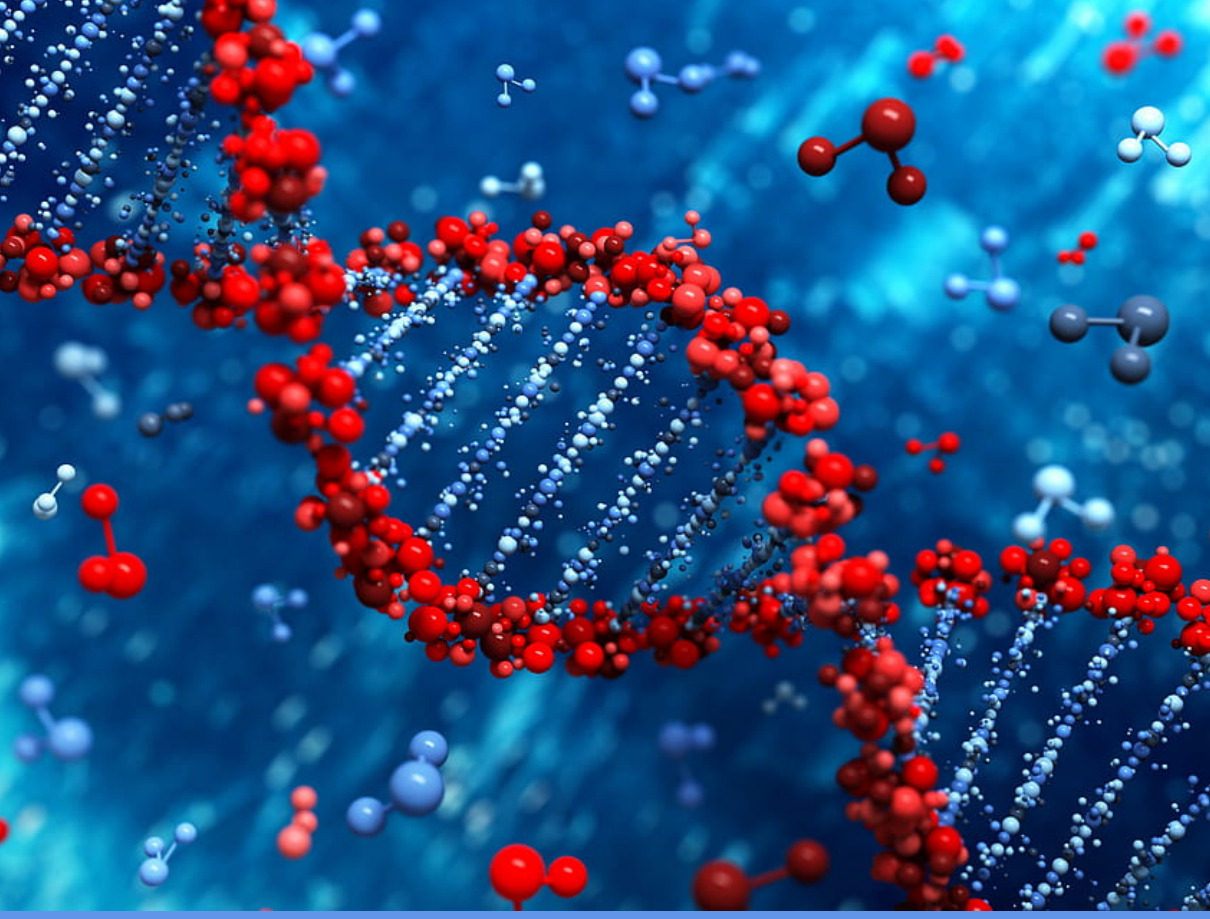


TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK LABORATUVARINDA KULLANILAN TEMEL MOLEKÜLER TEKNİKLER

Dr. Sevda ALTUN

ISBN: 978-625-5753-08-3

Ankara -2025

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK LABORATUVARINDA KULLANILAN TEMEL MOLEKÜLER TEKNİKLER

YAZAR

Dr. Sevda ALTUN

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Rafet Kayış Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Antalya, Türkiye.

sevda.altun@alanya.edu.tr

ORCID ID: 0000-0001-9719-3053

DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.17549601

Copyright © 2025 by UBAK publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. UBAK International Academy of Sciences Association Publishing House®
(The Licence Number of Publicator: 2018/42945)

E mail: ubakyayinevi@gmail.com
www.ubakyayinevi.org
It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.
UBAK Publishing House – 2025©

ISBN: 978-625-5753-08-3
November / 2025
Ankara / Turkey

ÖNSÖZ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik, insan hastalıklarının tanı ve tedavisinin belirlenmesinde hücre, gen ve protein seviyesinde hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmayı inceleyen temel tıp bilimidir. Modern sağlık hizmeti ve laboratuvar uygulamalarını kullanan disiplinler arası bilimdir. Genellikle Tıp Fakültelerine bağlı olarak tüm kliniklerle işbirliği içerisinde olup, çeşitli deney modelleri ve laboratuvar uygulamalarını kullanarak hizmet vermektedir. Bu kitabımda Tıbbı Biyoloji ve Genetik araştırma laboratuvarında hastalıkların tanı ve tedavisi için sıklıkla kullanılan temel moleküler tekniklerin uygulaması hakkında detaylı bir biçimde bilgi vermeyi amaçladım. Bu kitabımda manevi desteği olan aileme ve UBAK yayınevine teşekkür ederim.

07/11/2025

Dr. Sevda ALTUN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ 3

TIBBI BİYOLOJİ VE GENETİK LABORATUVARINDA KULLANILAN TEMEL MOLEKÜLER TEKNİKLER **4**

1. Tıbbi Biyoloji ve Genetik **6**

2. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarlarda Kullanılan Temel Moleküler Teknikler **8**

2.1. Hücre Kültürü 8

2.2. İmmunofloresan Mikroskopisi (IF) 14

2.3. PCR - Polimeraz Zincir Reaksiyonu 18

2.4. Real Time PCR Analizi 22

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi 26

2.6. Western Blot (İmmüno Blot) 30

2.7. Flow Sitometri (Akan Hücre Ölçer, Akım Sitometri)……..... 38

KAYNAKÇA 45

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK LABORATUVARINDA KULLANILAN TEMEL MOLEKÜLER TEKNİKLER

Dr. Sevda ALTUN

1. Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Tıbbi Biyoloji, temelde moleküler biyolojiye dayalı olup moleküler tıbbın geliştirilmesinde modern sağlık hizmeti ve laboratuvar uygulamalarını kullanan biyoloji bilimidir. Tıbbı biyoloji temel tıp bilimi olup, gen ve hücre seviyesinde hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmayı inceler. İnsan hastalıkları ve sağlığı alanındaki araştırma çalışmalarını disiplinler arası işbirliğiyle yürütmektedir ve bu çalışmalarda hastalıklara neden olan hücresel ve moleküler mekanizmalar hedeflenmektedir. Ayrıca tıbbı biyoloji insan genomunun, proteomun, transkriptomun ve metabolomun, karsinogenez sürecinin mekanizmasının daha net anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Tıbbı biyolojide son yapılan araştırma çalışmaları, hastalıkların tedavinde kök hücre gen tedavisi ve epigenetik tedaviler gibi yeni yaklaşımların ortaya çıkmasını desteklemiştir (Mehra, 2010). Tıbbı biyoloji bölümleri tıp fakültelerinin temel tıp birimlerine bağlı olup; genetik hastalıklar, kanser, metabolik hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları, immünolojik bozukluklar gibi birçok hastalığın moleküler mekanizmasını inceleyerek hastalıkların tanı ve tedavisinde klinisyenlere yardımcı olarak hizmet vermektedir (Goodman, 2007).

Genetik bilimi biyolojinin alt dalı olup, organizmalardaki kalıtım ve genetik varyasyonu inceler. Tıbbı genetik ise; insan genetik bozuklukları ve hastalıkları, kalıtım geçişli kanserleri ve diğer genetik hastalıkların altında yatan genetik ve moleküler mekanizmaları inceleyen bilim dalıdır (Gelehrter ve ark., 1998).

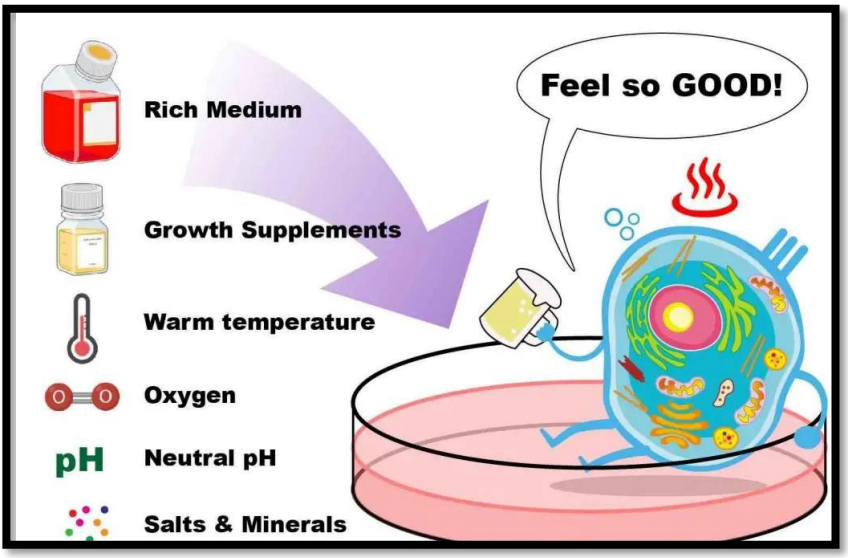
Tıbbi genetik uzmanları, yeni nesil DNA dizileme, gen ekspresyon analizi ve genetik mühendisliği gibi çeşitli laboratuvar teknikleri kullanarak insan hastalıklarına neden olan mutasyonları açığa çıkarmaktadırlar. Tıbbı genetik birimleri tıp fakültelerine bağlı olup; kalıtsal hastalıklar, kanser, jinekoloji, pediatri ve farmakogenetik gibi birçok alana hizmet vermektedir. Tıbbı genetik araştırma laboratuvarında hastalıkların tanı ve tedavisi için karyotip testi, PCR, NGS, FISH, CRISPR, moleküler blotlama, ELISA, immünboyama genetik panel testi, genom sekanslama, kanser genetik testleri ve preimplantasyon genetik tanı testleri kullanılmaktadır (Tobias ve ark.., 2011).

Şekil 1: Tıbbi ve genetik biliminin çalışma sahası

2. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarlarda Kullanılan Temel Moleküler Teknikler

2.1. Hücre Kültürü

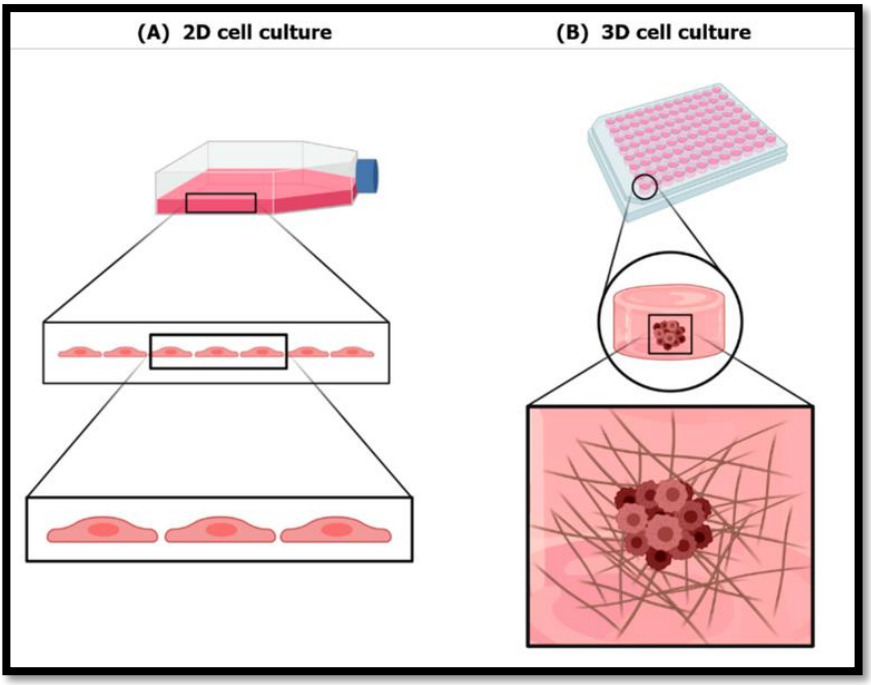
Hücre kültürü, hücrelerin orjinal dokudan enzimatik, mekanik veya kimyasal yöntemlerle ayrıştırılarak hücrelerin elde edilerek in vitro ortamda büyütülmesidir. Uygun koşullar altında inkübatörde vücut sıcaklığında (37 °C) büyütülmeleri gereklidir. Uygun koşullar; temel besinler, optimum pH, ozmolalite, büyüme faktörleri, nem ve ortam gazları (CO_2/O_2) olup hücre tipine göre farklılık göstermektedir (Baust ve ark., 2017).



Şekil 2: Hücre kültürü için uygun koşullar

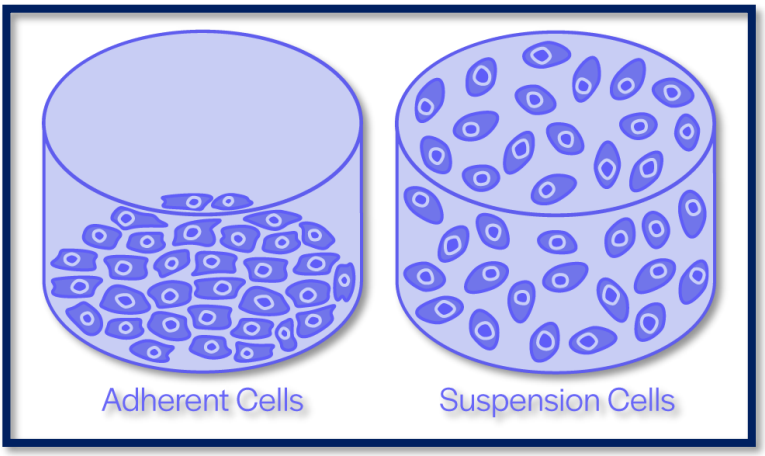
Hayvan hücre kültürü tek tabaka halinde iki boyutlu (2D cell culture), doku benzeri yapılar için lifli iskeleler veya jeller içinde üç boyutlu (3D cell culture) yapılabilir. Üç boyutlu hücre kültürü iki boyutludan farklı olarak; in vitro ortamda hücrenin gerçek fizyolojisi ve morfolojisini temsil eden bir mikro

ortam sunar (Saydé ve ark., 2021).



Şekil 3: A) İki boyutlu hücre kültürü B) Üç boyutlu hücre kültürü

Hücreler canlılarının devamı için süspansiyon veya yapışkan kültürlerde büyütülebilir. Hücre tipine göre hücrelerin yüzeye tutunması ve yayılması hücre adezyon moleküllerine de bağlıdır. Süspanse hücreler yüzeyden bağımsızdır ve kültürde kolay büyütülür. Süspanse hücrelerin gaz alış verişi için kültür kapları sallama yöntemi ile karıştırılabilir. Yapışkan hücreler kültürde büyümesi için adezyon yüzeye ihtiyaç duyarlar. Hücre kültürü yüzeyinin ekstraselüler matris olan kollajen ve laminin ile kaplanarak yapışkanlığı artırılabilir (DeQuach ve ark., 2010).



Şekil 4: Adherent (yapışkan) ve süspanse hücre kültürü

Adherent (yapışkan) hücre	Süspanse hücre
Belirli aralıklarla pasajlanır.	**Sıklıkla pasajlanır.**
Hücreler daha görünürdür.	**Hücrelerin görüntülenmesi zordur.**
Hücreler yüzeyden enzimatik veya mekanik ayrıştırılır.	**Hücrelerin ayrıştırılmasına gerek yoktur.**
Büyüme yüzey alanına bağlıdır.	**Büyüme hücre yoğunluğuna bağlıdır.**

Tıbbı biyoloji ve genetik laboratuvarında kültüre edilecek hücreler genellikle ATCC'den (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu) temin edilir. ATCC, türlere, doku/hastalık türlerine ve sinyal yollarına göre 4.000'den fazla sürekli hücre hattı ve biyomalzemeleri bünyesinde bulunduran güvenilir bir biyolojik kaynaktır (Flores Villavicencio ve ark., 2014). ATCC şirketi bilimsel araştırmacılara, insan ve hayvan hücre hattına ek olarak mikroorganizma hibridoma koleksiyonu ve biyoürün de sunmaktadır (Berns., 1996).

Hücre kültürü büyüme koşulları;

Bileşenler	İşlevi
Karbon kaynağı (glikoz / glutamin)	Besin ve Enerji kaynağı
Amino asit	Protein kaynağı
Vitamin	Hücrenin hayatta kalmasını ve büyümesini teşvik edici
Serum (Fetal sığır serum)	Hücre büyümesi için gerekli büyüme faktörlerini içeren takviye
Tuz	Hücreler içinde optimum ozmotik basıncı korumak ve enzimatik reaksiyonlar için izotonik ortam
Antibiyotik (penisilin/streptomisinin)	Kontaminasyona bağlı hücre kaybını önlenmesi
Bikarbonat/HEPES tamponu	Ortamın pH değerinin korunması
Fenol kırmızı boya	pH indikatörüdür. Fenol kırmızısının rengi pH 7-7,4'te turuncu/kırmızıdan, asidik (düşük) pH'ta sarıya, bazik (yüksek) pH'ta ise mora döner.
Parametreler	**Sıcaklık 37 °C** **CO2 %5** **Bağıl Nem %95**

Şekil 5: Hücre kültürü büyüme ortamı

Hücrelerin Bakımı ve Pasajları

ATCC'den alınan herhangi bir hücre hattı önerilen şartlarda büyütülmelidir. Burada SH-SY5Y hücrelerinin (insan nöroblastomu) uygun koşullarda kültüre edilmesinin basamakları anlatılacaktır. Hücrelerin büyüme ortamlarının içeriği farklı olsada pasajlama, dondurma, çözme ve sayım protokolleri benzerdir. Hücreler %10-20 FBS (inaktive edilmiş), %1 L-Glutamin ve %1 Pen/Strep içeren DMEM F-12 %5 CO2'li ortamda 37°C'de inkübatörde büyütülür. Hücreler, 100 x 20 mm'lik veya 60 x 15 mm'lik hücre kültür kaplarında tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğalmadıkları zaman hücrelerin ortamı 2 günde bir değiştirilir. Hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında ise pasajlama işlemi yapılır.

Hücrelerin pasajlanması;

- Hücrelerin ortamı steril cam pastör pipet kullanarak ortam uzaklaştırılır.
- Kültür yüzeyi tripsin aktivitesini arttırmak için Ca2+ ve Mg2+ içermeyen steril PBS bir kez yıkanır ve PBS vakum aracılığıyla uzaklaştırılır.
- Hücrelerin tüm yüzeyi kaplayacak miktarda tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilir ve 37°C'de % 5 CO_2'li inkübatörde 1-2 dakika bekletilir.
- Yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenir ve hücreler pipet yardımıyla homojenize edilir.

Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücre hatlarının kültür ortamında sonsuza kadar devam ettirilmesi morfolojik, büyüme, fonksiyon ve karyotipik olarak değişime neden olacağından hücreler kısa veya uzun süreli olarak stoklanmalıdır. İn vitro hücre kültürü çalışmalarında, dondurma ve çözme işlemlerinden kaynaklı olumsuzluklardan hücreleri korumak için genellikle DMSO ve gliserol gibi kriyoprotektan ajanlar kullanılmalıdır.

- Dondurmadan önce pasajlanarak homojenize edilen hücrelere %5 DMSO eklenir ve hücreler kriyotüplere aktarılarak -86ºC'de veya azot tankında saklanır.
- Hücreleri çözdürme işleminde ise, -86ºC'den hızlıca çıkarılan hücreler 37ºC su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dk) bekletilir ve taze besi yeri içeren ortama ilave edilir.

Hücre Sayısının ve Canlılığının Belirlenmesi

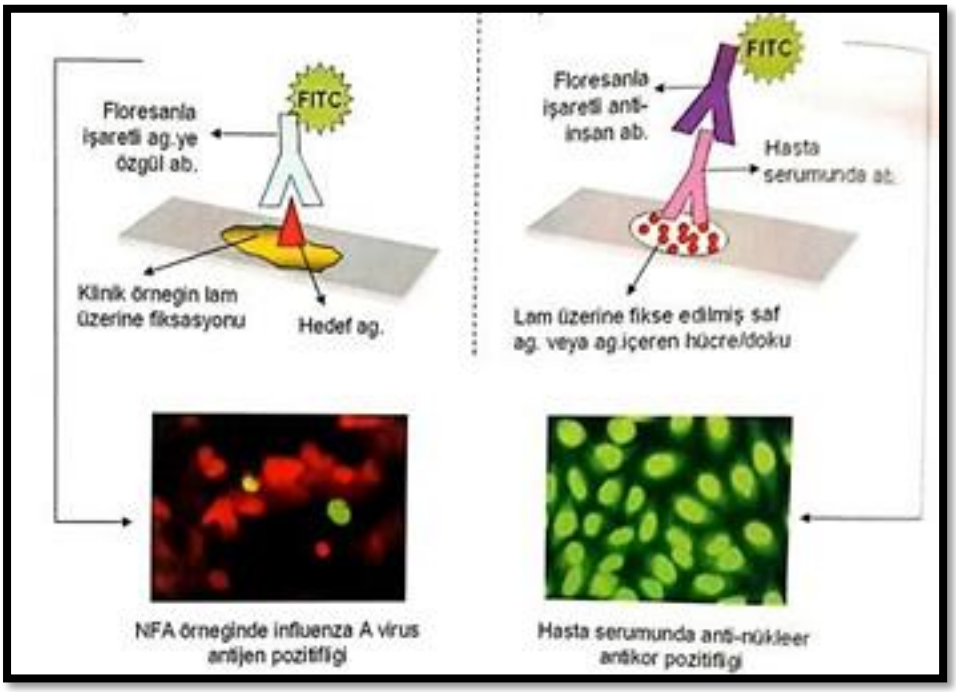
Hücre yoğunluğunu belirlemek üzere hücre sayımı yapılır. Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre istenilen miktarda hücre ekebilmek için hemositometre ile sayım yapılır. Hemositometre, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 9 büyük kareden oluşan özel mikroskop lamıdır. Sayım için hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp tripan mavisiyle 100 µl'ye tamamlanır. Tripan mavisi ölü hücrelerin membranından geçebilen negatif yüklü bir boyadır. Canlı hücrelerde boyanma gözlemlenmez ve mikroskop altında daha parlak görünürler. Sayım için hazırlanan karışım, pipetle homojenize edilir. Hemositometre üzerine bir lamele koyulur ve sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına pipetle kenardan verilerek yayılır. Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücre miktarı sayılır. Hücre yoğunluğunu (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanılır:

$$\textbf{Hücre sayısı / ml} = \frac{\textbf{Sayılan hücre miktarı} \times \textbf{Dilüsyon oranı (10)} \times 10^4}{9}$$

2.2. İmmunofloresan Mikroskopisi (IF)

İmmünofloresan (IF), bir hücre veya dokunun morfolojik yapısı ve içindeki hedeflenen biyomoleküllerin nicel olarak seviyesi ve yerleşimini belirlemek için sıklıkla kullanılan yöntemdir. Bu yöntem esas olarak, hedef biyomoleküle ait antikor (primer) moleküllerinin antijenine bağlanmasına dayanır. Bazı durumlarda nicel düzeyde tespit için antikor moleküllerine özgü ve bir florofora konjuge edilmiş ikincil (sekonder) bir antikor gereklidir (Donaldson.,2015). Böylece floresan mikroskobu altında belirli dalga boyunda

(kullanılan sekonder antikora göre değişmektedir) floresan bir görüntü elde edilir. IF yönteminde ayrıca, DNA'daki adenin - timin açısından zengin bölgeyen bağlanan floresan bir boya olan DAPI(4',6-diamidino-2-fenilindol) boyası kullanılarak DNA'nın etiketlenmesiyle görüntüleme sağlanabilir (Mabrouk ., 2022)



Şekil 6: İmmünofloresan (IF) yöntemi

İmmunofloresan Mikroskopisi Hücrelerin Hazırlanması

- Steril kabin içinde %70'lik etanolde bekletilen lamellerin kâğıt mendil üzerinde kuruması beklenilir ve ardından lameller 6 kuyulu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna yerleştirilir.
- Kuyulara hücre ekilmeden önce, hücre tutunma potansiyelini

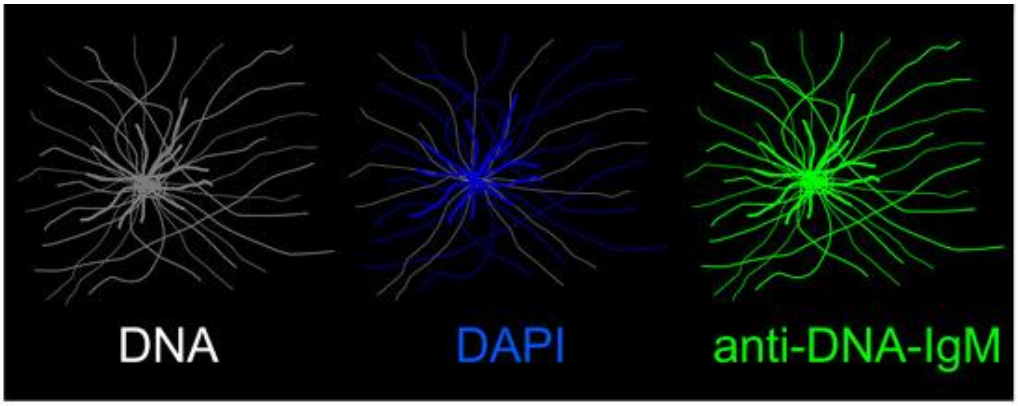
artıran bir bağlantı faktörü olarak poli-D-lisin (PDL) kullanılır. Bu uygulamayla pozitif yüklü PDL polimeri ile negatif yüklü hücreler veya proteinler arasındaki etkileşim arttırılır. Lameller üzerine 1 ml PDL eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.

- Ardından lameller üzerindeki PDL uzaklaştırılır ve 2-3 kez saf su ile yıkanır. Hücreler içlerinde lamel bulunan kültür kaplarına 2 ml ortam içerisinde %50-60 yoğunlukta olacak şekilde ekilir ve inkübatöre yerleştirilerek 24 saat inkübe edilir.

Fiksasyon ve Bloklama

- Kültür ortamı uzaklaştırılır ve 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapılır.
- 1 ml % 4 paraformaldehit eklenerek hücreler oda sıcaklığında 1saat fikse edilir.
- Fiksasyonun ardından 1 ml PBS ile 1-2 kez yıkama yapılır.
- Oda sıcaklığında bir karıştırıcı üzerinde % 0.2 Triton X-100 içeren PBS ile 5 dakika inkübasyon yapılarak hücreler geçirgenleştirilir.
- Ardından 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapılır.
- %1 BSA içeren PBS ile 5 dakika oda sıcaklığında bloklama yapılır ve bloklama solüsyonu uzaklaştırılır.
- Antikor işaretlemesi Primer antikorlar %1 BSA içeren PBS içerisinde dilüe edilerek her lamele 50 µl hacimde damlatılır ve lamellerin üzeri parafilm ile kapatılarak 37oC'de 1 saat inkübasyona bırakılır.
- Parafilm uzaklaştırılır ve 4 sefer PBS yıkaması yapılır.

- %1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilen sekonder antikorlar her lamele 50 µl hacimde damlatılarak lamellerin üzeri parafilm ile kapatılır ve 37ºC'de 20 dk inkübasyona bırakılır.
- Bu aşama ve sonrasındaki her bir basamak, örneğin doğrudan ışık görmesini engelleyecek şekilde yapılır.
- Parafilm uzaklaştırıldı ve 4 defa PBS yıkaması yapılır.
- 1 ml %70 EtOH ilave edilerek 1 dakika bekletilir.
- Ardından 1 ml % 100 EtOH ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir.
- DAPI ile kapatmak için %100 EtOH içindeki hücreleri taşıyan lameller çıkartılarak kâğıt mendiller üzerinde kurutulur.
- Hücrelerin lamel üzerinde tutunduğu yüzeye 10 µl DAPI damlatılarak ters çevrilir ve lamların üzerine kapatılır. Floresan mikroskobu ile inceleme yapılır.



Şekil 7: İmmünofloresan (IF) yöntemi ile DAPI ve anti-DNA-IgM boyamasından türetilen immünofloresan sinyalin görüntüsü

2.3. PCR - Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) DNA tabanlı bir prosedür ve tıbbı biyoloji ve genetik laboruvarınının vazgeçilmez bir tekniğidir. 1985 yılında Kary B. Mullis tarafından ortaya koyulan bu yöntem, deoksiribonükleik asitin (DNA) kısa bir zamanda istenilen bölgesinin milyonlarca kopyasını oluşturmaktadır. (Rahman ve ark., 2013). PCR tekniği; hassas bir enzimatik yöntem olup, periferik kan, deri, saç, tükürük ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere çeşitli doku ve organizmalardan elde edilen DNA kullanılarak istenilen bölgenin çoğaltılmasıdır. PCR tıbbı biyoloji ve genetik laboratuvarında, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, annelik-babalık testi, genetik varyasyonların belirlenmesi, kanser tanısı ve tümörlerin genetik profillerinin belirlenmesinde kullanılır (Garibyan ve ark.,2013).

PCR tekniği 3 aşamadan toplam 30-40 döngüden oluşmaktadır. Bunlar; denatürasyon, yapışma, uzama.

1. DNA Zincirinin Açılması (Denatürasyon)

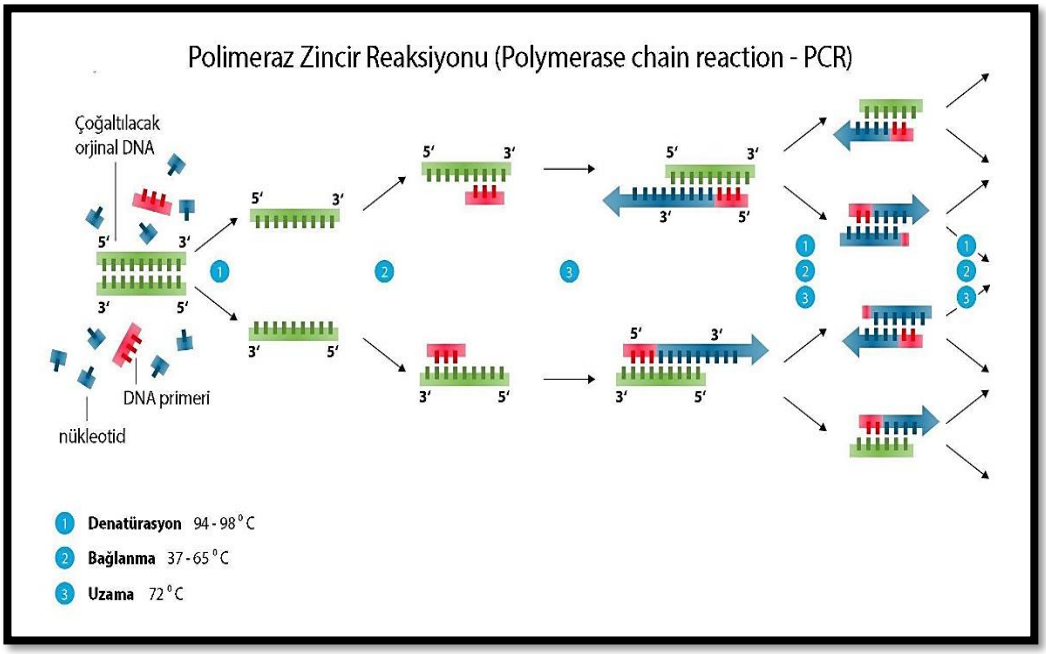
Bu aşamada kalıp DNA'nın **94°C-98°C'de** yaklaşık 1-2 dakika tutularak çift zincirinin açılmasıdır. Bazı özel durumlarda, DNA iplikçiğinin açılması için öncede 5-10 dakika ısıtma yapılmaktadır.

2) Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Yapışma)

Açılan DNA zincirlerine kendilerine spesifik oligonükleotid primerlerinin bağlanması için PCR sıcaklığı **37°C-65 °C** düşülür. Primerlerin yapışma sıcaklığı farklılık gösterdiği için önceden optimize edilmelidir. Bu aşama yaklaşık 30-60 saniyede sürmektedir.

3) Primer Uzaması

DNA zincirleri üzerine bağlanan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) aracılığıyla 72°C'de uzatılmasıdır. Bu aşama kopyalanacak DNA'nın uzunluğuna bağlı olup, bin baz çifti başına 10 saniye-1dakika arasında tamamlanmaktadır (Innis ve ark., 2012).



Şekil 8: PCR - Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşamaları

Standart PCR Çalışmalarında Kullanılan Materyaller

1. Kalıp DNA; çoğaltılması hedeflenen bölgeyi taşıyan DNA olup, bunlar genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları veya herhangi DNA parçası olabilmektedir. Deney protokolüne göre bazen RNA veya cDNA'da olabilmektedir.

2. Taq DNA polimeraz; '*Thermus aquaticus'* mikroorganizmasından alınan termostabil bir enzimdir. Bu enzimin 5' → 3' polimeraz aktivitesi sayesinde dNTP'leri kalıp zincire uygun olarak ekleyerek yeni DNA zincirinin oluşmasını katalize eder.

3. Deoksinükleotid Trifosfatlar (dATP,dGTP,dTTP,dCTP); dört bazın konsantrasyon içerisindeki miktarı eşit olmalıdır ve bu miktara çok dikkat edilmelidir. Yüksek miktardaki seviyesi istenmeyen bölgelerin çoğalmasına neden olmaktadır.

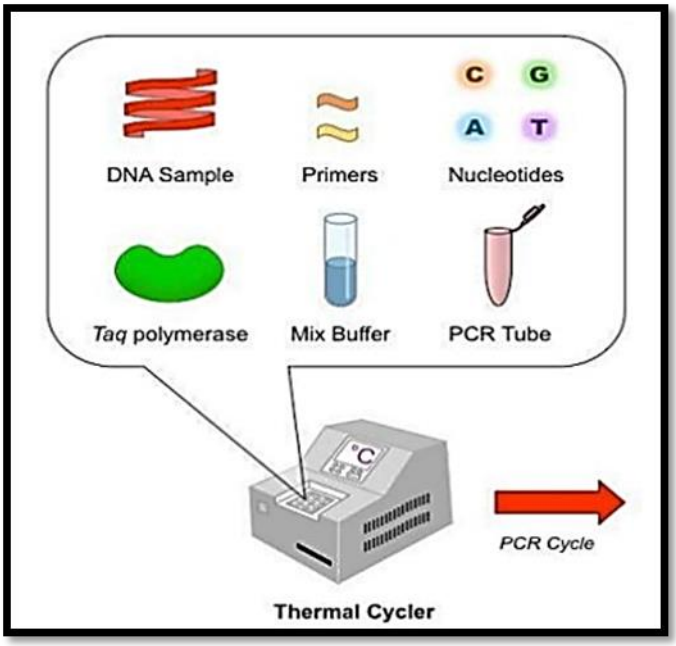
4. Tamponlar ve Magnezyum; enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için elektrolit ve koenzim gereklidir ve bu ihtiyaç tamponlarla sağlanır. Taq DNA polimerazın aktivitesi için de ortamda belirli konsantrasyonda magnezyum bulunmalıdır. Ayrıca, primer ve kalıp DNA zincirinin arasındaki etkileşim içinde magnezyum gereklidir.

5. Primerler; genellikle 20-30 nükleotit uzunluğundaki kısa, tek iplikli DNA parçaları olup kalıp DNA'da spesifik bölgeye bağlanıp, istenilen bölgenin çoğaltılmasını sağlar. PCR'da ileri (forward) ve geri (reverse) olmak üzere 2 farklı primer kullanılmaktadır.

6. PCR Buffer -10X; PCR reaksiyonunun optimal koşullarda yüksek verimlilikte çalışması için kullanılan tampon solüsyondur (Robertson ve ark., 1998).

Firmalardan alınan PCR kitine göre deney seti tasarlanır. Genellikle 25-30 döngü için PCR basamakları;

PCR basamakları	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	94 °C	1 dk
Yapışma	55 °C (primerlere göre değişir)	2 dk
Uzama	72 °C	3 dk



Şekil 9: PCR reaksiyonun materyaller

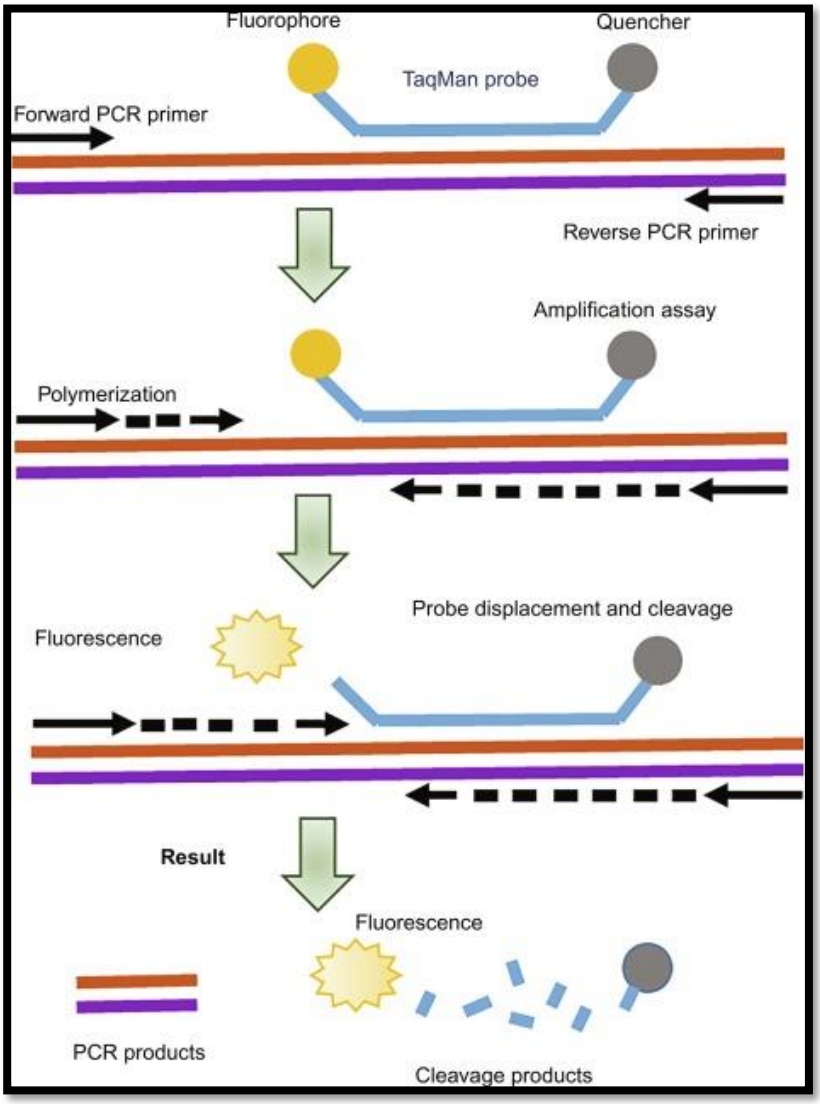
Standart PCR Reaksiyonu;

Bileşen	Son Konsantrasyon
Su	
10x PCR Tamponu	1x
Deoksinükleotid Karışımı	200 µM
İleri primer	0,1-0,5 µM
Geri primer	0,1-0,5 µM
Taq DNA Polimeraz	0,05 birim/µL
Şablon DNA (tipik olarak 10 ng)	200 pg/µL
25 mM $MgCl_2$	0,1-0,5 mM
Toplam hacim	50 µL

2.4. Real Time PCR Analizi

Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR), in vitro ortamda DNA'nın çoğaltılması floresan bir sinyalle takip edilir ve sinyal yoğunluğu reaksiyondaki PCR ürünü miktarı hakkında kantitatif bilgi verir. Hücrelerdeki veya dokulardaki belirli nükleotid dizilerini (DNA, mRNA ve miRNA) ve gen ekspresyon seviyesini incelemek için sıklıkla kullanılan yöntemdir. Qpcr'da 2 farklı floresam boya kullanılır; DNA ile spesifik olmayan flüoresan boyalar ve bir flüoresan raportör (Taqman) ile etiketlenmiş oligonükleotitlerden oluşan istenilen bölgeye spesifik DNA problarıdır (Kubista., ve ark 2006). Problar DNA dizisine uygun belirlili paremetlere sahip olacak şekilde primerle birlikte tasarlanır. Prob DNA kalıbına hibridize olur ve polimerizasyon ilerledikçe yerinden çıkar. Taqman probları, 5' ucunda bir florofor ve 3' ucunda (Quencher) bir söndürücü ile işaretlenmiş hidroliz problarıdır. DNA'nın

amplifikasyonu primerlerle ilerler ve bu sırada prob, Taq polimerazının 5' ekzonükleaz aktivitesi tarafından parçalanır. Parçalanan probdan floresan sinyali yayılır ve bu sinyalin miktarı DNA ürünü ile doğru orantılıdır (Suzuki ve ark.,2005).



Şekil 10: Real Time PCR analizi

Primer ve prob tasarımı yapılırken dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda verilmiştir.

- ✓ Primerler ve prob AT dizisi ile başlayıp GC dizisi ile bitmelidir.
- ✓ Probun bağlanma sıcaklığı primerlerden ~10°C yüksek olmalıdır.
- ✓ Probun 5'ucu G ile bitmemelidir.
- ✓ Probun GC oranı %35-60 arasında olmalıdır.
- ✓ Primer ve probların kendi aralarında ve kendi üzerlerine bağlanma ihtimalleri oldukça düşük olmalıdır.
- ✓ Amplifikasyon bölgesinin boyutu 60-150 bp arasında olmalıdır (Altun, 2018).

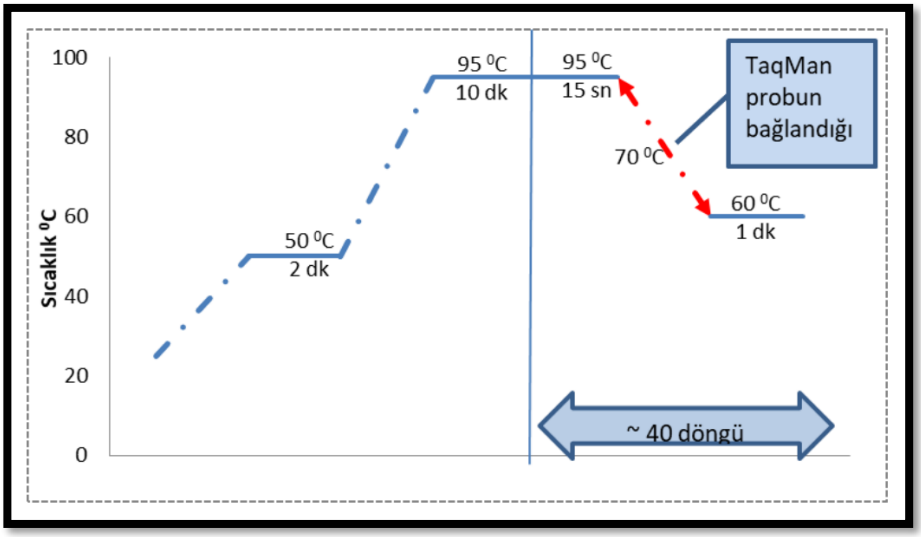
Real Time PCR analizinde reaksiyon karışımı;

Reaksiyon içeriği	Reaksiyon başına hacim
RNase/DNase-içermeyen su	6.4 µl
Reaksiyon tamponu (2x)	12.5 µl
Primer 1 (100 µM)	0.25 µl
Primer 2 (100 µM)	0.25 µl
Prob (25 µM)	0.15 µl
Enzim	0.5 µl
Toplam hacim	20 µl

Toplam hacim her bir tüp için 20 µl ana karışıma 5 µl RNA eklenmelidir. Eğer gen ekspresyon seviyesine bakılacaksa total RNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA elde edildir ve cDNA'dan devam edilir. Yapılacak olan Real Time PCR analizinin geçerliliğini değerlendirmek için pozitif ve

negatif kontrolleri dahil edilmelidir. Ayrıca gen ekspresyon seviyesinin değerlendirmesinde hedef gene (çalışılan gen) ait primerler haricinde referans gene (housekeeping) ait primerlerde aynı tüp içerisine koyulmalıdır ve böylece istatiksel hata oranı azaltılmış olur (Altun, 2018).

Real Time PCR analizinde sıcaklık protokolü aşağıdaki gibi olmalıdır.



Şekil 11: Real Time PCR protokolü

Real-time PCR sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiki analiz;

Sonuçların analizinde kontrol (referans) ve hedef gen grupları arasındaki karşılaştırmalı ölçüm için genellikle ΔCT matematiksel metot kullanır.

Oran: Göreceli mRNA ekspresyon seviyesi

2: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı (Bu oran %100'e yakın ise 2 alınır.)

CT referans: Real- time PCR reaksiyonu esnasında referans (housekeeping)

genin kantitatif olarak anlamlı artışının gerçekleştiği değer.

CT hedef: Real- time PCR reaksiyonu esnasında hedef genin kantitatif olarak anlamlı artışının gerçekleştiği değer.

Elde edilen sonuçlar genelikle GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilir (Altun, 2018).

$$\textbf{Oran (referans/hedef)} = 2^{C_T\,(\text{referans}) - C_T\,(\text{hedef})}$$

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz; , *Gelidium* ve *Gracilaria* deniz yosunu cinslerinden izole edilen 12.000 kDa ağırlığındaki lineer polisakkarittir. Ticari olarak elde edilmesinin ekonomik ve toksik olmayışı, moleküler jel elektroforezinde kullanımını uygun hale getirmiştir. Agaroz jel elektroforezi; DNA-RNA izolasyonu, PCR ürünlerinin testi ve protein saflaştırma işlemlerde sıklıkla kullanılan moleküler yöntemdir (Johansson., 1972). Agoroz jelde biyomoleküllerin yürüme hızı 7 farklı paremetreye bağlıdr;

- DNA molekülünün boyutu,
- Agaroz konsantrasyonu,
- DNA konformasyonu,
- Uygulanan voltaj,
- Etidyum bromür varlığı,
- Agaroz türü,
- Elektroforez tamponu.

Jel elektroforezinde, DNA ve RNA biyomolekülleri tampon çözeltilerin bulunduğu ortamda elektirik akımıyla molekül ağırlıklarına göre yürütülür. Bu elektrik akımı TAE (Tris Acetate EDTA), TBE (Tris Borate EDTA) VE TPE (Tris Phosphate EDTA) tamponlarıyla oluşturulur. TAE tamponu sıklıkla kullanılır ve bu tampon düşük voltajda uzun süreli DNA yürütmek içindir. Tampon seçiminde solüsyonların içerdikleri iyonik içerik çok önemlidir ve TBE ve TPE tamponlarının iyonik kuvvetleri yüksektir. Bu tamponlar hızlı iyon hareketliğine neden olarak dolayı ortamda fazladan ısı oluştururlar ve bu durum agoraz jelin eriyerek hasar görmesine sebep olur. Hasarı önlemek için bu tampon solüsyonlar seyreltilmiş (10X konsantrasyonda hazırlanıp 1X) konsantrasyonlarda kullanılır. Tamponlar aynı zamanda ortamın pH dengesinide korumaktadırlar (Sanderson., ve ark 2014).

Agoroz jeli hazırlarken yürütülecek olan biyomolekülün molekül ağırlığına göre uygun agoroz konsantrasyon oranı seçilmelidir. Agaroz jelin konsantrasyonu ile por büyüklüğü ters orantılı olup; konsantrasyon arttıkça porlar küçülür ve küçük moleküllerin yürümesi için uygun hale gelir. Büyük moleküllerin yürümesi için ise porlar büyük olmalıdır ve bu yüzden düşük konsantrasyonlu agoroz jeli hazırlanmalıdır (Raab., ve ark 2023). Por büyüklüğü % 0.5-2 arasında agaroz konsantrasyonuna göre ayarlanır ve sıcak bir ortamda çözünmesi sağlanır. Agar soğutulduğu zaman ise hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur (Lee., ve ark 2012).

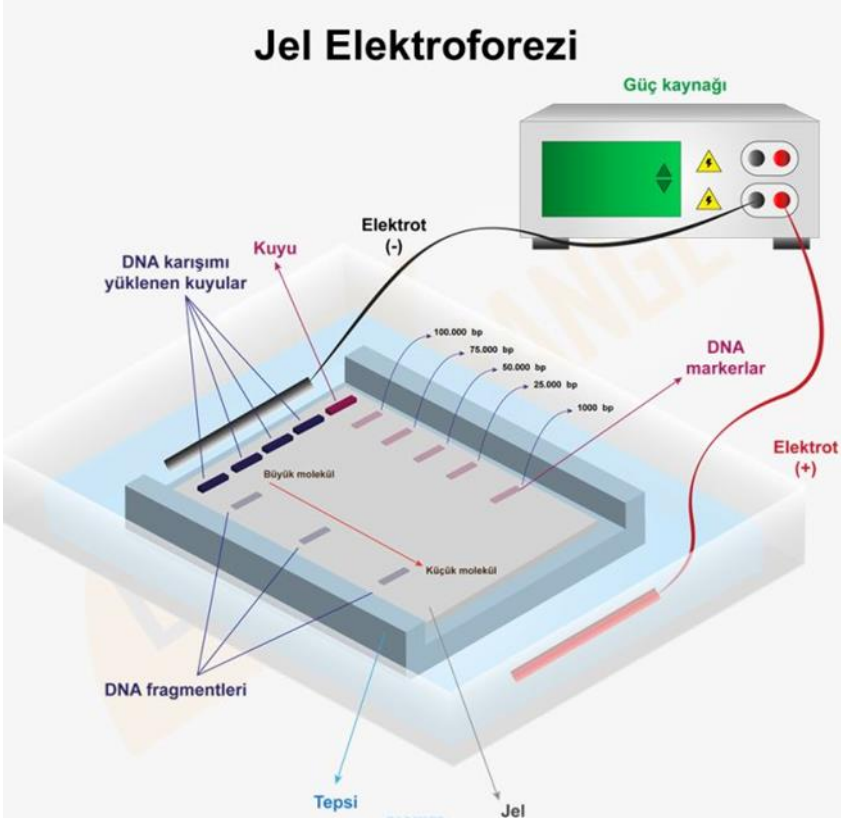
DNA fragmentlerine göre agaroz konsantrasyonları;

DNA molekülü büyüklüğü (kb)	Agaroz konsantrasyonu (% ağırlık/hacim)
5.0 - 60.0	0.3
1.0- 20.0	0.6
0.8-10.0	0.7
0.5- 7.0	0.9
0.4- 6.0	1.2
0.2- 3.0	1.5
0.1- 2.0	2.0

DNA, RNA, PCR ürünleri ve restriksiyon enzim kesim ürünleri vs. görüntülenmesi için flüoresan işaretli bir enterkalasyon ajanı olan Etidyum bromür (EtBr) kullanılır. Etidyum bromür DNA'daki bazlar arasına enterkale olarak DNA replikasyonu ve onarımını bloke eder. Mutajenik ve kanserojenik etkisi olan Etidyum bromürün kullanımına çok dikkat edilmelidir ve kesinlikle agoroz jele doğrudan temas edilmemelidir. EtBr içeren agoroz jellere temas daima eldiven giyilmelidir. Biyomolekülleri görüntülemek için alternatif boyalar mevcuttur; fakat EtBr, hassasiyeti ve ucuz maliyeti nedeniyle laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaya devam etmektedir (Armstrong., ve ark 2008).

DNA ve RNA negatif yüklüdür ve katotdan (negatif elektrottan) anota (pozitif elektrota) doğru yürür. Jel cihazındaki elektrotların güç kaynağındaki doğru yuvalara takılması çok önemlidir. DNA yüklenen kuyulara katot (siyah

uçlar), anottan (kırmızı uçlar) daha yakın olmalıdır (Lee., ve ark 2012).



Şekil 12: Jel elekroforez

Agaroz jel elektroforezi aşamaları;

1. %1'lik agaroz jel için; 1 gr agaroz tartın.

2. 100 ml 1xTAE tamponu ekleyin ve karıştırarak mikrodalga fırında ısıtın.

NOT: Bu aşamada agarozun iyi karışması, köpürmeden erimesi için aralıklarla fırından çıkarılan şişe karıştırılmalıdır.

3. Eriyen agaroz biraz soğutulduktan sonra (agarozun tezgahta veya 65 °C'lik su banyosunda inkübe edilerek soğumasını bekleyin) 0.5 µg/ml EtBr solüsyonu ekleyin ve karışımı önceden hazırlanan jelin dökülecegi tepsi (gel tray) üzerine

dökün.

4. Jel tarağını yerleştirin ve 30 dk soğumaya bırakın.

5. Bu aşamada 1X TAE tampon hazırlayın ve jel donduktan sonra yatay agaroz jel yürütme aparatına ilave edin.

6. Örneklerinin her birine 6 µl yükleme tamponundan ekleyin ve yükleyin.

Not: Jel yükleme tampon boyası genellikle 6X konsantrasyonda (0,25% bromfenol mavisi, 0,25% ksilen siyanol, 30% gliserol) oluşmaktadır.

7. Agoroz jelin yüzeyini kaplayacak kadar tampon ekleyin. Jeli hazırlamak için kullanılan tamponla aynı tamponu kullanmak önemlidir.

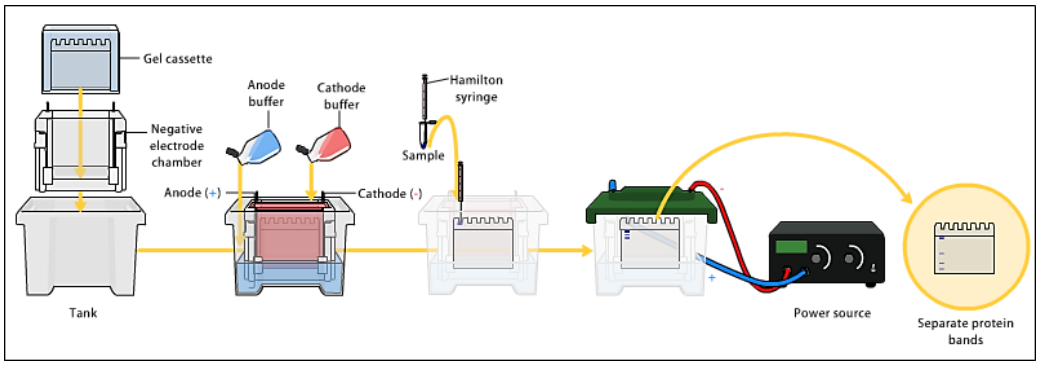
8. Güç kaynağını istenilen voltajda yaklaşık 1 saat yürütülen jeli durdurarak UV ışığı altında translüminatörde görüntüleyin.

2.6. Western Blot (İmmüno Blot)

Western blot (WB), Towbin ve arkadaşları tarafından 1979'da bulunan ve hala günümüzde immünogenetik, moleküler biyoloji, tıbbı biyoloji ve genetik dallarında sıklıkla kullanılan spesifik proteinlerin immün tespiti ve kantitatif miktarını belirlemek için kullanılan bir tekniktir (Taylor ve ark.,2014). WB, hücre veya dokuda spesifik protein izoformlarının, proteinin varlığının tespiti veya artan/azalan ifade seviyesinin belirlenmesinde antikor/antijen etkileşimiyle ortaya koyan metottur. Böylece genetik, enfeksiyöz, otoimmün, romatizmal ve onkolojik hastalıkların tanı ve teşhisinden sorumlu proteinler belirlenmiş olur (Polly ve ark.,2014).

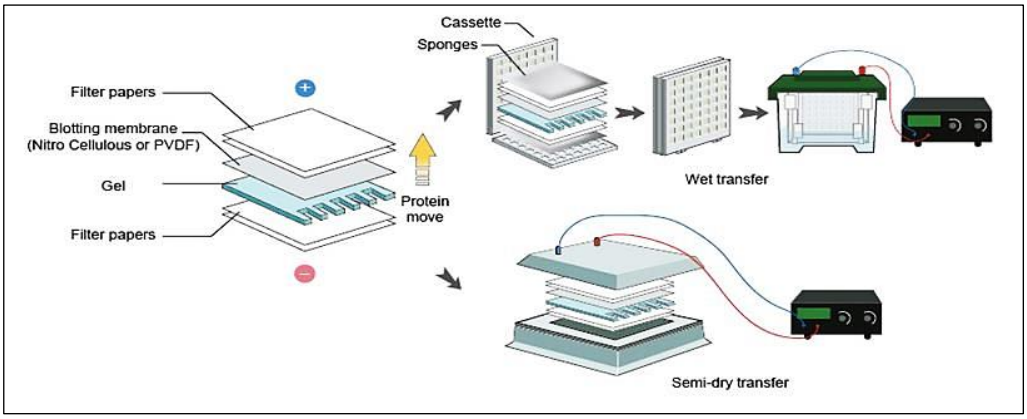
Western blot tekniği aşamaları;

1. Hücre veya dokudan elde edilen protein homojenatındaki proteinlerin, SDS-PAGE jel eletroforezi ile molekül ağırlığıyla orantılı olarak, negatif kutuptan (katot) pozitif kutba (anot) doğru göç ettirilerek ayrılması



Şekil 13: SDS-PAGE basamağı

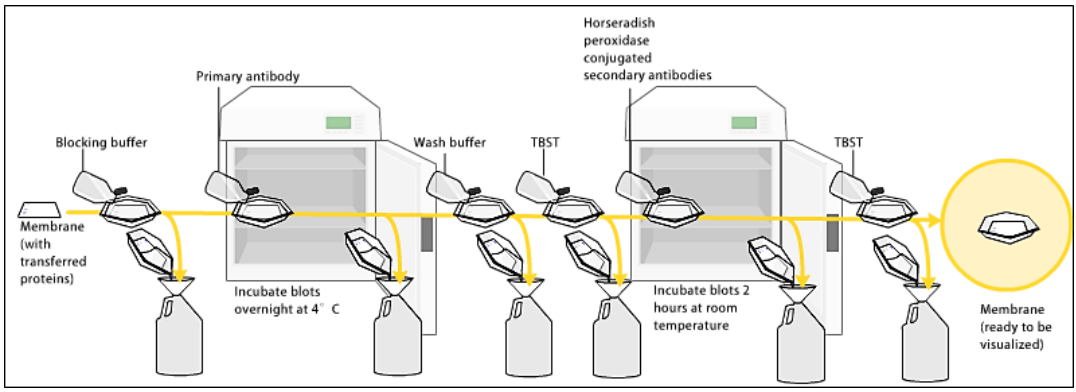
2. SDS jelinde molekül ağırlıklarına göre ayrılmış proteinlerin PVDF veya nitroselüloz membrana transferi olan blotlama basamağı



Şekil 14: Blotlama basamağı

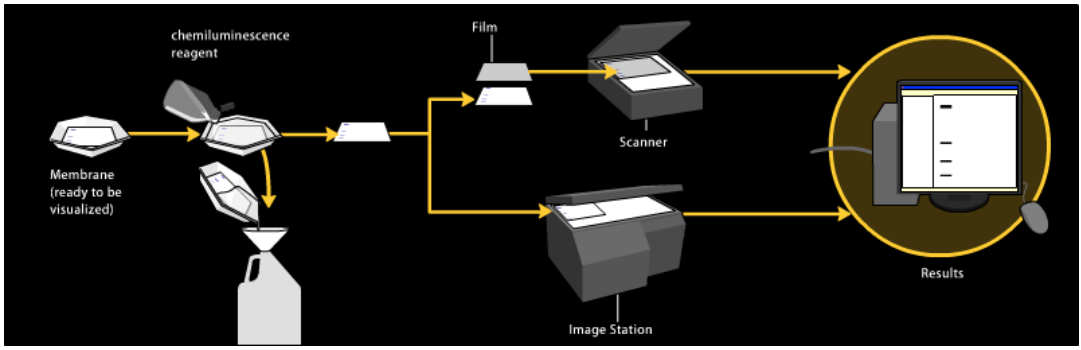
3. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için PVDF membranda blotlama sonrası protein bağlanmayan bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması olan bloklama basamağı

4. Spesifik antikorlarla (primer ve sekonder) inkübasyon basamağı



Şekil 15: Antikorla inkübasyon basamağı

5. Proteinlerin X-ray film veya Imaging System cihazı ile görüntülenme basamağı (Altun, 2018).



Şekil 16: Görüntüleme basamağı

Protein izolasyonu

- Western blot deneylerinde kullanılmak üzere kültüre edilen hücreler buz üzerine alınır ve kendi ortamları içinde kazıyıcı yardımıyla falcon tüplere toplanılır.
- 1000 rpm 5 dk +4ºC'de santrifüj edilerek ortam uzaklaştırılır ve daha sonra hücreler 5 ml soğuk PBS ile süspanse edilerek tekrar santrifüjlenir ardından da süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücre pelleti hacmine göre RIPA modified buffer eklenerek hücreler süspanse edilir ve buz üzerinde 45 dk inkübe edilir.
- Hücre lizatına %30 güçle, %50 aralıkla 20 sn sonikasyon yapılır ve daha sonra 12.000g'de +4 ºC'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni tüpe alınır.
- Elde edilen protein lizatı ileride kullanılmak üzere -86ºC'ye kaldırılır (Altun., 2023).

Protein miktarının belirlenmesi

- Elde edilen lizatlardaki protein miktarı ölçümü BCA protein kiti kullanılarak yapılır.
- BCA çalışma reaktifi; her numune ve kör başına 75 µl QA, 75 µl QB ve 3 µl QC olacak şekilde toplam karışım olarak hazırlanır.
- Eppendorf tüplere 149 µl RIPA modified tamponu ve 1 µl protein lizatı eklenir.
- Her numune için 150 µl hazırlanan BCA çalışma reaktifi eklenir. Eppendorf tüpler vortekslenip kısa santrifüjden sonra 60ºC'de ısıtıcı blokta 1 saat inkübe edilir.
- Numunelerin spektrofotometrede 562 nm'de absorbansları ölçülür ve absorbans değerleri protein standart eğrisine göre hesaplanarak protein miktarları µg/µl olarak belirlenir.

- Protein konsantrasyonu aşağıdaki absorbans okuma fonksiyonuna göre ölçülür (Altun., 2023).

Protein konsantrasyon (µg/µl) = (Absorbans (562)/0.014) X 150 /1000)

2.6.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez) yüklü molekülleri elektrik alan varlığında moleküler kütlelerine göre ayıran analitik bir metottur. SDS anyonik bir denatürasyon deterjandır ve polipeptit iskeletin etrafını sararak proteinleri (-) yükler. Böylece elektriksel alanda proteinlerin (+) kutba doğru yürümesini sağlar. Poliakrilamid jeller iki bileşiğin polimerizasyonu (akrilamid ve N,N-metilen-bis- akrilamid/Bis) ile meydana gelirler ve farklı büyüklüklerde boşluklar yaratarak proteinlerin boyutlarına göre ayrılmalarını sağlarlar. SDS ayırma jeli ve yükleme (depolama) jeli olarak iki kısımdan oluşur. Deneyin amacına göre hangi yüzdelik jeli hazırlamamız gerektiği belirlendikten sonra aşağıdaki çizelgelere göre jel hazırlanır (Altun., 2023).

Protein Boyu (kDa)	Jel Yüzdesi (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12,5
15-100	10
25-200	8

Çizelge 1: SDS jel elektroforezi için kullanılacak ayırma jeli değerleri

Ayırma jeli (10 ml)	% 6	% 8	% 10	% 12	% 15
dH2O (ml)	5.4	4.7	4.1	3.4	2.4
% 30 akrilamid karışımı (ml)	2.0	2.7	3.3	4	5
4X ayırma jeli tamponu (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
% 10 APS (ml)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED (ml)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Çizelge 2: SDS jel elektroforezi için kullanılacak yükleme (depolama) jeli değerleri

Yükleme jeli	10 ml	5 ml	2.5 ml
dH2O (ml)	5.7	2.85	1.425
% 30 akrilamid karışımı (ml)	1.7	0.85	0.425
4x depolama jel tamponu (ml)	2.5	1.25	0.625
% 10 APS (ml)	0.1	0.05	0.025
TEMED (ml)	0.010	0.005	0.005

- Jel dökme aparatları hazır hale getirildi ve kullanılacak camlar sırasıyla su-etanol-izopropanol ile silinir.
- Proteinin büyüklüğüne göre uygun yüzdede bir ayırma jeli hazırlanarak dökülür ve düzgün bir şekilde donabilmesi için üzerine izopropanol eklenir. Ardından jel donduktan sonra izopropanol uzaklaştırılır ve yükleme jeli dökülerek taraklar yerleştirilir.

- Protein lizatları her örnekten 100 µg miktarlarına karşılık gelen hacimlerde tüplere koyulur ve su ile eşit hacime tamamlanır.
- Kullanılacak hacimde %10 oranında β-merkaptoetanol içeren 4x yükleme tamponu hazırlanır ve protein lizat örneklerinin üzerine eklenir.
- Hazırlan protein örnekleri 95ºC'de 5 dakika denatüre edilir ve ardından örnekler buz üzerinde 5 dakika bekletilir.
- Tamamen donan jel içinde yürütme tamponu bulunan yürütme aparatına yerleştirilir ve tarak dikkatlice kuyucuklardan çıkarılır.
- Protein örnekleri jele yüklemeden önce kısa santrifüj yapılır. Kuyucuklara protein örnekleri ve protein markeri (4 µl) yüklenir ve daha sonra jel 80 voltta 3-4 saat yürütülür (Altun., 2023).

Membrana Transfer

- SDS-PAGE ile protein ayrımı tamamlandıktan sonra proteinler jelden membrana elektroforetik yöntemle transfer edilir.
- Bu işlemde hidrofobik bir yapıya sahip PVDF membran kullanılır ve uygun büyüklükte kesilen membran 5 dakika metanol içinde bekletilir
- Kullanılacak olan whatman kâğıdı 5 dakika soğuk transfer tamponu ile ıslatılır.
- Membran ve jel pozitif elektrodun arasına yerleştirilir. Membran ile jelin her iki yanına sırasıyla transfer tamponunda ıslatılmış olan whatman kâğıtları ve süngerler yerleştirilir.
- Aparatlar transfer tankına yerleştirilir ve aparatın içerisine transfer tamponu dökülür. Aparatın kenarına soğutucu blok yerleştirildikten sonra 4°C'de 90 mA'de gece boyu transfer işlemi gerçekleştirilir.
- Eğer Semidry Blotter cihazı kullanılacaksa sıra ile 1 parça blot kağıdı,

PVDF membran, jel, 1 parça blot kağıdı konulur. 25 Volt 2,5 Amper 8 dakika süreyle blotlama işlemi gerçekleştirilir (Altun., 2023).

Bloklama ve Antikor İnkübasyonu

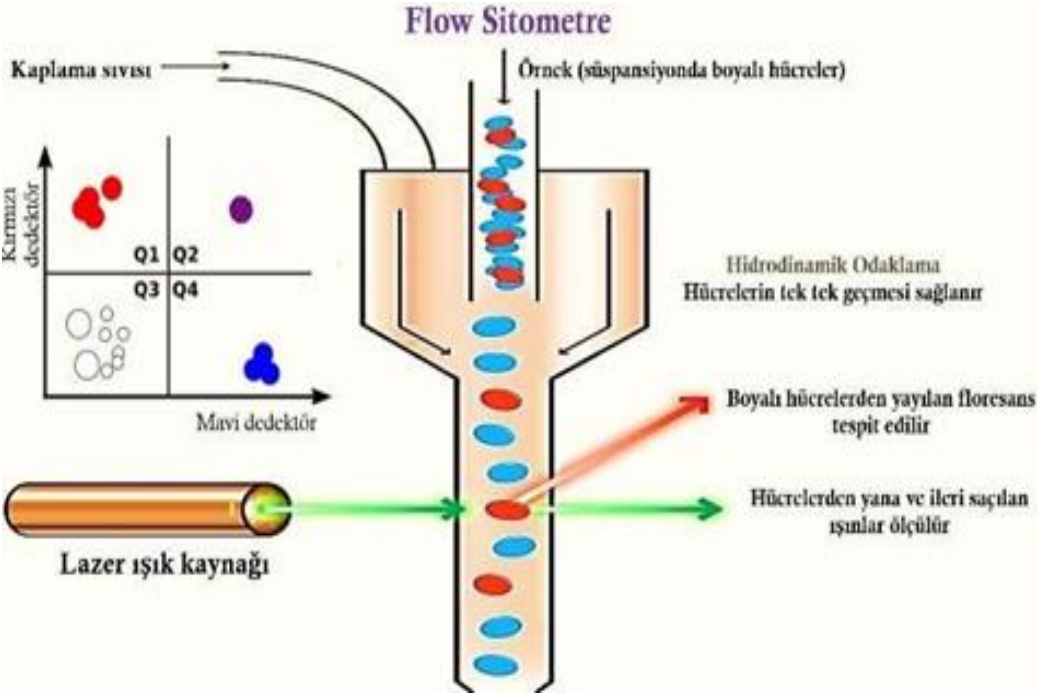
- Transfer işleminden sonra jelde sabitlenen proteinlerin görüntülenmesi için, jel Coomassie Brilliant Blue R-250 (Coomassie Boyası) ile yaklaşık 15 dakika inkübe edilir ve daha sonra destaining solüsyona alınarak bantlar görüntülenir.
- Membran ise TBS-T içinde 5 dakika yıkanır ve nonspesifik antikorların bağlanmasını engellemek amacıyla %5 süt tozu içeren TBS-T içinde 1 saat bloklanır.
- Membran TBS-T ile 5 saniye yıkandıktan sonra uygun konsantrasyonda % 0,5 süt tozu içeren TBS-T içinde hazırlanan primer antikorla 1 saat oda sıcaklığında veya gece boyu 4°C'de inkübe edilir.
- Primer antikor inkübasyonu bittikten sonra membran bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak amacıyla TBS-T ile bir defa 15 dakika ve daha sonra üç defa 5 dakika olmak üzere 4 defa yıkanır.
- Membrana %0.5 süt tozu içeren TBS-T'de uygun konsantrasyonda hazırlanan HRP bağlı fare veya tavşan sekonder antikor ilave edilir ve 1 saat inkübe edilir.
- Membran TBS-T ile bir defa 15 dakika ve daha sonra üç defa 5 dakika olmak üzere 4 defa yıkanır.
- Yıkama işlemi bittikten sonra membran bir kemilüminesans substratı olan ECL Reagent kiti solüsyonu ile karanlık ortamda işleme sokulur ve 4 dk bekletilir.
- Membran iki asetat kağıdı arasına yerleştirildikten sonra kasetin içine konulur.

- Membran üzerine X-ray film konularak farklı sürelerde pozlama gerçekleştirilir.
- Kaset içerisinden alınan film önce 1:4 oranında seyreltilmiş developer solüsyonunda 2 dakika ve daha sonra fikser solüsyonunda da 2 dakika çalkalanarak bantların film üzerinde görüntülenmesi sağlanır (Altun., 2023).
- Eğer ChemiDoc™ Touch Imaging System cihazı varsa membrana ECL Reagent damlatılarak kemilüminesans görüntüsü elde edilir (Altun., 2018).

2.7. Flow Sitometri (Akan Hücre Ölçer, Akım Sitometri)

Tıbbı Biyoloji ve Genetik laboratuvarında tanı ve teşhis amaçlı sıklıkla kullanılan yöntemdir. Bu teknik saniyede binlerce partikül sayımı yapan hızlı ve duyarlı tekniktir. Ayrıca son 30 yılda immünoloji, moleküler biyoloji bakteriyoloji, viroloji, kanser biyolojisi ve enfeksiyon hastalıkları alanında ciddi kullanım alanı olan tekniktir. Akış sitometrisi hücre (ölü ve canlı) sayımı, hücre morfolojisi ve işlevini analizi, hücre döngüsünün incelenmesi, immünfenotipleme, mikroorganizmaların tespiti, protein yapısı, ilaç alım ölçümleri, nükleik asit içeriği ve genom boyutunun ölçülmesine olanak tanır. İncelenmek istenen numune örneği (hücre, partikül vs) sıvı süspansiyon halinde akış sitometresi cihazına enjekte edilir. Numunenin boyut ve granülarite gibi birçok fiziksel özelliği bu cihazda ölçülmektedir. Akış sitometrisinde analizin gerçekleşebilmesi için floresan reaktifler (floresan konjuge antikorlar, nükleik asit bağlayıcı boyalar, canlılık boyaları, iyon indikatör boyalar ve floresan ifade proteinleri) kullanılır (Adan ve ark., 2017). Akış sitometresi cihazında lazer kaynağı bölmesi bulunmaktadır ve numene bu

bölmeden geçirilerek ışık emilmesi sonucunda uygun dalga boyunda floresan sinyal alınır. En son aşamada ise alınan bu sinyaller analiz edilir (McKinnon .,2018).



Şekil 17: Flow sitometri çalışma prensibi

Flow sitometri analizi aşamaları;

1. Fiksasyon

- Hücre kültüründen toplanan hücreler 1200 rpm (290g)'de 5 dk santrifüj edildikten ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 5 ml PBS ile süspanse edilir (Bu aşama 2 kez tekrar edilir).
- Hücre süspansiyonu vortekste karışırken üzerine 4 ml soğuk saf etanol damlatılarak eklenir ve hücreler fikse edilir. Örnekler en az 1 gece -20°C'de saklanır (Altun., 2023).

2. Antikor ile işaretleme

- Etanol ile fikse edilen hücreler +4ºC'de 1200 rpm (290g)'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürülür ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 5 ml PBS içinde süspanse edilir.
- Hücreler tekrar 1200 rpm (290g)'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürülür ve süpernatant uzaklaştırılır.
- 1 ml %0.1 Triton X-100 içeren PBS ile süspanse edildikten sonra karıştırıcıya yerleştirilerek oda sıcaklığında 5 dk geçirgenleşmeleri sağlanır.
- 2000rpm (300g) 4°C'de 10dk santrifüj yapıldı, süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücreler 1ml %1BSA'lı PBS ile süspanse edilir ve 5 dk karıştırıcı üzerinde inkübe edilerek bloklama yapılır.
- 2000rpm (300g) 4°C'de 10dk santrifüj yapıldı, süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücreler primer antikoru içeren 200µl %1BSA'lı PBS solüsyonu ile süspanse edilir ve karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir.

- Hücreler 1ml PBS ile 2 defa yıkanır.
- 2000rpm (300g) 4°C'de 10dk santrifüj yapılır ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücreler sekonder antikoru içeren 200µl %1BSA'lı PBS solüsyonu ile süspanse edilir ve karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilir.
- Hücreler 1ml PBS ile 2 defa yıkanır.
- 2000rpm (300g) 4°C'de 10dk santrifüj yapılır, süpernatant uzaklaştırılır. Hücreler 500µl %0,1 Triton X-100 ile süspanse edilir (E. Tepedelen., 2012).

3. Hücre döngüsü analizi Propidium İyodür (PI) boyaması

Propidium İyodür hücre zar geçirgen değildir ve DNA/RNA'yı boyayan floresan maddedir. Hücre döngüsü ilerlemesini ve DNA içeriğini değerlendirmek için kullanılır.

Floresan boya olduğu için hücre döngüsünün ana fazları olan G0/G1, S ve G2/M fazları arasında floresan yoğunluğuna göre ayrım yapar. En düşük floresan yoğunluğu G0/G1, en yüksek ise S ve G2/M fazlarında görülür (Pozarowski ve ark., 2004). PI boyası aynı zamanda RNA'ya da bağlanacağı için ortamdan RNA'nın uzaklaştırılması gerekir ve protokol aşamasında RNase işlemi kesinlikle yapılmalıdır.

Antikor ile işaretleme prosedürüyle ilk üç aşamaya kadar aynıdır. %0.1 Triton X-100 içeren PBS ile süspanse edildikten sonra;

- Hücreler 2000 rpm (300 g)'de santrifüj edilerek çöktürülür ve süpernatant atıldıktan sonra hücreler son konsantrasyon olarak 20 µg/ml RNase içeren 300 µl PBS içinde süspanse edilerek 37ºC'de 30 dk inkübe edilir.

- Hücrelerin içinde bulunduğu RNAse içeren PBS solüsyonuna son konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde PI eklenilerek 15 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilir.

- En geç 2 saat içerisinde akış sitometrisinde okumalar yapılır.

- Hücre popülasyonları, ModFit LT yazılım programında analiz edilir (Altun., 2023).

4. Apoptoz analizi Annexin V-FITC boyama

Apoptozis indükleyici kimyasal inhibitörlerle indüklenmiş hücrelerde apoptoz ve nekroz oranını ölçmek için PI ve Annexin V boyama işlemine tabi tutulur. Annexin V, hücre zarının iç yüzeyinde yer alan fosfatidilserine karşı yüksek afinitesi vardır. Erken apoptotik hücrelerde fosfatidilserin eksternalizasyon (sitoplazmik yüzünden hücre yüzeyine taşınması) olur ve annexin V bu hücrelere bağlanarak apoptoz tespit edilir.

Propidium İyodür sağlam ve erken apoptotik hücreleri boyamaz (Rieger ve ark.,2011).

Hücre zar geçirgen olmayan Propidium İyodür, hücre/nükleer zarların bütünlüğü bozulan geç apoptotik ve nekrotik hücreleri boyar (Lakshmanan ve ark., 2013).

- Hücreler PBS ile yıkanır ve 1X bağlayıcı tamponda (deiyonize su kullanılarak seyreltilmiş) tekrar süspanse edilir. NOT: 1 ml bağlama tamponuna 1 X 10^6 hücre eklenir.

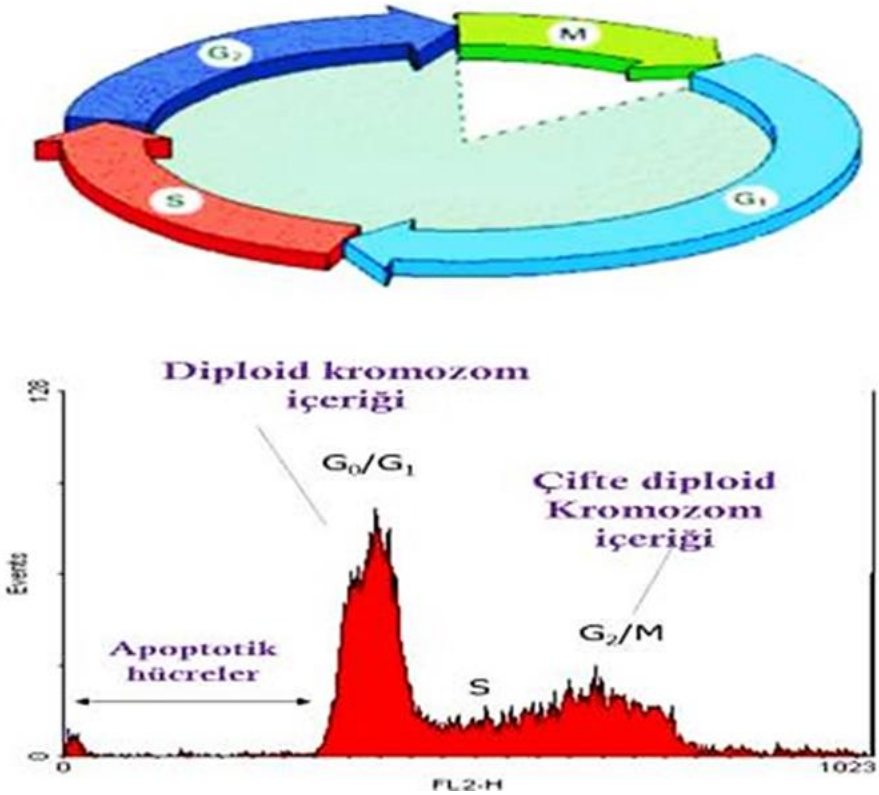
- 100 µl hücreler bir temiz eppendorf tüpüne aktarılır.

- Vorteksleme yapılmadan 2µl FITC Annexin V solüsyonu ve 2 µl PI solüsyonu eklenir.

- Oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edilir

- 4X (400 µl) bağlama tamponu hücrelere eklenir ve akış sitometrisinde analiz edilir.

- Ayrıca kontrol amaçlı olarak hiç boyanmamış, yalnızca Annexin V ve yalnızca PI ile boyanmış hücrelerde akış sitometrisinde analiz edilir (Javed., 2022).



Şekil 18: Flow sitometriyle hücre döngüsünün incelenmesi

KAYNAKÇA

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. Critical reviews in biotechnology, 37(2), 163-176.

Altun, S., 2018, Demirin Fare Kalp Dokusundaki Tiyoredoksin Sistem Üzerine Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Çalışılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 118 s

Altun, S., 2023, SH-SY5Y (Nöroblastom) Hücrelerinde HN1'in Hücre Döngüsünün Düzenlenmesine Katkısı, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 116s

Armstrong, J. A., & Schulz, J. R. (2008). Agarose gel electrophoresis. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, (1), 7-2.Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. Journal of investigative dermatology, 133(3), 1-4.

Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., ... & Simione, F. (2017). Best practices in cell culture: an overview. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 53(8), 669-672.

Berns, K. I., Bond, E. C., Manning, F. J., & Resource Sharing in Biomedical Research. (1996). The american type culture collection. Resource Sharing in Biomedical Research. Washington DC: National Academies Press. Journal of Data and Information Science.

Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence staining. Current protocols in cell biology, 69(1), 4-3.

DeQuach, J. A., Mezzano, V., Miglani, A., Lange, S., Keller, G. M., Sheikh, F., & Christman, K. L. (2010). Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. PloS one, 5(9), e13039.

E. Tepedelen., 2012, DNA Hasarı ve Onarımında NKX3.1'in Rolü, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 202s

Flores Villavicencio, L. L., Cruz-Jiménez, G., Barbosa-Sabanero, G., Kornhauser-Araujo, C., Mendoza-Garrido, M. E., de la Rosa, G., & Sabanero-López, M. (2014). Human lung cancer cell line A-549 ATCC is differentially affected by supranutritional organic and inorganic selenium. Bioinorganic chemistry and applications, 2014(1), 923834.

Gelehrter, T. D., Collins, F. S., & Ginsburg, D. (1998). Principles of medical genetics. Lippincott Williams & Wilkins.

Goodman, S. R. (Ed.). (2007). Medical cell biology. Academic Press.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (2012). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press.

Javed, A.,2022, Investıgatıon of The Effects Of Centrosome Defects on the Development of Prostate Cancer, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 181s

Johansson, B. G. (1972). Agarose gel electrophoresis. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 29(sup124), 7-19.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. Molecular aspects of medicine, 27(2-3), 95-125.

Lakshmanan, I., & Batra, S. K. (2013). Protocol for apoptosis assay by flow cytometry using annexin V staining method. Bio-protocol, 3(6), e374-e374.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Journal of visualized experiments: JoVE, (62), 3923.

Mabrouk, R., Gotkiewicz, M., Rauramaa, T., & Tanila, H. (2022). DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) stains compact amyloid plaques. Journal of Alzheimer's Disease, 88(3), 949-955.

McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. Current protocols in immunology, 120(1), 5-1.

Mehra, N. K. (2010). The HLA complex in biology and medicine: a resource book. Boydell & Brewer Ltd.

Polly, P., Marcus, N., Maguire, D., Belinson, Z., & Velan, G. M. (2014). Evaluation of an adaptive virtual laboratory environment using Western Blotting for diagnosis of disease. BMC medical education, 14(1), 222.

Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. In Checkpoint Controls and Cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols (pp. 301-311). Totowa, NJ: Humana Press.

Raab, J., Fink, B., & Bauer, M. (2023). Appearance of ghost bands in gel electrophoresis depending on agarose concentration. Electrophoresis, 44(15-16), 1206-1209.

Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase chain reaction (PCR): a short review. Anwer Khan Modern Medical College Journal, 4(1), 30-36.

Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. Journal of visualized experiments: JoVE, (50), 2597.

Robertson, J. M., & Walsh-Weller, J. (1998). An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. In Forensic DNA profiling protocols (pp. 121-154). Totowa, NJ: Humana Press.

Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. Analytical biochemistry, 454, 44-52.

Saydé, T., El Hamoui, O., Alies, B., Gaudin, K., Lespes, G., & Battu, S. (2021). Biomaterials for three-dimensional cell culture: From applications in oncology to nanotechnology. Nanomaterials, 11(2), 481.

Suzuki, N., Yoshida, A., & Nakano, Y. (2005). Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. Clinical medicine & research, 3(3), 176-185.

Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The design of a quantitative western blot experiment. BioMed research international, 2014(1), 361590.

Tobias, E. S., Connor, M., & Ferguson-Smith, M. (2011). Essential medical genetics. John Wiley & Sons.

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK LABORATUVARINDA KULLANILAN
TEMEL MOLEKÜLER TEKNİKLER

ISBN: 978-6-25575-308-3
9 786255 753083