinde meydana getirdiği konformasyon değişikliğidir. Eğer epitopta bir değişim söz konusuysa bunun giderilmesi mümkün değildir. Epitopun yapısal değişimi kimyasal veya fiziksel nedenlerle olur. Örneğin sıcak parafine gömme işlemi yüksek ısı (55-60°C) nedeniyle epitopun denatürasyonuna neden olabilir. Ancak epitop yakınında bir değişim nedeniyle epitopun maskelenmesi söz konusuysa fiksasyon sonrası işlemler ve proteolitik uygulama epitopu kullanılabilir hale getirebilir. Uygun monoklonal antikor seçimi de bu aşamada önemlidir (bütün moleküle karşı, γ -zincirine özgü, Fab bölümüne özgü gibi).

- küçük doku blokları (10x10x5 mm) 4-24 saat %10'luk formalinde oda ısısında fikse edilir,
- rutin parafin bloklaması yapılır,
- 5-6 μ m kalınlığındaki kesitler 37°C'de bir gece kurutulur edilir,
- 2 kez 3 dk. ksilende, 2 kez 3 dk. absolu alkolde, 2 kez %95 alkolde, 2 kez %75 alkolde ve son olarak PBS'te hidrate edilir,
- oda ısısında 20 dk. proteolitik uygulama (Tris tamponunda %0.01 Protease + %0.01 CaCl₂ veya %0.1'lik Tripsin) yapılır,
- suda 5-10dk.yıkama
- immün boyamayla devam edilir.

Civa Klorür tabanlı fiksatifler

Formaldehit ile iyi sonuç alınmadığı durumlarda alternatif fiksatifler akla gelmelidir. Bunların başında civa klorür içeren Zenker solüsyonu gelir (hazırlanışı için Ekler bölümüne bakınız). Penetrasyon gücü zayıf olduğu için küçük doku blokları için kullanılmalı ve kısa zamanda fiksasyon sona erdirilmelidir. Sıklıkla civa klorürlü bu fiksatifler formalin fiksasyonuna ek olarak kullanılırlar. Fiksasyon prensipleri koagülasyon özelliğine dayandığı için dokuyu sertleştirirler. Özellikle intrasitoplazmik oluşumların görüntülenmesi için kullanılırlar. Koagülasyon sonrası dokuya penetrasyon daha kolay olduğu için formaldehit tipi fiksatiflere göre antikolar daha kolay penetre olurlar. Formaldehit tabanlı fiksatiflerde olduğu gibi civa klorür içeren bu fiksatiflerle de epitopun yapısında değişim meydana gelebilir. Dezavantajlarından birisi de immün boyama öncesinde civa çökeleklerinin giderilme zorunluluğudur.

- küçük doku parçası oda ısısında 2-15 saat Zenker solüsyonunda fikse edilir,
- bloklar potasyum dikromat artıklarını gidermek için akar suda en az 1 saat yıkanır,
- rutin dehidrasyon uygulanır,
- kesitler 37°C'de bir gece deparafinize edilir,
- ksilende deparafinize edilir,
- ksilende %0.1'lik iyodin solüsyonunda 5 dk. yıkanır,
- rutin hidrasyon yapılır,
- kesitler suda yıkanır ve %5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonunda temizlenir,
- akar suda 5 dk. yıkanır,
- immün boyama ile devam edilir.

5. Enzim İşaretler, İmmünoenzimatik Boyama Yöntemleri

İmmünohistokimyasal işaretlemede iki temel boyama yöntemi kullanılır. Bunlar, enzimatik ve floresan yöntemlerdir. Enzimatik yöntemlerde antijen-antikor bağlanması bazı enzimlerin yardımıyla görünür ve renkli hale dönüşür. Floresan uygulamalarda ise ikincil antikora takılmış floresan ışık yayabilen bir kromoforun ışımaya özelliğinden yararlanılır.

Enzimler

İmmünoenzimatik boyama yöntemlerinde kullanılan enzimler şunlardır:

- *Horseshoe peroxidaz (HRP)*: Bayır turbunun kökünden elde edilen 40 kD büyüklüğünde, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kompleks oluşturup bunu su ve atomik oksijene parçalayan enzimdir. İSK'da indirekt peroxidaz yöntemi, peroxidaz anti-peroxidaz (PAP) yöntemi, avidin-biyotin ve streptavidin-biyotin yönteminde kullanılır.
- *Alkaline fosfatase (AP)*: İnek barsağından elde edilen 100 kD büyüklüğünde, organik esterlerden fosfat gruplarını ayıran, aktivitesi sırasında Mg, Mn ve Ca gibi iyonlara gereksinim duyan enzimdir. İSK'da alkaline fosfatase anti-alkaline fosfatase (APAAP) yönteminde kullanılır.
- *Glükoz oksidaz*: *Aspergillus niger*'den elde edilen 185 kD büyüklüğünde, flavin içeren ve glükozla reaksiyona girdiğinde glükozun oksidasyonunu sağlayan enzimdir.
- *Beta-galaktosidaz*: *Escherichia coli*'den elde edilen 500 kD büyüklüğünde ve 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactoside substrat olarak kullanan enzimdir.

Bunlardan özellikle ilk ikisi çok kullanılır ve oldukça özgül boyanma gösterirler. Enzim kullanılarak ortaya çıkarılan renkli bir ürünün meydana gelme prensibi aşağıdaki formülle gösterilebilir,

1. Enzim (E) + Substrat (S) \Leftrightarrow ES kompleksi
2. ES kompleksi \rightarrow Enzim + Ürün

Sözle ifade etmek gerekirse, enzim, sübstratın ürüne dönüşmesini hızlandıran reaksiyonu katalize eden maddelerdir ve bunu enzim-sübstrat kompleksi oluşturarak yapar. Burada önemli bir nokta reaksiyon sonunda enzimin tükenmediği ve reaksiyondan sonra başka bir sübstrat molekülüyle reaksiyona girdiğidir. Örneğin immünoperoksidaz boyanmada HRP enzimi sübstratı olan H₂O₂ ile kompleks oluşturur, bu kompleks elektron vericisi olan bir kromojenle (örneğin DAB) reaksiyona girer ve renkli ürün oluşur.

Bu reaksiyonlara dışarıdan uygulanan bazı ajanlar enzimin inhibitörü olarak etki yapar. Örneğin anti-bakteriyel amaçlı kullanılan sodyum azide tuzları en iyi bilinen kompetitif inhibitörlerden birisidir. O nedenle, gerek yıkamalarda gerekse seyreltmelerde sodyum azide içeren tamponlar kullanılmamalıdır. Ayrıca, alkalın fosfataz reaksiyonlarında PBS kullanılmamalı, Tris tamponu tercih edilmelidir. Yıkamalar sırasında gerek Tris gerekse PBS tamponları yerine distile suyun kullanılmasının boyanma açısından bir dezavantaj oluşturmadığı rapor edilmiştir¹.

İSK uygulamalarında seçilecek uygun enzimin saptanması bazı kriterlere bağlıdır;

1. enzim ucuz ve saf olmalı,
2. bağlanma (antikor-enzim bağlılığı) ve nonkovalen tutunma enzim aktivitesini azaltsa da yok etmemeli,
3. bağlanmış enzim solüsyon içinde stabil olmalı ve erimemeli (insoluble olmalı),
4. endojen enzim aktivitesiyle özgül antijenik boyanma birbirine karışmamalı,
5. enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan ürünler gözlenebilir ve stabil olmalıdır.

Sübstratlar ve Kromojenler

Yukarıda sayılan her dört enzim türü için farklı sübstratlar ve kromojenler kullanılır (bkz. Tablo 5). Sübstrat ile kromojen birlikte kullanılır ve bir solüsyon içinde genellikle kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanır. Toz maddelerden hazırlanacağı gibi son yıllarda hazırlama ve kullanımı kolay olan hazır tabletleri tercih edilmektedir. Ekler bölümünde hazırlama formüllerini ve kullanımlarını bulabilirsiniz.

Genel Boyama Kuralları

Tüm boyamalar sırasında aşağıdaki kurallara dikkatle uyulmalıdır;

- her antikör uygulamasından sonra serbest antikörlerin ortamdan uzaklaştırılması için kesitler iyice yıkanır,
- yıkamadan sonra sıvının fazlası kesite değmeden lamın kenarından kurutma kağıdına emdirilerek alınır,
- çok sayıda kesit aynı anda boyanıyorsa 3-5 tanesi birlikte takip edilir,
- lamlar düz ve nemli ortamda inkübe edilmelidir, böylece inkübasyon sırasında antikör solüsyonunun akıp gitmesi veya buharlaşması engellenir. Bu amaçla kapaklı kaplar kullanılabilir. İnkübasyonların +4°C'de, oda ısısında veya 37°C'de yapıldığı göz önüne alınarak buna uygun kaplar seçilmeli, floresan boyamalarda karanlık bir ortama gerek olduğu hatırlanmalıdır.

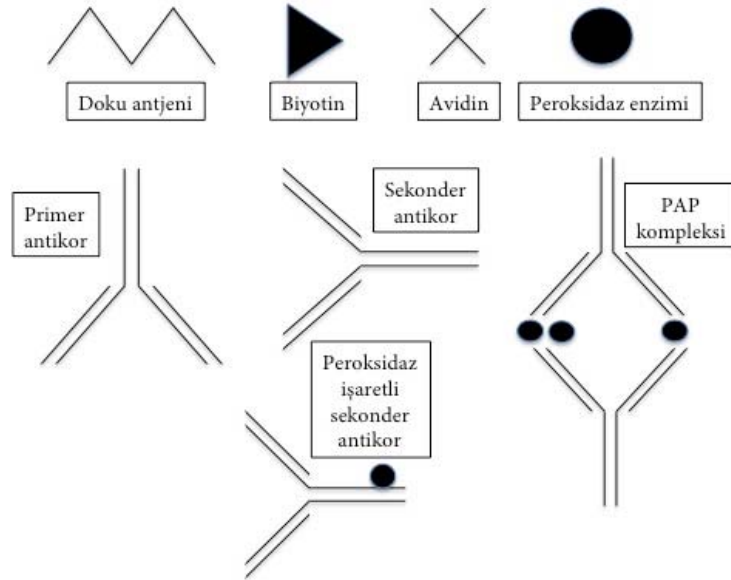
¹ Boenisch T. Basic Enzymology. In "Handbook of Immunochemical Staining Methods". DAKO Corporation, California, 1989. p:13.

Tablo 5. İSK'da çok kullanılan enzim işaretler ve bunlarla birlikte en sık kullanılan sübstratlar.

Enzim işareti	Sübstrat	Renk	Son Ürün
Peroksidaz	3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	kahverengi	çözünmez
	3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC)	kırmızı	çözünmez
	4-Chloro-1-Naphthol (4C1N)	mavi	çözünmez
Alkalin Fosfataz	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT)	mavi-mor	çözünmez
	Fast Red/Naphthol AS-TR Phosphate	kırmızı	çözünmez

İmmünoenzimatik Boyama Yöntemleri

Birçok immünoenzimatik boyama yöntemi vardır. Seçilecek yöntem, araştırmacının gereksinimine, kullanılan dokuya, istenen duyarlılık derecesine, inkübasyon zamanına ve parasal olanaklara göre seçilir. Bu bölümde en yaygın kullanılan immünoenzimatik yöntemler olan, direkt yöntem, indirekt peroksidaz yöntemi, peroksidaz-antiperoksidaz yöntemi, avidin-biyotin yöntemi, streptavidin-biyotin yöntemi ve alkalin fosfataz-antialkalin fosfataz yöntemleri tanıtılacaktır. Yöntemlerin daha iyi anlaşılır olabilmesi için antijen molekülünü, primer, sekonder antikorları ve enzim komplekslerini ifade eden semboller kullanılmaktadır (Şekil 2).

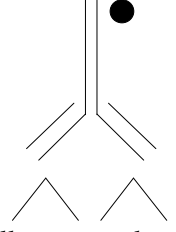


Şekil 2. İmmünoenzimatik yöntemlerde kullanılan semboller.

İndirekt immünoenzimatik yöntemlerin en önemli avantajları arasında gözlemlerin aydınlık saha ışık mikroskopunda yapılması ve preparatların uygun koşullarda yıllarca saklanabilmesi sayılabilir.

Direkt Yöntem

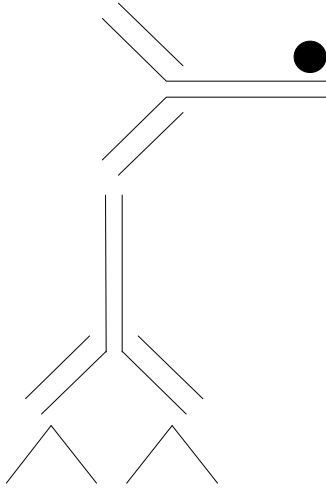
Antikoru doğrudan enzim işaretiyle bağlı olduğu tekniktir. Tek bir işlem gerektirdiği için hızlıdır ve özgül olmayan reaksiyonlar azdır. Ancak ancak tek bir antikoru kullanılabilir olması kullanımı sınırlamıştır. Günümüzde pek yaygın değildir.



İndirekt Yöntemler

İki basamaklı olan indirekt yöntemlerde birden fazla antikör molekülü kullanılır. İlk sıra antikör *primer antikör* adını alır ve işaretlenmek istenen doku antijenine karşı geliştirilmiş, herhangi bir işaret içermeyen antikör molekülüdür. Bunun üzerine ikinci sırada yer alan *sekonder antikör* konur. Sekonder antikör primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul eder. Bu ikili antikör yapısının üzerine de substrat-kromojen solüsyonu eklenerek sonuçta söz konusu doku antijeni mikroskop altında görülür bir renk haline getirilmiş olur.

Yukarıda temel prensibi yazılı olan indirekt yöntemlerde doku antijeninin yapısı ile primer ve sekonder antikörlerin hangi hayvanda üretildiğinin büyük önemi vardır. Bu noktada yapılacak bir hata reaksiyonun gerçekleşmemesine ve sonucun olumsuz gelişmesine neden olur. Bir örnek vermek gerekirse; fare dokusundaki insülin hormonunu tanıyabilecek bir primer antikörle işe başlanıyorsa, fare insülinine karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikör seçilir (anti-insülin, mouse monoklonal). Bunun üzerine primer antikoru tanıyacak olan fareye karşı geliştirilmiş bir sekonder antikör kullanılır (anti-mouse IgG). Sekonder antikörün insüline karşı olması gerekmez, önemli olan insülin antikörünün elde edildiği hayvanın immünglobulinlerine karşı olmasıdır. Sekonder antikör, bu özelliğinin yanı sıra seçilecek indirekt yöntemeye göre bir enzim işaret taşımalıdır.



Yukarıdan anlaşılacağı üzere incelenecek dokunun hangi canlıdan alındığı önemlidir. Örneğin insandan elde edilen bir primer antikör fare ya da tavşandaki doku antijenlerini tanıyamaz. Antikör üretici firmalar sattıkları antikörlerin İSK veya immüno blotting düzeyinde hangi hayvanların antijenleriyle çapraz reaksiyon verebildiklerini not olarak belirtmektedirler. Bazı epitoplara, birçok canlı türünde aynı olduğunda bir fare antikoru diğer hayvan türlerinin dokularında kullanılabilir. Bunu anlamamanın en iyi yolu kendi laboratuvar koşullarınızda test etmektir.

İndirekt yöntemler direkt yöntemeye göre daha kullanışlıdır. Çünkü primer antikör birden fazla sekonder antikörle, dolayısıyla farklı işaretleme yöntemleriyle kullanılabilir. Ayrıca, sekonder antikörün primer antikora bağlanması ve sekonder antikör ile substrat etkileşimi çeşitli düzeylerde ayarlanabildiği için direkt yöntemeye göre duyarlılığı çok daha fazladır. Ancak, indirekt yöntemde sekonder antikörün dokudaki endojen immünglobulin moleküllerine bağlanması nedeniyle istenmeyen sonuçlar çıkabilir. Bunu engellemenin yolu dokunun alındığı hayvandan elde edilen immünglobulinlerde önceden doyurulmuş serum (preabsorbed antiserum) kullanmaktır. Bu sayede özgül olmayan antijenik bölgeler antiserumla kapatılmış olur.

İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Çoğunlukla parafin ya da dondurulmuş doku kesitleri üzerine monoklonal antikorlar kullanılarak uygulanır. Oldukça duyarlı bir yöntemdir. Son ürün olarak suda ve alkollerde erimeyen renkli işaret ortaya çıkar. Uygulama yaklaşık 4-5 saat sürer.

Prensibi kısaca şöyledir; önce dokudaki yapıyı tanıyacak primer antikor uygulanır, üstüne bunu tanıyacak olan ve peroksidaz enzimi taşıyan sekonder antikor konur. Bunun da üstüne sekonder antikor üzerindeki peroksidaz enziminin katalizleyeceği sübstrat-kromojen bileşiği konur, böylece renkli çökelek dolaylı yoldan dokudaki istenen bölgeyi görünür kılar. Genellikle son aşamada bir zıt boya uygulanarak çevre dokulara oryantasyon sağlanır. Aşağıda örnek bir uygulama verilmiştir. Kesitin parafin ya da dondurulmuş bloktan alınmış olması ilk basamaklardaki işlemlerin farklı olmasını gerektirir;

Parafin kesitler

- kesitler lamlara alınır
- deparafinizasyon ve rehidrasyon yapılır
- protease veya tripsin ile 30 dk 37°C'de proteoliz yapılır
- 5 dk. distile sudaki %3'lük hidrojen peroksit ile endojen peroksit aktivitesi bloke edilir

Kriyostat kesitler

- kesitler lamlara alınır
- asetonda +4°C'de 10 dk. fikse edilir ve kurutulur
- 5 dk. metanoldeki %0.6'lık hidrojen peroksit ile endojen peroksit aktivitesi bloke edilir.

Not: Hidrojen peroksit uygulaması antijenik bölgelerin bozulmasına, boyanma derecesinde azalmaya hatta kayba neden olabilir, böyle bir durum söz konusuysa hidrojen peroksit uygulamasından vaz geçilmeli ya da peroksidaz enziminin kullanılmadığı diğer boyama yöntemlerinden birisi seçilmelidir.

1. kesitler distile suyla durulanır ve 5 dk PBS tamponunda bekletilir,
2. % 20'lik normal keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özgül olmayan fon boyanmasını engellemek için),
3. serumun fazlası atılır, yıkamadan bir sonraki basamağa geçilir,
4. fare primer antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
5. PBS ile 2x5 dk. yıkanır,
6. peroksidaz ile konjuge edilmiş ve keçiden elde edilen anti-fare sekonder antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
7. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
8. 5 dk taze hazırlanmış peroksidaz sübstratı-kromojen karışımında tutulur,
9. kısaca PBS ile yıkanır,
10. zıt boya (örneğin Harris hematoksilin) ile boyanır,
11. suda mordanlama yapılır,
12. kapatma sıvısıyla lamel kapatılır.

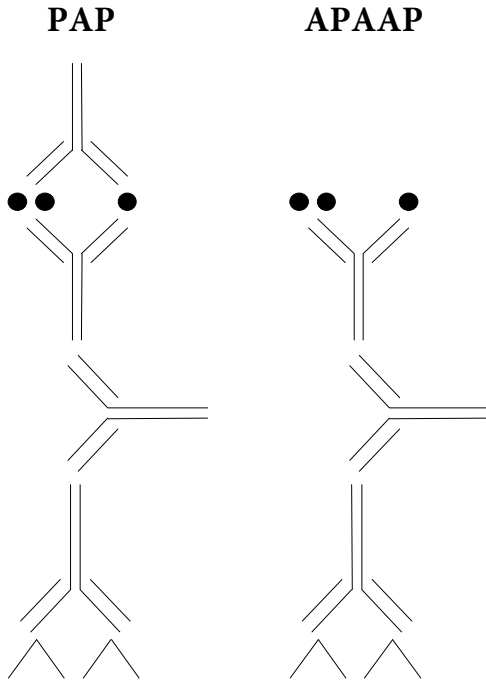
Not:

1. Eğer primer ve/veya sekonder antikorların seyreltildiği sıvılara normal keçi serumu (%5-10'lük) eklenirse 2. basamaktaki özgül olmayan fon boyanmasını engelleme girişimine gerek yoktur.

2. Kapatma sıvısı olarak genellikle 1:1 PBS/gliserol karışımı kullanılır ve lamel kapatıldıktan sonra lamelin etrafı tırnak cilasıyla yapıştırılır. Eğer daha kalıcı bir preparasyon hazırlanacaksa, 11. aşamadan sonra dereceli alkollerde ve ksilolde dehidrasyondan sonra ksilol tabanlı bir kapatma ortamıyla (örneğin Entellan®) kapatılabilir.

Enzim-Antienzim Kompleksi Yöntemleri

Bu yöntemler işaretlenmemiş antikor tekniği olarak da adlandırılır. Çünkü işaretlenmemiş sekonder antikorun üzerine önceden oluşturulmuş eriyik haldeki enzim-antienzim immün kompleksi uygulanır. Bu komplekste antijen olarak tanınan bir enzim ve buna karşı geliştirilmiş bir antikor bulunur. Eriyik bir enzim-antienzim kompleksi oluşturabilmek için bu karışıma fazlaca enzim eklenmiş ve çökelek oluşturan miktarı alınmıştır.



İşlem sırası şöyledir; primer antikor, sekonder antikor, eriyik enzim-antienzim kompleksi ve sübstrat-kromojen karışımıdır. Primer antikor ile enzim-antienzim kompleksi aynı hayvandan elde edilmiş olmalıdır ki, sekonder antikorun Fab bacaklarından birisiyle primer antikora diğeriyle de enzim-antienzim kompleksine bağlanabilsin. Bağlantı antikorunu olarak da isimlendirilen sekonder antikorun iki özelliğe sahip olması gerekir; birincisi hem primer antikora hem de enzim-antienzim kompleksine karşı geliştirilmiş olmalıdır, ikinci özelliği de uygulamada bol miktarda kullanılmasıdır. Böylece Fab bacaklarından sadece birisi primer antikora tutunmalı diğeri enzim-antienzim kompleksinin tutunabilmesi için açık kalmalıdır. Bir başka deyişle sekonder antikor öyle bir dozda uygulanmalı ki, her bir sekonder antikor bir primer antikora bağlanabilsin. Eğer miktar az kullanılırsa sekonder antikorun her iki Fab bacağı birer

primer antikora bağlanabilir.

Bu prensibe dayanan yöntemler kullandıkları enzim komplekslerinin adıyla anılır. En çok kullanılanları peroksidaz-antiperoksidaz (PAP) ve alkalın fosfataz-anti alkalın fosfataz (APAAP) yöntemleridir. PAP kompleksi 3 peroksidaz molekülü ve buna karşı geliştirilmiş iki antikor içerir. APAAP kompleksi ise iki alkalın fosfataz enzimi ve buna karşı geliştirilmiş bir antikor içerir. Enzim-antienzim yöntemleri en duyarlı boyama yöntemlerindedir. Çünkü bu yöntemlerde antijen ile antikor arasındaki doğal afinite gücünden yararlanılmaktadır. Daha önce konusu edilen enzimatik boyama yöntemlerinden daha duyarlı olmasının nedeni her antijenik bölgede 3 adet enzim molekülünün kullanılıyor olmasından kaynaklanır.

Enzim-antienzim yöntemleri parafine gömülü dokularda iyi sonuç verirler. Endojen peroksidaz aktivitesi gösteren dokularda PAP yerine APAAP yöntemi kullanılır, özellikle kan yaymalarında tercih edilirler.

PAP Boyama Yöntemi Örneği

Kullanılacak kesitin türüne (parafin veya dondurma) göre işleme başlanır. Bunun için indirekt immünoperoksidaz yöntemine bakınız. Daha sonra işlemlere aşağıdaki gibi devam edilir;

1. kesitler 5 dk. PBS tamponunda tutulur,
2. % 20'lik normal keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özümlenmeyen fon boyanmasını engellemek için),
3. serumun fazlası atılır, yıkamadan bir sonraki basamağa geçilir,
4. fare primer antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
5. PBS ile 2x5 dk. yıkanır,
6. keçiden elde edilmiş anti-fare IgG uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
7. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
8. 30 dk. fare Peroksidaz-Antiperoksidaz (PAP) kompleksiyle 37°C'de inkübe edilir,
9. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
- 10.10dk taze hazırlanmış peroksidaz süstratı-kromojen karışımında tutulur,
- 11.kısaca PBS ile yıkanır,
- 12.zıt boya (örneğin Harris hematoksilin) ile boyanır,
- 13.suda mordanlama yapılır,
- 14.kapatma sıvısıyla lamel kapatılır.

APAAP Boyama Yöntemi Örneği

Endojen peroksidaz aktivitesinin yoğun olduğu kan yaymaları ve kemik iliği preparasyonları için APAAP yöntemi tercih edilir. Kemik, böbrek, karaciğer gibi dokuların boyanmasında süstrat solüsyonu içinde 1-5 mM'lık levamizol karışımı endojen alkalik fosfataz aktivitesini engeller; o nedenle işlemlerin başında endojen enzim aktivitesini engellemeye de gerek kalmaz. Ancak levamizolün barsaktaki endojen enzim aktivitesini engellemediği rapor edilmiştir. Bu yöntemde reaksiyonun gücü aradaki bağlantı antikoru ve APAAP kompleksi uygulama aşamalarının tekrarlanmasıyla artırılabilir.

Parafin kesitler

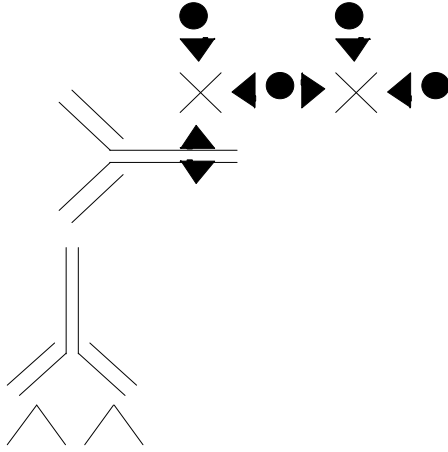
- kesitler lamlara alınır
- deparafinizasyon ve rehidrasyon yapılır
- protease veya tripsin ile 30 dk 37°C'de proteoliz yapılır

Kriyostat kesitler

- kesitler lamlara alınır
 - asetonunda +4°C'de 10 dk. fikse edilir ve kurutulur
1. kesitler 5 dk. PBS tamponunda tutulur,
 2. % 20'lik normal keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özümlenmeyen fon boyanmasını engellemek için),
 3. serumun fazlası atılır, yıkamadan bir sonraki basamağa geçilir,
 4. fare primer antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
 5. PBS ile 2x5 dk. yıkanır,
 6. keçiden elde edilmiş anti-fare IgG uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
 7. PBS ile 2x5 dk yıkanır,

8. 30 dk. fare Alkalın fosfataz-Antialkalın fosfataz (APAAP) kompleksiyle 37°C'de inkübe edilir,
9. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
- 10.6.basamak tekrarlanır,
- 11.PBS ile 2x5 dk yıkanır,
- 12.10dk taze hazırlanmış alkalın fosfataz süstratı-kromojen karışımında tutulur,
- 13.kısaca PBS ile yıkanır,
- 14.zıt boya (örneğin Harris hematoksilin) ile boyanır,
- 15.suda mordanlama yapılır,
- 16.kapatma sıvısıyla lamel kapatılır.

Avidin (Streptavidin) - Biotin Yöntemleri (ABC ve StrepABC)



Bu yöntemde yumurta beyazından elde edilen bir protein olan avidinin ya da *Streptomyces avidinii*'den elde edilen 60kD'luk streptavidinin biyotine (vitamin H) son derece güçlü bağlanması (disosiasyon sabiti $10^{-19}M$) özelliğinden yararlanılır. Öyleki, streptavidinin biyotine bağlanması bir antijenin antikora bağlanmasından 1 milyon kez daha güçlüdür. Avidinin biyotin bağlayan dört bağlanma bölgesi vardır (Şekil 2). Ancak moleküllerin yerleşimi nedeniyle gerçekte dörtten az sayıda biyotin molekülü bağlanır. Avidin ve biyotin bir enzimle işaretlenerek avidin-biyotin kompleksi halinde biraraya getirilir, ancak avidinin bir adet biyotin bağlayan bölgesi açıkta kalır. Bu bölge sekonder antikor üzerindeki biyotin (biyotinlenmiş sekonder antikor) ile bağlanır. Avidin-biyotin

kompleksine bağlı olan enzimin süstratı ve kromojeni uygulandığında söz konusu doku antijeni görünür hale gelmiş olur. Enzim olarak genellikle peroksidaz kullanılır. Fazla miktarda sekonder antikor uygulamaya gerek yoktur, çünkü bu yöntemde sekonder antikorun sadece bir Fab ucu kullanılmaktadır. Avidinin biyotine bağlanma gücünün çok yüksek olması nedeniyle bu yöntem diğer indirekt yöntemlere göre daha duyarlıdır¹. Bu yöntem fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokuların işaretlenmesinde çok kullanılır. Karaciğer ve böbrek gibi endojen biyotin aktivitesi olan dokularda işlem öncesinde endojen biyotin blokajı gerekir. Bunun için dışarıdan avidin uygulanır.

İşlem sırası şöyledir; primer antikor, biyotinlenmiş sekonder antikor, peroksidaz işaretli avidin-biyotin kompleksi, süstrat-kromojen solüsyonu ve zıt boyama olmak üzere. Enzim işaretli avidin-biyotin kompleksi her uygulamada aynıdır, her hangi bir hayvana karşı geliştirilmemiştir.

ABC veya StrepABC Boyama Yöntemi Örneği

Kullanılacak kesitin türüne (parafin veya dondurma) göre işleme başlanır. Bunun için indirekt immünoperoxidaz yöntemine bakınız. Daha sonra işlemlere aşağıdaki gibi devam edilir;

¹ Hsu SM, Raine L, Fanger H (1988) Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580.

1. kesitler 5 dk. PBS tamponunda tutulur,
2. % 20'lik normal keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özgül olmayan fon boyanmasını engellemek için),
3. serumun fazlası atılır, yıkamadan bir sonraki basamağa geçilir,
4. fare primer antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
5. PBS ile 2x5 dk. yıkanır,
6. keçiden elde edilmiş ve biyotinlenmiş anti-fare sekonder antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
7. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
8. Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin veya streptavidin-biyotin kompleksi 30dk. uygulanır. Bu solüsyonun en az 30dk önceden hazırlanmış olması gerekir.
9. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
- 10.10 dk. taze hazırlanmış peroksidaz süstratı-kromojen karışımında tutulur,
- 11.kısaca PBS ile yıkanır,
- 12.zıt boya (örneğin Harris hematoksilin) ile boyanır,
- 13.suda mordanlama yapılır,
- 14.kapatma sıvısıyla lamel kapatılır.

6. Flüoresan İşaretler, İmmünflüoresan Boyama Yöntemleri

İmmünoflüoresan işaretleme son derece duyarlı görüntüleme yöntemlerinden birisidir. Mikroskoplara yerleştirilen keskin bariyer filtrelerin ve epiflüoresan aydınlanma tekniğinin gelişmesiyle birlikte daha güvenilir ve kolay bir yöntem olarak kabul görmüştür. Genellikle indirekt boyama prensibi kullanılır. Bu teknikte ilk kullanılan primer antikor işaretsizdir ve incelenecek antijene uygun olarak seçilir. İkinci antikor ise birinci antikorun üretildiği hayvanın immünooglobulinlerine karşı elde edilmiş bir flüorokrom molekülüyle konjuge edilmiş immünooglobulin molekülüdür. Böylece antijenin doku veya hücredeki dağılımı özel bir donanım gerektiren flüoresan mikroskop altında incelenir.

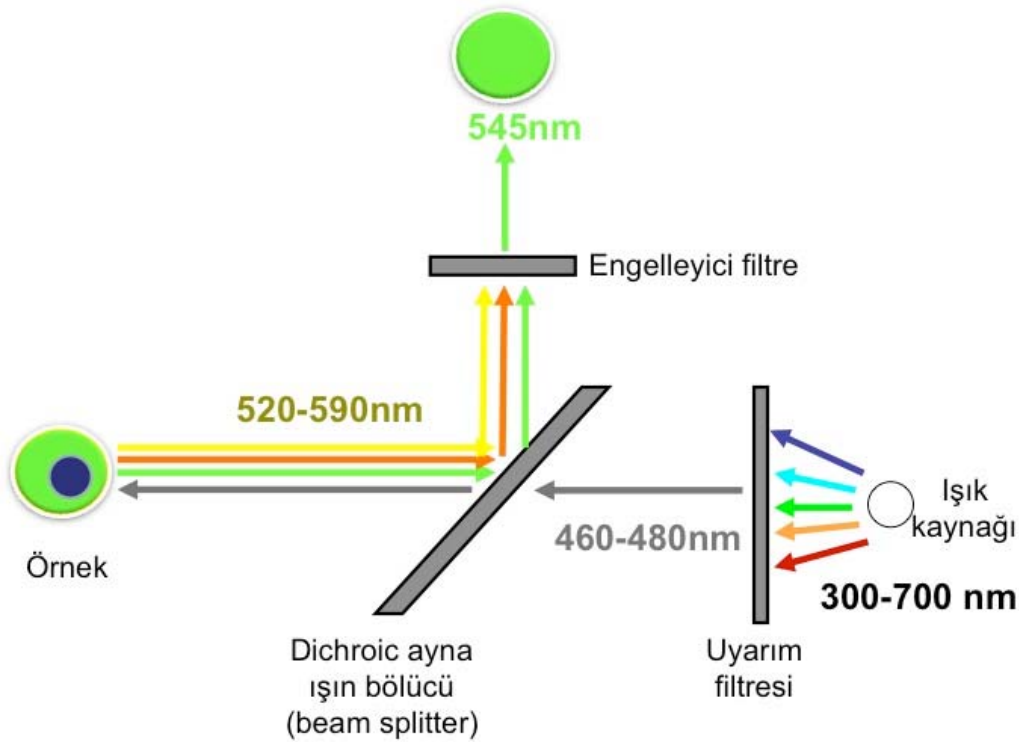
İmmünoflüoresans, hücre yapısı ve organellerin çalışılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. 1974 yılında Lazarides ve Weber¹ ilk kez hücre içindeki aktin filamanlarına karşı antikor geliştirip bunu immünoflüoresan yöntemle tanıtmıştır. Hücre iskeletini oluşturan elemanlar olan mikrofilamanlar, ara filamanlar ve mikrotübülüsler günümüzde yaygın olarak immünoflüoresan yöntemlerle görüntülenmektedir. Buna ek olarak hücre yüzeyindeki veya içindeki diğer protein molekülleri - örneğin; plazma ve çekirdek zarındakiler, Golgi kompleksi ve endoplazma retikulumu üzerindikiler, mitokondriyonlar, veziküller, çekirdek ve hatta çekirdekçik içindikiler - görüntülenebilir. İmmünoflüoresan işaretleme yöntemi İSK dışında bir proteinin biyokimyasal yapısına ilişkin çalışmalarda da kullanılmaktadır. Hücrelere özgü molekülleri işaretleme hedefleyen bir immünoflüoresan boyama işlemi, karışık hücrelerden oluşan bir kültürde hücreleri birbirinden ayırt etmede çok yardımcı olur.

Flüoresan görüntülemenin diğer yöntemlere göre en üstün tarafı, sadece flüorokroma bağlı olan molekülün görünür kılınması, diğer yapıların karanlıkta kalmasıdır. Böylece çok yüksek bir "signal to noise" oranı elde edilir. Yani görüntünün kontrastı ve çözünürlüğü çok yüksektir. Öyle ki, çalışmalar immünoflüoresan yöntemlerle gösterilebilen hücresel bir oluşumun yapısal özelliklerinin elektron mikroskobu düzeyinde de benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

¹ Lazarides E, Weber K (1974) Actin antibody: The specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 2268-2272.

Flüoresan Mikroskobunda Görüntü Oluşturma Prensibi

Flüoresan mikroskobu, doğal veya yapay flüoresan özellikteki maddelerin kuvvetli bir ışın ile uyarılıp ışınmasını sağlayan ve dar bir dalga boyuna sahip görüntü oluşturan mikroskoplardır. Işık kaynağı olarak civa buharlı, ksenon veya tungsten-halojen lambalar kullanılır. Çoğunlukla üstten aydınlatma (epiflüoresan) yöntemiyle uyarma (eksitasyon) ve ışınma (emisyon) sağlanır. *Eksitasyon filtresi*'nden geçen ışın *kromatik ışık ayırıcı*'ya çarparak flüorokrom üzerine düşürülür. Flüorokroma çarpan ışık buradan geri yansır (incident light) ve kromatik ışık ayırıcıya tekrar gelir. Belli dalga boyundaki ışınlar bunu geçip yukarıdaki *bariyer filtre*'ye gelir. Burada sadece tek bir dalga boyundaki ışınlar geçirilir gerisi bloke edilir. Böylece sadece flüorokromdan gelen ışınlar izlenir (Şekil 3).



Şekil 3. Flüoresan mikroskobunda uyarma ve ışınma prensibi. Yatay ışık saçan civa buharlı lambadan çıkan ışın demeti eksitasyon filtresinden geçerek mavi ışın olarak kromatik ışık kırıcıya gelir. Buradan aşağı yansıtılan mavi ışın preparattaki flüorokroma çarpınca farklı dalga boyuna sahip bir ışın demeti olarak geri döner. Bunlardan bazıları kromatik ışık kırıcıdan yukarı geçer, ancak sadece bir tanesi (yeşil olan) bariyer filtreyi geçer ve göze yeşil flüoresans olarak gelir.

Flüoresan İşaretler (Flüorokromlar)

Piyasada gerek direkt gerekse indirekt boyama yöntemlerinde kullanılmak üzere 100'ün üzerinde flüoresans özellik gösteren yapay boyalar mevcuttur. Bunlar ticari olarak satın alınıp laboratuvar koşullarında istenen antikorla konjuge edilebileceği gibi hazır olarak bulunan flüorokrom konjuge edilmiş antikorlar da satın alınabilir. Günümüzde ikinci yöntem daha çok kullanılır. Yani çok bilinen bazı flüorokromlar ile konjuge edilmiş antikorlar indirekt immünoflüoresan boyama yöntemlerinde tercih edilir. Flüorokromların seçiminde üç temel faktör rol oynar;

- mikroskopta mevcut olan filtre grubu
- çoklu boyamalarda istenen renk ayırımı. Örneğin rodamin ile Texas kırmızısını birbirinden ayırt etmek fluorescein ile TRITC'yi birbirinden ayırt etmekten daha kolaydır.
- duyarlılık. Örneğin Cy3 ve Cy5 diğer flüorokromlara göre daha parlaktır.

Flüorokromları birbirinden ayırt etmekte kullanılan en önemli parametre eksitasyon ve emisyon dalga boylarıdır. Tablo 6'te en sık kullanılan flüorokromların eksitasyon ve emisyon dalga boyları verilmiştir. Mevcut mikroskoptaki filtre grubuna göre uygun olanı seçilir. En sık kullanılanları AMCA, Hoechst, FITC, Fluorescein, Texas Red, Rhodamine, TRITC, Cy3 ve Cy5'tir (Tablo 6). Yabancı dildeki yayınları da anlama kolaylığı olabilmesi için flüorokromların isimlendirilmesi ve tanımında sıklıkla orijinal kimyasal adları kullanılacaktır.

AMCA (Aminomethylcoumarine Acetate). Genellikle ultraviyole (UV) filtre grubuyla izlenebilir. Emisyon dalga boyu insan gözü tarafından sınırda algılanan mavi bir tondur, o nedenle doku/hücrede çok yaygın olarak bulunan proteinlerin işaretlenmesine seçilir. Özel olarak üretilen maviye duyarlı filmler ile daha iyi görüntülenebilir. Çabuk solar, o nedenle diğer birçok boya gibi solmayı önleyici bir ajana (örneğin n-propyl gallate) gerek duyulur. Flow cytometry ve hücre çekirdeği görüntülemelerinde çok kullanılır. Genellikle çoklu boyamalarda kullanılır, tek başına pek tercih edilmez.

Hoechst: Bisbenzimid türevi DNA boyalarıdır. UV filtre grubuyla izlenirler ve çoğunlukla çoklu boyamalarda kullanılırlar. Supravital olarak DNA sarmalının ince oluşundaki tekrarlayan A-T baz çiftlerine bağlanır. Hücre zarı geçirgenlikleri çok iyidir. Toksik değildir, o nedenle canlı hücre çalışmalarında kullanılırlar. Suda çözünürler. Hücre çekirdeğini ve dolayısıyla hücre siklusunu ilgilendiren her türlü çalışmada kullanılırlar.

FITC (Fluorescein Isothiocyanate) ve **Fluorescein** (Dichlorotriazinnylamino Fluorescein). En uzun süredir kullanılan ve yeşil fluoresan ışımaya olarak algılanan flüorokromlardır. Kuantum etkinlikleri çok iyidir. Birbirine üstünlüğü yok denecek kadar azdır. Fluorescein'in biraz daha fotostabilitesi zayıftır. Flow cytometry'de FITC ile phycoerythrin konjugatları kullanmak avantajlıdır, çünkü her ikisi de tek bir dalga boyu ile (488nm) uyarılabilir.

Texas Red (Texas Red Sulfonyl Chloride), **Rhodamine** (Lissamine Rhodamine Sulfonyl Chloride) ve **TRITC** (Trimethyl Rhodamine Isothiocyanate). Her üçü de rodamin derivativesidir. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları arasında yaklaşık 20'şer nanometre fark vardır, o nedenle birbirinden ayırt edilmeleri pratik olarak çok zordur. Çift işaretlemelerde FITC ile TRITC kullanımını daha yaygın olsa da Rhodamine kullanımını daha ayırt edici sonuç verir.

Cy3 (Indocarbocyanine) ve **Cy5** (Indidocarbocyanine). Bu yeni kuşak flüorokromlar diğerlerine göre daha parlak, daha yüksek fotostabiliteye sahip ve daha az fon boyanması yapmaları nedeniyle son yıllarda çok tercih edilmeye başlamıştır. Cy3'ün yaygın bir emisyon grafiği vardır, o nedenle dar bantlı filtre grubuna gerek duyar, yoksa FITC ile bile çakışabilir. Kripton/Argon lazer kaynağı kullanan konfokal mikroskoplarda Cy5 ile kombine olarak kullanılır. Cy5 diğer ışın kaynaklarıyla da yeterli miktarda eksite edilebilse de emisyon dalga boyu doğrudan insan gözü tarafından görülemediği için (650nm) kızıl ötesi CCD kameraya gerek duyar.

Tablo 6. Sık kullanılan flüorokromlar ve uyarılma (eksitasyon) ve ışınım (emisyon) dalga boyları.

Flüorokrom	Eksitasyon (nm)	Emisyon (nm)
Acridine Orange	500	530
AMCA	345	425
Bodipy	505	512
Cascade Blue	375/398	424
Cyanine Cy3	575	605
Cyanine Cy5	640	705
DAPI	345	425
Di IC ₃	540	556
DI OC	550	580
Ethidium Bromide	520	610
Fluo 3	480	520
Fluorescein	492	520
FITC	490	525
FURA-2	340/380	500/530
Hoechst 33258	365	480
Hoechst 33342	355	465
Lucifer Yellow	428	540
Nile Red	485	525
Propidium Iodide	520	610
R-phycoerythrine	480-550	570
Rhodamine	540-560	580
Rhodamine 123	540-560	580
Texas Red	590	615
TRITC	540	580

İmmünoflüoresan Boyama Yöntemleri

İmmünoflüoresan boyamada amaçlar iyi belirlenmelidir. Bu tekniğin avantajları ve dezavantajları göz önüne alınarak uygun doku hazırlama, kesme ve takip işlemleri yapılır. Genellikle dondurulmuş doku kesitleri, yaymalar veya kültürler için kullanılır. Parafin kesitler için tercih edilmez. Preparasyonun çeşidine göre kısa, orta ve uzun boyama süreleri uygulanır.

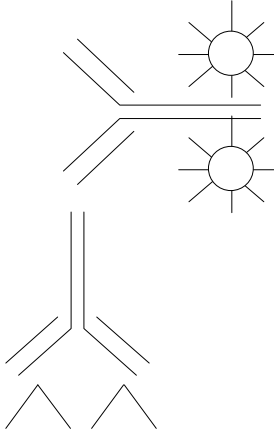
Direkt Yöntem

En kolay ve en eski yöntemdir. Doku ya da hücredeki bir antijen flüorokromla konjuge edilmiş antikorla işaretlenir. Direkt immünoperoksidaz yöntemlerde olduğu gibi tek sıra antikor kullanmanın bazı kullanım zorlukları vardır. Ayrıca antikor ile flüorokromun konjugasyonu yorucu ve güvenilirliği az bir iştir. Bu nedenlerle günümüzde daha çok indirekt yöntemler kullanılır.

İndirekt Yöntem

Bu yöntemde dokudaki antijene özgü ilk sıra primer antikorun üzerine bunu tanıyan ve flüorokromla konjuge edilmiş sekonder antikor uygulanır.

Temel boyama prensipleri immünoenzimatik boyamalarda uygulananların aynısıdır. Ancak flüoresan işaretlerin ışığa duyarlı olması nedeniyle flüorokrom işaretli sekonder antikor



inkübasyonu ve sonrasındaki işlemler karanlık ortamda yapılmalıdır. Yanı sıra, flüoresan ışımaya özelliği belli bir süre korunabildiği ve hızla solma söz konusu olduğu için kapatma sıvılarına solmayı engelleyici ajanlar eklenir ve preparatlar buzdolabı veya derin dondurucuda süreli olarak saklanır. Mikroskopta gözlem ve fotograflama belli bir deneyim gerektirir. Aşağıda örnek bir boyama işlemi verilmiştir.

Kriyostat Kesitler

- kesitler lamlara alınır
- asetonda +4°C'de 10 dk. fikse edilir, kurutulur, PBS tamponunda yıkanır ve immün boyamayla devam edilir.

Monolayer Hücre Kültürleri

- hücreler PBS tamponu ile kısaca yıkanır,
 - incelenecek yapıya uygun bir fiksatif ile fikse edilir (örneğin %4'lük paraformaldehit ile 30dk.)
 - PBS tamponla yıkanır ve immün boyamayla devam edilir.
1. % 5'lik normal keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özellik olmayan fon boyanmasını engellemek için),
 2. serumun fazlası atılır, yıkamadan bir sonraki basamağa geçilir,
 3. fare primer antikoruna uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
 4. PBS ile 2x5 dk. yıkanır,
 5. keçiden elde edilmiş ve flüorokrom ile konjuge anti-fare antikoruna uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
 6. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
 7. kapatma sıvısıyla lamel kapatılır.

Çoklu İmmünoflüoresan Boyama

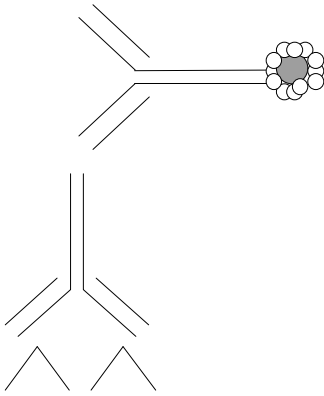
Yukarıda da değinildiği gibi çoklu boyamalarda kullanılacak filtre grubunun ışın seçiciliği önem kazanır. Hangi flüorokromların hangi primer antikorlarla kullanılacağı böylece belirlenir. Temel prensip, önce küçük moleküllerin sonra daha büyüklerinin işaretlenmesidir. İlk işaretlenecek molekül için primer ve flüorokrom ile konjuge sekonder antikor uygulanır, daha sonra ikinci molekül için aynı işlemler tekrarlanır. Önemli olan nokta ilk ve ikinci molekül için kullanılacak primer antikorların aynı hayvanda üretilmemiş olmasıdır. Aksi halde sekonder antikorlar rahatlıkla çapraz reaksiyona girip karşılıklı primer antikorlara yapışabilir. Aşağıda bir çoklu boyama örneği verilmiştir.

1. % 5'lik normal keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özellik olmayan fon boyanmasını engellemek için),
2. serumun fazlası atılır, yıkamadan bir sonraki basamağa geçilir,
3. birinci moleküle ait fare primer antikoruna uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
4. PBS ile 2x5 dk. yıkanır,
5. keçiden elde edilmiş ve flüorokrom ile konjuge anti-fare antikoruna uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
6. PBS ile 2x5 dk yıkanır,

7. ikinci moleküle ait tavşan primer antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
8. PBS ile 2x5 dk. yıkanır,
9. keçiden elde edilmiş ve flüorokrom ile konjuge anti-tavşan antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
10. PBS ile 2x5 dk yıkanır,
11. kapatma sıvısıyla lamel kapatılır.

7. Altın-Gümüş İşaretleme Yöntemleri

Altın partikülleri içeren koloidal altın işaretleri önceleri sadece elektron mikroskopik incelemelere özgü iken¹ son yıllarda ışık mikroskopik düzeyde de gerek direkt gerekse indirekt yöntemlerde kullanılmaktadır. Işık mikroskopik düzeyde kullanım gümüş ile güçlendirme yöntemlerinin avantajlarının ortaya çıkmasından sonra yaygınlaşmıştır² (immnogold silver staining=IGSS).



Bu yöntemde, altın partikülleri, üzerine soğan zarı gibi yerleşen metalik gümüş tabakalarıyla güçlendirilir (Şekil 4). Koloidal altın solüsyonları içindeki altın partikülleri hedef dokuda birikince ışık mikroskopunda pembe-kırmızı renk olarak ortaya çıkar. Altın tek başına kullanılırsa partiküllerin çapının 20 nm olması gerekir, oysa gümüşle güçlendirme söz konusu olduğunda 5nm çapındaki altın partikülleri yeterli olur. Ayrıca, pek yaygın olmamakla birlikte verdiği sarı renkten dolayı gümüş de tek başına kullanılabilir. Doğal ışık toleransının gelişebilmesi için metalik gümüş yavaş hızla oluşur. Bu nedenle uygulama sırasında iyon kaynağı olarak gümüş laktat ve indirgenme ajanı olarak pH 3.5'lük koruyucu gum arabic kolloidi içinde hidrokinoon kullanılır. Kesitleri hidrasyondan sonra

Lugol iyodin ve sodyum tiyosülfat ile muamele etmek boyanma gücünü artırır. Yöntemin PAP yönteminden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu konuda daha ayrıntılı bilgi için De Mey ve ark. (1986)³ın derlemesine başvurulabilir.

¹ Faulk W, Taylor G (1971) An immunogold method for the EM. *Immunocytochemistry* 8:1081-1083.

² Holgate C, Jackson P, Cowen B, Bird C (1983) Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J Histochem Cytochem* 31: 938-944.

³ De Mey J, Hacker GW, Dewaele M, Springall DR (1986) Gold probes in light microscope.

“*Immunocytochemistry. Modern Methods and Applications*” 2nd Ed Polak JM, Van Noorden S.(eds), Bristol, pp:71-89.

Aşağıda gümüşle güçlendirilmiş altın işaretleme tekniğine ilişkin bir örnek verilmiştir.

Parafin Kesitler

- kesitler lamlara alınır,
- deparafinizasyon ve rehidrasyon yapılır,

Kriyostat Kesitler

- kesitler lamlara alınır,
 - asetonda oda ısısında 10 dk. fikse edilir ve kurutulur,
1. distile suyla ıslatılır,
 2. Lugol iyodin solüsyonunda 5 dk. tutulur,
 3. distile suyla yıkanır,
 4. %2.5'lük sodyum tiyosülfat solüsyonunda (distile sudaki) kısaca tutulur,
 5. %1'lik Triton X-100 (PBS içinde)'de durulur,
 6. %20'lik keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özgül olmayan fon boyanmasını engellemek için),
 7. serumun fazlası atılır, yıkamadan bir sonraki basamağa geçilir,
 8. fare primer antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
 9. Triton X-100 içeren PBS ile 10 dk. yıkanır,
 10. %20'lik keçi serumu içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 30 dk. inkübasyon yapılır (özgül olmayan fon boyanmasını engellemek için),
 11. altın ile konjuge keçi anti-fare sekonder antikoru uygulanır (süre, dilüsyon ve ısı uygulanan antikora göre seçilir),
 12. distile suda 10 dk. yıkanır,
 13. kesitler %2'lik glutaraldehit ile (PBS içinde) 10 dk. post fikse edilir (bu aşama opsiyoneldir),
 14. gümüş içeren güçlendirme solüsyonu* ile 20-40 dk. inkübasyon yapılır. Bu aşamada solüsyon ve kesitler ışıktan korunmalıdır,
 15. distile suda 10 dk. yıkanır,
 16. %2'lik kloroform ile ekstrakte edilen metil yeşiliyle zıt boya yapılır,
 17. dehidrate edilir ve lamel kapatılır. Kapatma sıvısı olarak organik olanlar (Kanada Balsamı vs.) tercih edilir.

Not:

6-11 arasındaki basamaklarda kullanılan ajanlara %0.1 oranında bovine serum albumin ilave edilir.

*Gümüş ile güçlendirme solüsyonu

1M sitrat tamponu* pH 3.5	20 ml
%30'lük gum arabic (distile suda)	33 ml
distile su	17 ml
gümüş laktat (15 ml distile suda)	0.11 g
hidrokinon (15 ml distile suda)	0.85 g

*1M Sitrat Tamponu

sitrik asit pH 3.5	12.75 g
trisodyum sitrat.2H ₂ O	11.75 g
distile su	100 ml

Not: İşlemler sırasında gümüş klorür (AgCl) çökeleği oluşturmamak için formüllerde klorid iyonlarından arınmış çift distile veya deiyonize su kullanılmalıdır.

8. Kontroller, Fon Boyanması

Kontroller

Kullanılan ajanlar ve yapılan işlemler, tekniğin güvenilirliği açısından kontrol edilmelidir. Bu yapılmazsa boyanmanın değerlendirilmesi öznel olmaktan çıkamadığı gibi bilimsel açıdan da kuşkulu sonuçlara neden olur.

ISK'da kullanılan maddelerin kontrolleri hem üretici firmalar hem de kullanıcı tarafından yapılmalıdır. Amaç primer ve sekonder antikorların hedef antijenlere özgü olup olmadıklarını, optimum dilüsyon, inkübasyon zamanı ve ısısını bulmaktır. Ayrıca işlem sırasının kontrolü, günden güne veya kullanıcıdan kullanıcıya ortaya çıkan farkların da minimuma indirilebilmesi açısından önemlidir. Kontrollerde iki tür yaklaşıma başvurulur. Ya söz konusu antikorun yerine başka bir ajanla test yapılır (*ajan değiştirme testi*) ya da söz konusu primer antikor başka dokularda sınırlar (*doku değiştirme testi*).

Ajan Değiştirme Testleri

Primer antikor yerine aynı hayvan türünden elde edilmiş antikorun özgül antijeniyle birleştirildikten sonra uygulaması (*afinity-absorbed antibody*), farklı bir primer antikor, preimmün serum veya nonimmün serum kullanılabilir. Seyreltme sıvısının değiştirilmesi veya hiç kullanılmaması önerilmez. Primer antikorun saf olarak izole edilmiş antijeniyle absorbe özgül olanla olmayanı birbirinden ayıran ideal bir kontrol yöntemidir. Ancak rutin histoloji laboratuvarlarında saf antijenin kolay bulunmaması nedeniyle uygulaması pratik değildir. Bunun yerine pratikte aynı tür hayvanın nonimmün serumunu veya uzak bir hayvan türünün antiserumu daha çok kullanılır. Eğer primer antikor bir monoklonal ise başka bir monoklonal kullanarak kontrol yapmak en kolay negatif ajan değiştirme yollarından birisidir. Ancak kontrol olarak kullanılacak antikorun içindeki protein miktarının ve yaşının test edilen primer antikorunkine yakın olması gerekir. Her iki antikorun seyreltiği tamponlar da aynı olmalıdır.

Doku Değiştirme Testleri

Doku değiştirme testleri, negatif, pozitif ve internal olmak üzere üç tipte yapılır. Çoğu zaman bunlardan biri veya ikisi yeterli olur.

NEGATİF DOKU KONTROLÜ

Söz konusu primer antikorun tanınması olası olmayan antijenlerin bulunduğu bir doku seçilir. Örneğin anti-HCG antikorunun negatif doku kontrolü için HCG hormonu pozitif olan bir over dokusu yerine bununla ilgisi olmayan bir dokunun (akciğer, kıkırdak vs.) kullanılmasıdır. Bu dokularda boyanmanın olmaması bir oranda anti-HCG antikorunun özgüllüğünü doğrular.

POZİTİF DOKU KONTROLÜ

Söz konusu primer antikorun tanıyabileceği antijene sahip bir başka dokunun kullanılmasıdır. Örneğin anti-laminin antikoruna pozitif reaksiyon veren barsak epitel bazal membranı yerine alveol hücresi bazal membranı kullanılabilir. Bu dokuda boyanmanın bazal membranda pozitif olması anti-laminin antikorunun özgüllüğünü doğrulamış olur.

İTERNAL DOKU KONTROLÜ

Söz konusu primer antikorun tanıyabileceği antijenik bölgelerin aynı doku kesitinde komşu bölgelerde de var olması söz konusu olduğunda kullanılabilir. Örneğin anti-S100 proteini antikorunu melanoma hücrelerinde pozitif olmakla birlikte çevredeki normal melanositlerde ve periferik nöronlarda da bulunur.

Fon Boyanması

Fon boyanması, İSK'da belki de en çok karşılaşılan durumlardan birisidir. Aşağıda fon boyanmasının nedenlerinden belli başlı olanları irdelenmiştir.

Hidrofobik Bağlanmalar

Protein moleküllerindeki doğal veya sonradan (fiksasyon vs. gibi etkenlerle) ortaya çıkan hidrofobik özellikten kaynaklanır. Özellikle bağ dokusu, epitel dokusu ve adipoz doku hidrofobisite açısından yüksek dokulardır ve bu nedenle bu dokuların boyamalarında özgül olmayan fon boyanmaları çok görülür. En önemli serum proteinlerinden biri olan immünoglobulinler de hidrofobik özelliktedirler. IgG sınıfı antikorların depolanması sırasında çökelek meydana gelir ve bu antikorun hidrofobisitesini daha da artırır. Antikorları seyreltmede kullanılan tampon solüsyonlar içindeki iyonik kuvvetler de hidrofobisiteyi etkiler. Düşük iyonik güçlerin olduğu bir tampon solüsyonu daha az kuvvetli hidrofobik güç yaratır. PO₄, SO₄, Cl, NO₃, SCN gibi anyonlar; NH₄, K, Na, Ca gibi katyonlar hidrofobisiteyi yok edecek şekilde formülize edilerek tamponların içinde yer alırlar. Bir diğer etkili işlem seyreltme sıvısına deterjan katmak veya pH'yı artırmaktır.

Hidrofobisiteye ilişkin fon boyanmasını azaltmanın en yaygın yolu "bloke dicit protein solüsyonları" kullanmaktır. Bu solüsyonlar ayrı bir basamak olarak uygulanabileceği gibi primer ve sekonder antikorları seyreltme sıvısı olarak da kullanılabilir.

İyonik (Elektrostatik) Bağlanmalar

Karşı elektrik yüklü proteinler karşılaştıklarında iyonik etkileşim meydana gelir. IgG tipi antikorların izoelektrik noktaları 5.8 ile 7.3 arasında olduğu için pH'sı 7.0-7.8'deki tamponlarda negatif yüke sahiptirler. Eğer doku antijeni pozitif yükle yüklüyse antijenle antikorlar arasında iyonik bir etkileşim ortaya çıkar. Genelde, iyonik etkileşimler, seyreltme tamponlarının iyonik gücünü artırmakla azaltılabilir. Örneğin 0.1-0.5 M NaCl ilavesi yapılır.

Genellikle birçok fon boyanması hidrofobik ve iyonik etkileşimlerin ikisinin birden rol oynadığı mekanizmalarla oluşur. Buna örnek, IgG moleküllerinin nonspesifik olarak elastin ve kollajene bağlanması ya da biyotinlenmiş antikorların plastik ve cam yüzeylere yapışmalarıdır.

Serumdaki Doğal Antikorlar

Hayvanda daha önce doğal olarak çevresel uyaranlarla meydana gelmiş olan antikorlar immünizasyon sırasında artabilir ve özgül olmayan fon boyanmasına neden olabilir. Özellikle tavşan ve keçilerde bu durum yaygındır. Doğal antikorları serumdan uzaklaştırmak için yapılan çalışmalar pek başarılı olamamıştır.

Diğer Nedenler

Dokuda yaygın nonspesifik boyanma nedenleri arasında, dokunun işlemler sırasında fiziksel olarak örselenmesi, fiksasyon öncesinde kuruma, fiksatifin dokuya tam penetre olmamış olması sayılabilir. Dokudaki nekrotik bölgeler de otoliz nedeniyle tüm ajanlara nonspesifik olarak bağlanırlar. Bu ve benzeri sorunların genel özeti için Nadji ve Morales¹'in yazısına başvurulabilir.

Endojen Enzim Aktiviteleri

İSK'da bazı hücrelerden kaynaklanan endojen enzim aktivitelerini bloke etmek ve böylece yapay olarak oluşturulan enzim aktivitesinden ayırt etmek gerekir. Peroksidaz enzimi aktivitesi H₂O₂'nin parçalanması sonucu hemoglobin (eritrositlerde), myoglobin (kas hücrelerinde), sitokrom (granülositlerde ve monositlerde) ve katalazlardan (karaciğer ve böbrek) kaynaklanır. Hatta hemoglobin dokuda interstisyumda da aktiviteye neden olur. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermenin en yaygın şekli kesitleri %3'lük H₂O₂'de 5-10 dk. inkübe etmektir.

Bir vitamin ve koenzim olan biyotin de endojen olarak özellikle karaciğer ve böbrekte enzimlere ve diğer proteinlere bağlı olarak bulunur. Biyotin, avidin ve streptavidine kuvvetle bağlanır. O nedenle, ABC, StrepABC yöntemlerinde endojen biyotin aktivitesini maskelemek gerekebilir. Özellikle kriyostat kesitlerde buna rastlanır. Endojen biyotin, dışarıdan verilen avidin ile bloklanabilir. Kesitlerin 20'şer dakikalık %0.1'lik avidin ve arkasından % 0.01'lik biyotinle inkübasyonları problemin çözümünde yeterli olur.

¹ Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase Techniques: A Practical Approach to Tumor Diagnosis. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1986.

9. Problemler ve Çözümleri

Bu bölümde sık karşılaşılan problemler, olası nedenleri ve çözüm önerileri tablo halinde verilmiştir.

Problem	Olası Nedenler	Çözümler
Hiç boyanmama	<ul style="list-style-type: none"> • ajanlar uygun sırada kullanılmamıştır • tampon ve seyreltmelerde sodyum azid kullanılmıştır • sübstrat solüsyonunda uygun olmayan H₂O₂ konsantrasyonu kullanılmıştır • kötü/yetersiz fiksasyon ve takip işlemleri yapılmıştır • boyanma sırasında kesitte kuruma olmuştur 	<ul style="list-style-type: none"> • boyama işlemi gözden geçirilir • tampon ve seyreltme sıvılarından sodyum azid çıkarılır • H₂O₂ konsantrasyonu %0.06'yı (10ml sübstrat solüsyonunda 200µl %3'lük H₂O₂) geçmemelidir • doku blokları yenilenmelidir • kurumama için nemli kapalı kaplar kullanılmalıdır
Zayıf boyanma	<ul style="list-style-type: none"> • yıkama sıvıları yeterince drene edilmemiştir • antikor solüsyonlarının seyreltme oranları yüksektir, yetersiz inkübasyon yapılmıştır • eski sübstrat solüsyonu kullanılmıştır • konjuge antikorlar ve enzim kompleksleri eskidir 	<ul style="list-style-type: none"> • yıkama sonrası sıvısını fazlası iyice drene edilmelidir • seyreltme oranları düşürülür, inkübasyon süreleri uzatılır • sübstrat-kromojen solüsyonları taze hazırlanmalıdır • kullanma ve saklamada üretici firmaların uyarılarına dikkat edilmelidir
Kuvvetli fon boyanması	<ul style="list-style-type: none"> • endojen enzim aktivitesi yeterince giderilmemiştir • antikorların özgül olmayan bağlanması söz konusudur • uygun olmayan antikor seyreltme oranları • tam serum antikorlarının kullanımı • kötü/yetersiz fiksasyon • parafin yeterince uzaklaştırılmamıştır • lamlara fazlaca doku tutucu (poli-L-lizin, albumin) sürülmüştür • yetersiz yıkamalar yapılmıştır • kalın kesit alınmıştır 	<ul style="list-style-type: none"> • notlardaki ilgili bölümlere bakınız • antikor kontrolleri yapılır, normal keçi serumu kons. yükseltilebilir, %5 BSA eklenebilir, Tris tamponu kullanılabilir • daha yüksek seyreltme oranları denenir • olabildiğince tam serum kullanmaktan kaçınılır • oranı düşürülmelidir ya da vaz geçilmelidir • yıkamalar en az 2x5 dk olmalıdır • optimum kalınlık 4-6 µm.

10. İmmünohistokimyasal Terimler

Affinite - bağlanmanın gücünü ve kararlılığını belirten bir terimdir. Antijenik determinant ile tek bir antijen bağlayan bölge arasındaki denge durumunda olan bağlanma sabitidir. Antikor molekülündeki antijen bağlayan bölge sayısından bağımsızdır.

Antikor - Antijenle uyarılmış bir B lenfosit tarafından üretilen ve bu antijene bağlanma özelliğine sahip olan glikoprotein molekülü.

Antikor bağlayan bölge - Antikor molekülü yapısında olan ve uygun antijenik determinant bölgeye bağlanan bölge. Her antikor bağlayan bölge antikor molekülünde bir hafif ve bir ağır zincirden meydana gelir.

Antijen - Lenfositlerin yüzeyindeki reseptörlerle ve bu hücrelerin ürünü olan antikorlarla reaksiyona giren maddelerdir. Bir maddenin immün yanıt oluşturabilme özelliğine *immünojenite* denir.

Antijenik determinant (Epitop) - Antijenin yüzeyinde bulunan ve antikordaki antijen bağlayıcı bölge ya da lenfosit yüzey reseptörleriyle birleşen bölümdür. Çoğu antijenin yüzeyinde antikor yapımını uyaran farklı yapıda antijenik determinantları vardır.

Antiserum - Antikor molekülleri içeren serum (genellikle immünize edilmiş hayvanlardan elde edilir).

Asit - Periton boşluğunda yerleşmiş ve antikor yapımı gerçekleştiren hibridoma hücrelerinin tümörünün salgıladığı serumdur.

Avidite - Multivalan bir antijenin antikor molekülleriyle yaptığı toplam bağlanma gücüdür.

Bloklama ajanı - İmmünolojik olmayan reaksiyonları durduran / engelleyen ajan.

Kontrol - İmmünohistokimyasal boyama deneyinin geçerliliğini test etmede kullanılan testler.

Çapraz reaksiyon - Bir antikorun ilk immün yanıt oluşturma işleminde yer almayan bir antijenle ilişkiye girmesi. Özgül antijen-antikor reaksiyonundab daha zayıftır.

Epitop (antijenik determinant) - Karmaşık antijen molekülü üzerinde antikor tarafından tanınan bölge(ler).

Fab - Antikor molekülü üzerinde antijene (antijenik determinant bölgesine) bağlanan ve immünglobulin molekülünün papain enzimi ile muamelesi sonucunda elde edilebilen bölgesidir.

F(ab')₂ - Antikor molekülünün antijenik determinant bölgesine bağlanan Fab bölümü ve disülfid köprülerinden oluşan bölümdür. Antikorun pepsin enzimiyle parçalanması sonucu elde edilir. Bir immünglobulin molekülü bir adet F(ab')₂ bölümü ve bir adet Fc bölümünden oluşur.

Fc - Antikor yapısında olup da antijenle bağlanma özelliği olmayan ve fagositlerdeki Fc reseptörlerine bağlanıp komplemanı aktive edebilen bölgedir. Antikorun bu bölümü sabit olup enzimatik sindirimle kolayca kristalize olur.

Flüorokrom (Flüorofor) - Belli bir dalga boyundaki ışınla uyarıldığında enerji değiştirerek daha uzun dalga boyunda ışın yayabilen doğal ya da yapay maddeler.

Fon Boyanması - Özgül olmayan ve işlem hatalarından kaynaklanan tüm boyanmaları ifade etmekte kullanılır.

Hibridoma - Antikor üreten B lenfositin malign melanoma hücresiyle birleştirilmesi sonucu oluşturulan klonlanmış hibrid hücrelerdir. Sürekli büyürler ve tek bir epitopa özgü antikor üretirler.

İmmünojen - İmmün yanıt oluşturabilen antijen.

Kromojen - Belli bir renkte ürün ortaya çıkaran kimyasal bir grup madde.

Monoklonal Antikor - Tek bir B lenfositinden klonlanan hücrelerden elde edilen antikorlardır. Aynı klondan elde edilen antikorlar aynı özelliklere sahiptir.

Nonimmün Serum - İmmünize edilmemiş hayvandan elde edilen serum.

Özgüllük - Antijen ile antikor arasındaki seçici bağlanma özelliği.

Plazma Hücreleri - Bir antikordan yüzbinlerce kopya üretebilen B lenfositin ileri derecede farklılaşmış aşamasındaki hücreleridir.

Poliklonal Antikor - Çok sayıdaki farklı B lenfosit tarafından üretilen antikorların bir karışımıdır. O nedenle bir protein molekülündeki farklı epitopları tanır. Özgüllük dereceleri zayıftır.

11. Ekler

TAMPONLAR

Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) (0.01M, pH 7.2)

sodyum fosfat dibazik, susuz (Na_2HPO_4)	1.48 g
potasyum fosfat monobazik, susuz (KH_2PO_4)	0.43 g
sodyum klorür (NaCl)	7.20 g

yukarıdakiler 1 litre distile suda çözülür.

Tris Tamponu (0.05M, pH 7.6)

- 6.1 g Tris (Trishydroxymethyl aminomethane) base 50ml distile suda çözülür,
- 37ml 1N hidroklorik asit eklenir,
- distile suyla 1 litreye tamamlanır.
- pH 25°C'de 7.6 olmalıdır.

ZIT BOYALAR

Mayer Hematoksilin

potasyum aliminyum sülfat ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	5 g
hematoksilin	100 mg
sodyum iyodat (NaIO_3) veya potasyum iyodat (KIO_3)	10 mg
sitrik asit, monohidrat	100 mg
klorat hidrat	5 g

- 75 ml distile suya potasyum alum, hematoksilin ve sodyum iyodat konur, bir gece tam olarak çözülene kadar bekletilir,

- kloral hidrat, sitrik asit ve tamamı 100 ml olacak şekilde distile suya eklenir, karıştırılır, 5 dk kaynatılır, soğuduktan sonra filtre edilir. Solüsyon kullanıma hazırdır ve bir daha filtre etmeye gerek yoktur.

Not:

1. Genellikle 1 yıl raf ömrü vardır.
2. Solüsyon birden fazla kez rahatlıkla kullanılabilir.
3. Eğer bu boya çekirdek boyamasında yetersiz kalıyorsa sodyum iyodat miktarı 5 mg'a indirilir.

Harris Hematoksilin

hematoksilin	5 g
etil alkol	50 ml
potasyum veya amonyum alum	100 g
distile su	950 ml
civa oksid	2.5 g
glasiyal asetik ait	40 ml

- hematoksilin alkolde hafif ısı kullanılarak (56-60°C'de) çözülür,
- alum distile suda sıkça karıştırılıp ısıtılarak çözülür,
- alum çözeltisi sıcakken hematoksilin çözeltisi buna eklenir ve karıştırılarak kaynama ısısına çıkılır,
- ateş kapatılır ve civa oksid eklenir (taşmamasına dikkat),
- karışım hızlıca soğutulur (soğuk su içinde veya dondurucuda),
- glasiyal asetik asit eklenir ve süzülür. Solüsyon kullanıma hazırdır, eğer sonra kullanılacaksa kullanım öncesi tekrar süzülmalıdır.

FİKSATİFLER

% 10'lük Tamponlu Nötral Formalin, pH 7.2

Formaldehit (%37-40'lık)	100 ml
Sodyum fosfat dibazik, susuz	6.5 g
Sodyum fosfat monobazik, susuz	4.0 g
Distile su	900 ml

Zenker Solüsyonu

Potasyum dikromat	25 mg
Civa klorür	50 mg
Sodyum sülfat	10 g
Distile su	1000 ml
Glasiyel asetik asit	50 ml

yukarıdaki tuzlar distile su içinde hafifçe ısıtılarak ve karıştırılarak çözülür ve glasiyel asetik asit eklenir.

Bouin Solüsyonu

%1'lik doymuş pikrik asit	750 ml
Formaldehid (%37-40'lık)	250 ml
Glasiyel asetik asit	50 ml

SÜBSTRAT-KROMOJEN SOLÜSYONLARI

Peroksidaz Enzimiyle Kullanılanlar

Diaminobenzidin (DAB)-H₂O₂ Solüsyonu

- 6 mg 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 10 ml 0.05M pH 7.6 Tris tamponu içinde çözülür,
- %3'lük hidrojen peroksitten 100µm eklenir,
- eğer çökelek oluşursa filtre edilir,
- preparat üzerine oda ısısında 5-10 dakika uygulanır ve yıkanır.

Not:

1. Hazırlanan solüsyonun ömrü oda ısısında 2 saattir, o nedenle kullanmadan önce taze hazırlanmalıdır.
2. Toksikitesi nedeniyle temas ve inhale edilmemelidir.

Aminoetilkarbazol (AEC)- H₂O₂ Solüsyonu

- 4 mg 3-amino-9-ethylkarbazole 1 ml N,N dimethylformamide içinde çözülür,
- karıştırma sırasında 14 ml 0.1M pH 5.2'lik asetat tamponu* eklenir,
- %3'lük hidrojen peroksitten 150µm eklenir,
- eğer çökelek oluşursa filtre edilir,
- preparat üzerine oda ısısında 30 dakika uygulanır ve yıkanır.

Not:

1. Hazırlanan solüsyonun ömrü oda ısısında 3-4 saattir. AEC-formamide karışımının ömrü çok daha uzundur ve o nedenle bu karışım stok olarak hazırlanıp kullanılabilir.
2. Toksikitesi nedeniyle temas ve inhale edilmemelidir.

* Asetat tamponu (0.1M, pH 5.2)

210 ml 0.1N asetik asiti (5.75 ml glasiyel asetik asitin 1 litre distile sudaki çözeltisi) 790 ml 0.1M sodyum asetat (13.61 g sodyum asetat trihidratın 1 litre distile sudaki çözeltisi) ile karıştırın.

Chloro-Naphthol- H₂O₂ Solüsyonu

- 3 mg 4-chloro-1-naphthol 0.1ml saf etanolde çözülür,
- karışım sırasında 10 ml 0.05M pH 7.6 Tris tamponu eklenir,
- %3'lük hidrojen peroksitten 100µm eklenir,
- eğer çökelek oluşursa filtre edilir,
- preparat üzerine oda ısısında 30 dakika uygulanır ve yıkanır.

Alkalın Fosfataz Enzimiyle Kullanılanlar

Fast Red-Sübrat Solüsyonu

- 2 mg naphthol AS-MX fosfat serbest asidi (Sigma N 4875) 0.2 ml N,N-dimethylformamide ile birlikte bir cam tüpte çözülür,
- 9.8 ml 0.1M pH 8.2 Tris tamponu eklenir,

- endojen alkalın fosfat aktivitesini kapatmak için 0.01-0.03 ml 1M levamisole (Sigma L 9756) eklenir (bu solüzyon buzdolabında haftalarca veya dondurucuda daha uzun süre saklanabilir),
- boyamadan önce 10 mg Fast Red TR tuzu (Sigma F 1500) yukarıdaki solüsyonda çözülür ve filtre edilerek lamlara uygulanır,
- oda ısısında 10-20 dk. tutulur.

Not:

Bu sübstrat-kromojen karışımı özellikle hücre yaymaları (smear) için kullanılır.

New Fuchsin-Sübstrat Solüsyonu

- A solüsyonu: 18 ml 0.2M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (Merck 801464) 50 ml 0.05M pH 9.7 Tris tamponu ile karıştırılır, 600 mg sodyum klorür ve 28 mg levamisole eklenir,
- B Solüsyonu: 35 mg naphthol AS-BI fosfat (Sigma N 2250) 0.42 ml N,N-dimethylformamide içinde çözülür,
- C Solüsyonu: Çeker ocakta 140 µl ml%5'lik New Fuchsin (Sigma N 0638, 5 g 100 ml 2N HCl) 0.35 ml taze hazırlanmış %4'lük sodyum nitrit (Sigma S 2252, 40 mg'ın sudaki çözeltisinden 1 ml) ile karıştırılır. 1 dakika karıştırılır.
- Önce A ve B solüzyonları karıştırılır sonra C solüsyonu eklenir. HCl ile karışımın pH'sı 8.7'ye ayarlanır, iyice karıştırılır ve filtre edilerek oda ısısında 10-20 dk lamlara uygulanır.

Not:

Bu sübstrat-kromojen karışımı özellikle doku kesitleri için kullanılır.

Glüköz Oksidaz Enzimiyle Kullanılan

NBT-Sübstrat Solüsyonu

- 135 mg beta-D-glukoz 10 ml 0.05M pH 8.3 Tris tamponunda çözülür,
- 13.5 mg Nitro Blue Tetrazolium ve 2.5 mg phenazine methosulphate eklenir ve karıştırılır,
- lamlar 37°C'de 15-20 dk, karanlıkta inkübe edilir,
- 0.05M pH 8.3 Tris tamponunda yıkanır.

Beta Galaktozidaz Enzimiyle Kullanılan

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Galactoside (IbGa)-Sübstrat Solüsyonu

- A Solüsyonu: 10 mg IbGa 0.5ml N,N-dimethylformamide içinde çözülür.
- B Solüsyonu: 1.1 mM magnezyum klorür içeren 7 ml PBS 0.5 ml 50 mM potasyum ferricyanide ve 0.5 ml 50 mM potasyum ferrocyanide içine eklenir,
- Çalışma Solüsyonu: 0.05 ml A sülosyonu 2.276 ml B solüsyonuyla karıştırılır (karışım derin dondurucuda 2 ay saklanabilir),
- kesitler 37°C'de 1 saat inkübe edilir (oluşan açık mavi reaksiyon ürünü insoluble, stabil indigo bileşigidir)
- yıkanır ve kesitler nötral kırmızıyla zıt boyanır.

ENZİM DİJESYONU

Her iki solüsyonun da taze kullanılması gerekir. Uygulama ısısı ve süresi denenerek bulunur.

Tripsin (% 0.1)

Trypsin (type II, crude from porcine pancreas, Sigma T 8128)	50 mg
CaCl ₂	50 mg
distile su	50 ml

- Önce distile suya CaCl₂ katılır, eritilir ve ısısı 37°C'ye çıkarılır, sonra tripsin ilave edilir. pH 7.8 olmalıdır (37°C'de). pH ayarlaması % 0.1'lik NaOH veya %2'lik HCl ile yapılır.
- Kesitler inkübasyondan önce distile suda 37°C'ye çıkarılmalıdır.

Protease (% 0.01)

Protease (type XXIV, bacterial, Sigma p 8038)	5 mg
CaCl ₂	5 mg
Tris tamponu	50 ml

- Önce Tris tamponuna CaCl₂ katılır, eritilir ve ısısı 37°C'ye çıkarılır, sonra protease ilave edilir. pH 7.3 olmalıdır (37°C'de). pH ayarlaması % 0.1'lik NaOH veya %2'lik HCl ile yapılır.
- Kesitler inkübasyondan önce distile suda 37°C'ye çıkarılmalıdır.

ANTİKOR KAYIT FORMU

Madde No:

ANTİKOR : _____

KAYNAK : _____

GELİŞ TARİHİ : _____

FİRMA : _____

KATALOG No : _____

LOT No : _____

SULANDIRMA : _____

PARÇALAR : _____

DEPOLAMA : _____

STABİLİTE : _____

TARİH ve İSİM : _____

ÇALIŞMA DİLÜSYONU: _____

NOTLAR : _____

11. Kaynaklar

1. Cordell JL et al: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphates and monoclonal anti-alkaline phosphate conjugates in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 32: 219, 1984.
2. Culling CF et al: The effect of various fixatives and trypsin digestion upon the staining of routine paraffin-embedded sections by the peroxidase-antiperoxidase and immunofluorescent technique. *J Histochem* 3: 10, 1980.
3. Elias JM et al: Special report: quality control in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 92: 836, 1989.
4. Fan AG, Nakane PK: Immunocytochemistry with enzyme labeled antibodies. *J Immunol Meth* 47: 129, 1981.
5. Giorno R: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diag Immunol* 2: 161, 1984.
6. Guesdon JL et al: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27: 1131, 1979.
7. Hsu SM et al.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577, 1981.
8. Kiernan JA: Histological and histochemical methods: Theory and Practice. New York, Pergamon Press, 1981, pp: 81-121.
9. Mason DY: Immunocytochemical labeling of monoclonal antibodies by the APAAP immunoalkaline phosphate technique. *Techniques Immunohistochem* 35: 21, 1985
10. Nadji M, Morales AR: Immunoperoxidase: I. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
11. Nagle RB et al: Immunohistochemical demonstration of keratins in human ovarian neoplasms. A comparison of methods. *J Histochem Cytochem* 31: 1010, 1983.
12. Naish SJ (ed) Handbook. Immunochemical Staining Methods. Carpinteria. DAKO Corporation, 1989.
13. Petrusz P, Ordronneau P: Immunocytochemistry of pituitary hormones. *Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology*. Bristol Wright PSG 1983 pp: 212-219.