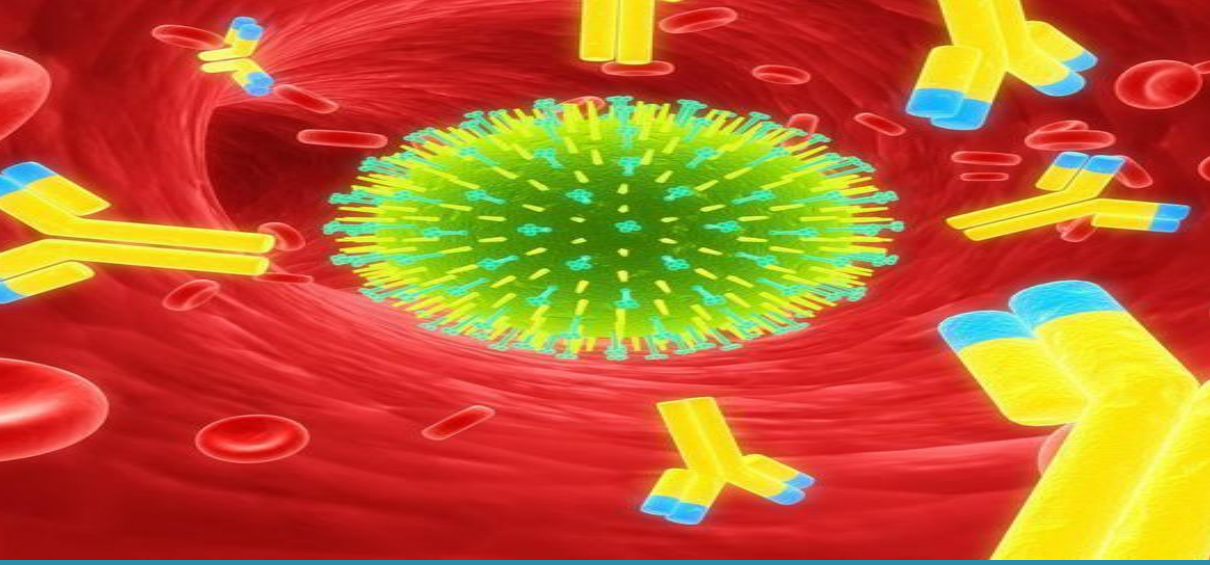


**İMMÜNOLOJİDE TEMEL  
MOLEKÜLER  
ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ**



**Dr. Öğr. Üyesi Duygu KIRKIK**

**ISBN: 978-625-5923-26-4**

**Ankara -2025**

# İMMÜNOLOJİDE TEMEL MOLEKÜLER ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

**YAZAR**

Dr. Öğr. Üyesi Duygu KIRKIK

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, İmmünoloji  
ABD, İstanbul, Türkiye.  
duygu.kirkik@sbu.edu.tr  
ORCID ID: 0000-0003-1417-6915

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.15229592>



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](mailto:ubakyayinevi@gmail.com)

[www.ubakyayinevi.org](http://www.ubakyayinevi.org)

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.  
UBAK Publishing House – 2025©

**ISBN: 978-625-5923-26-4**

April / 2025

Ankara / Turkey

## ÖNSÖZ

İmmünoloji bilimi, son yıllarda hem temel bilimler hem de klinik uygulamalar açısından baş döndürücü bir hızla ilerlemektedir. Bu ilerleme, bağışıklık sisteminin daha derinlemesine anlaşılmasını sağlamakla kalmamış, aynı zamanda tanı ve tedavi süreçlerine de doğrudan yansımıştır. "İmmünolojide Araştırma Yöntemleri" adlı bu eser, alanın temel kavramlarını araştırma teknikleriyle birleştiren özgün bir kaynak olmayı hedeflemektedir.

Bu kitabın temel amacı hem genç araştırmacılara hem de deneyimli bilim insanlarına, immünoloji alanındaki güncel araştırma yöntemleri hakkında kapsamlı, güvenilir ve uygulanabilir bilgiler sunmaktır. Hücresel ve moleküler düzeydeki analiz tekniklerinden hayvan modellerine, biyoinformatikten akım sitometrisine kadar birçok farklı yöntemin detaylı bir şekilde ele alındığı bu kitap, disiplinler arası bir yaklaşımla hazırlanmıştır.

Bu eserin, araştırmalarınıza rehberlik etmesi ve yeni bilimsel keşiflere ilham vermesini dilerim.

16/04/2025

**Dr. Öğr. Üyesi Duygu KIRKIK**



# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iii
GİRİŞ .....	1
1. İMMÜNOLOJİDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERE YAKLAŞIM .....	2
1.1. Örnek ve Örneklem Büyüklüğü .....	2
1.2. Klinik ve Bilimsel Araştırmalarda Örneklem Büyüklüğü .....	7
2. İMMÜNOLOJİK ARAŞTIRMALARDA UYGULANAN TEMEL VE İLERİ TEKNİKLER .....	11
2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	11
2.2. Real Time PCR .....	15
2.3. Reverse Transkriptaz PCR .....	18
2.4. İmmünoloji Araştırmalarında DNA Mikrodizileri .....	19
2.5. Yeni Nesil Dizileme .....	21
3. İMMÜNOLOJİDE PROTEİNLERİN TESPİTİ .....	23
3.1. ELISA .....	23
3.1.1. ELISA Bileşenleri ve Temel Prensipler .....	25
3.1.2. Doğrudan ELISA (Direct ELISA) .....	27
3.1.3. Dolaylı ELISA (Indirect ELISA) .....	28
3.1.4. Sandviç ELISA .....	29
3.1.5. Rekabetçi ELISA .....	31

3.1.6.	Tanı Testlerinde ELISA'nın Kullanımı .....	32
3.1.7.	ELISA'nın Çalışmalarındaki Önemi .....	33
3.2.	Western Blot .....	35
3.2.1.	Proteinlerin Eşit Yüklenmesi ve Numune Hazırlığı ...	35
3.2.2.	SDS-PAGE ile Proteinlerin Ayrılması .....	36
3.2.3.	Elektroforetik Transfer (Blotlama).....	37
3.2.4.	Antikor Problama ve Tespit .....	38
3.2.5.	Western Blotta Sınırlamalar ve Uygulamalar .....	38
4.	İMMÜNOLOJİDE İMMÜNOFLORESAN BOYAMA ...	40
4.1.	Fiksasyon ve Numune Hazırlığı .....	41
4.2.	Parafin Gömme-Kesit Alma-Deparanifizasyon.....	42
4.3.	Antijen Geri Kazanımı (Retrieval) .....	42
4.4.	İmmünofloresan Yöntem Türleri: Doğrudan ve Dolaylı.....	43
4.5.	Bloklama, Arka Planın Azaltılması, Florofor Seçimi ve Görüntüleme .....	43
4.6.	Sinyal Amplifikasyonu ve Multiplex Uygulamalar .....	44
5.	İMMUNOHİSTOKİMYA.....	44
5.1.	İmmünohistokimya Protokolü ve Antijen Geri Kazanımı .....	45
5.2.	Antikor Uygulaması ve Etiketleme Yöntemleri .....	46
5.3.	Tespit Sistemleri ve Sinyal Amplifikasyonu .....	47
5.4.	Arka Plan Boyaması ve Engelleme Stratejileri .....	47

5.5. İmmünohistokimya ile İmmünofloresandaki Farklılıklar .....	48
6. AKIŞ SİTOMETRİSİ .....	49
6.1. Geleneksel Akış Sitometresi .....	51
6.2. Akustik Odalama Sitometrisi .....	52
6.3. Hücre Ayırıcı Sitometre (Cell Sorter) .....	52
6.4. Görüntüleme Akış Sitometrisi .....	52
6.5. Diğer Akış Sitometreleri .....	53
6.6. Akış Sitometrisinde Kullanılan Reaktifler ve Uygulama Alanları .....	54
6.7. Akış Sitometresinde İmmünojenik Uygulamalar .....	56
7. İMMÜNOLOJİDE ELİSPOT KULLANIMI .....	57
8. İmmünojenide Hemaglutinasyon İnhibisyonu (HI) Testi ...	59
9. İmmünojenide Rekombinant DNA Teknolojisi .....	61
10. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME .....	64
11. KAYNAKÇA .....	66



# İMMÜNOLJİDE MOLEKÜLER ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Dr. Duygu KIRKIK

## GİRİŞ

Virüsler, bakteriler, mantarlar ve parazitler dahil olmak üzere çok çeşitli enfeksiyöz ajanlar, konak organizmaları enfekte ederek hastalığa yol açabilir. Ancak sağlıklı bireylerde bu enfeksiyonlar çoğu zaman geçici olup kalıcı hasara neden olmadan atlatılır. Bu durumun temel nedeni, enfeksiyon etkenlerine karşı etkili bir savunma mekanizması oluşturan bağışıklık sistemidir (Medzhitov ve Iwasaki, 2024).

İmmünoloji, bağışıklık sisteminin yapısını, işlevlerini ve hastalıklarla ilişkisini inceleyen bilim dalıdır. Bu kitapta, bağışıklık sisteminin temel bileşenleri ve işleyişi ile araştırma yöntemlerinin immünolojide nasıl uygulandığı ele alınacaktır. İmmünolojik deneyler, sadece teknik beceri değil; aynı zamanda doğru planlama, uygun istatistiksel yaklaşım ve etik kurallara uygunluk da gerektirir. Bu nedenle kitap yalnızca laboratuvar tekniklerini değil, aynı zamanda bilimsel araştırma sürecinin bütünsel doğasını da göz önünde bulunduracak şekilde yapılandırılmıştır.

Bilimsel düşüncenin ve eleştirel analizin geliştiği bu çağda, immünolojik araştırmalarda kullanılan yöntemlerin sistematik bir şekilde öğrenilmesi ve uygulanması, alanın ilerlemesi açısından büyük

önem taşımaktadır. Bu kitap, sizleri bu yolculukta desteklemeyi ve rehberlik etmeyi hedeflemektedir.

## **1. İMMÜNOLOJİDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERE YAKLAŞIM**

### **1.1. Örnek ve Örneklem Büyüklüğü**

İmmünolojik araştırmaların temel taşlarından biri uygun biyolojik örneğe ulaşmaktır. Örneğin, yalnızca 8 ml'lik bir kan örneğinden tüm kan hücrelerinden DNA ve/veya RNA elde etmek mümkündür (Yamagata vd., 2021). Alternatif olarak, tam kan örneklerinden periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) ve granülositler ayrıştırılarak belirli hücre popülasyonlarından nükleik asit izolasyonu yapılabilir. Kan örneğine erişimin mümkün olmadığı durumlarda, yanak içi sürüntü (bukkal swab), doku biyopsisi, tükürük veya fibroblast gibi hücre kültürlerinden de sınırlı miktarda DNA izole edilebilir (Bowen ve Remaley, 2014).

Laboratuvar testleri için kan alma işlemi, genellikle özel toplama tüpleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında, testin türüne ve analiz gereksinimlerine göre farklı tüpler tercih edilir. Tüplerin renk kodlu olması, pratiklik sağlamak ve doğru örneklemenin kolayca yapılabilmesi amacıyla tasarlanmıştır. Bu tüplerin her biri farklı bir katkı maddesi içerir ve spesifik testler için kullanılır. Kan örnekleri alındıktan sonra, test öncesinde bu tüplerin uygun şekilde karıştırılması kritik öneme sahiptir.

Kan örneklerinin in-vitro analizleri klinik laboratuvarlarda yapılır. Bu analizler için gerekli olan kan türü; serum veya plazma olabilir.

- **Sarı / Pembe / Mavi – Kan Kültürü Tüpleri**

Bu renkler, genellikle kan kültürü için kullanılan şişeleri temsil eder. İçeriklerinde bulunan sodyum polianetol sülfonat (SPS), antikoagülan olarak görev yapar ve kompleman sisteminin aktivasyonunu engelleyerek mikrobiyolojik kontaminasyonu azaltır. Alım sonrası tüpün 8–10 kez nazıkçe çevrilerek karıştırılması önerilir. Tüp rengi üreticiye göre değişiklik gösterebilir (Palarasah vd., 2010). Örneğin; western çalışmaları, ELISA çalışmalarında sarı tüp kullanılması tercih edilir.

- **Açık Mavi – Sitrat Tüpleri**

Pıhtılaşma testlerinde kullanılır. Antikoagülan olarak %3,2 sodyum sitrat içerir. Tüpler, plazma elde etmek amacıyla birkaç kez dikkatli şekilde karıştırılmalıdır. Yaygın olarak PT, aPTT gibi koagülasyon testlerinde kullanılır (Lima-Oliveira vd., 2013).

- **Kırmızı – Katkısız Tüpler**

Bu tüpler herhangi bir antikoagülan içermez. Kanın tüp yüzeyiyle teması sonucu doğal pıhtılaşma başlar. Kan, santrifüj öncesi 10–15 dakika pıhtılaşmaya bırakılır. Pıhtılaşma süresi bireyden bireye değişmekle birlikte 10–60 dakika arasında olabilir. Bu tüplerden elde edilen sıvı serumdur (Bayot ve Tadi, 2023).

- **Yeşil – Heparinli Tüpler**

İçeriğinde heparin (sodyum, lityum veya amonyum formunda) bulunur. Trombin oluşumunu engelleyerek pıhtılaşmayı önler. Bu tüplerden elde edilen numune plazmadır. Acil biyokimya analizlerinde (stat testler), gaz kromatografisinde sıklıkla tercih edilir (Bayot ve Tadi, 2023). Ayrıca akış sitometrisi yapacak yine yeşil tüp tercih edilebilir.

- **Mor – EDTA Tüpleri**

EDTA (etilen-diamin-tetra-asetik asit) içerir ve kalsiyumu şelatlayarak pıhtılaşmayı engeller. Plazma elde edilir. Bu tüpler, özellikle hematolojik testler için uygundur (örneğin tam kan sayımı, hemoglobin analizi, genetik analiz testleri, DNA izolasyonu, PCR çalışmaları, RT-PCR çalışmaları, yeni nesil dizileme, DNA mikroarray, akış sitometrisi vb. çalışmaları için kullanılabilir) (Bayot ve Tadi, 2023; Banfi vd., 2007).

- **Gri – Glukoz Tüpleri**

Bu tüpler potasyum oksalat ve sodyum florür içerir. Potasyum oksalat pıhtılaşmayı engellerken, sodyum florür glikolizi inhibe ederek glukozun stabil kalmasını sağlar. Özellikle plazma glukozu ve laktat testlerinde kullanılır (Li vd., 2013).

Kan örneklerinin doğrudan dondurulması, hemolize yol açabileceğinden, santrifüj edilmemiş ve serum ya da plazması ayrılmamış tam kanın dondurulması önerilmez. Bu nedenle, analiz öncesinde bekletilecek tam kan örnekleri mutlaka santrifüj edilmeli ve elde edilen serum ya da plazma, ağzı kapalı kaplarda +4 °C’de buzdolabında saklanmalıdır.

Daha uzun süreli saklama gerektiren örnekler için, testin türüne uygun olarak prospektüslerde belirtilen koşullara uyulmalı ve numuneler -20 °C’de, kapalı kaplar içerisinde muhafaza edilmelidir.

Serum veya plazma örnekleri, ideal olarak alındıktan sonra en geç 4 saat içinde çalışılmalıdır. Eğer bu süre içinde analiz yapılamayacaksa, örnekler +4 °C’de, ağzı kapalı şekilde soğuk zincirde saklanmalıdır.

Serum örneklerinin +4 °C’de 12-24 saatten uzun süre bekletilmesi, bazı parametrelerde bozulmalara neden olabilir. Bu nedenle uzun süreli saklama gerektiren durumlarda serumun dondurulması önerilir. Dondurulan serumlar, analiz öncesinde oda sıcaklığına getirilerek çözdürülmeli ve bu şekilde çalışılmalıdır. Serum veya plazma örnekleri hemen çalışılmayacaksa, yani uzun süre saklanacaksa; örnekler sarı ya da mor kapaklı tüplere alınmalı ve 3000 rpm hızında 15 dakika santrifüj edilmelidir. Santrifüj sonrası üstte kalan serum veya plazma kısmı dikkatlice ayrılmalı, 250 mikrolitre olacak şekilde küçük tüplere (1,5 ml’lik ependorf tüplere) bölünmeli ve -80 °C’de saklanmalıdır.

Bu yaygın tüplerin dışında; altın, kaplan, pembe gibi farklı renk kodlarına sahip tüpler de çeşitli testler için kullanılmaktadır. Tüplerin kullanım protokolü ve çekim sırası, kuruma ve ülkeye göre değişkenlik gösterebilir. Antikoagülan içeren tüplerin kanla iyice karıştırılması gereklidir. Genellikle “8” şeklinde ters çevrilerek karıştırılması önerilir. Ancak: aşırı karıştırma, hemolize yol açabilir. Yetersiz karıştırma, küçük pıhtıların oluşmasına neden olabilir (Heireman vd., 2017).

Uygun olmayan örnek toplama işlemleri, yalnızca laboratuvar sonuçlarını değil, aynı zamanda hastanın tanı ve tedavi sürecini de

olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle kan örneklemesinde standardizasyon hem bilimsel doğruluk hem de hasta güvenliği açısından hayati önem taşır (Cornes vd., 2017).

Laboratuvar tüpü ile kan örneği toplama süreci, basit gibi görünse de birçok teknik ve pratik zorluk içerebilir. Bu zorluklar, yalnızca sürecin verimliliğini değil, aynı zamanda analiz sonuçlarının doğruluğunu ve güvenilirliğini de doğrudan etkileyebilir.

- Vacutainer sistemleri, birden fazla tüple örnek alınmasını kolaylaştırır da, bazen kullanılan sistem arızalı veya hasarlı olabilir. Özellikle vakum mekanizmasında bozulma varsa, çoklu tüp toplamak zorlaşır veya imkânsız hale gelir. Bu da işlemin tekrarlanmasına ve hasta konforunun azalmasına neden olabilir.
- Tüplerin kendisinde de üretim veya taşıma kaynaklı hasarlar oluşabilir. Örneğin, tüpün kapağı açıldığında vakumun kaybolması, yeterli miktarda kan örneği alınmasını engeller. Ayrıca bazı tüplerde üretim hatası nedeniyle antikoagülan bulunmayabilir. Bu da test için gereken plazma yerine, yanlışlıkla serum kullanılmasıyla sonuçlanabilir ve testin geçerliliğini zedeler.
- Toplama işlemini gerçekleştiren sağlık personelinin, özellikle flebotomistlerin, tüp renk kodları ve çekim sırası konusunda yeterli eğitime sahip olması gereklidir. Renk kodlamaları, doğru tüp sırasını kolaylaştırmak için geliştirilmiş olsa da, eğitim eksikliği nedeniyle bu protokollere uyulmaması durumunda hatalı örnekleme gerçekleşebilir.

- Tüplerin, örnekleme öncesi, sırası veya sonrasında kontaminasyona maruz kalması, test sonuçlarını doğrudan etkiler. Özellikle kan kültürü tüpleri gibi steriliteye duyarlı testlerde, tüp kapaklarının her türlü kontaminasyondan korunması büyük önem taşır. Ayrıca, bir tüpteki antikoagülanın vacutainer iğnesi aracılığıyla diğer tüpe geçmesi de çapraz kontaminasyona neden olabilir.

## **1.2. Klinik ve Bilimsel Araştırmalarda Örneklem Büyüklüğü**

Araştırmalar genellikle örneklem üzerinde yürütülür; çünkü hedeflenen tüm nüfusu incelemek çoğu zaman pratik ya da mümkün değildir. Örneklemde elde edilen bulguların, hem genel popülasyona hem de gelecekteki benzer durumlara genellenmesi hedeflenir. Bu nedenle, örneklemin temsiliyet niteliği büyük önem taşır. Temsiliyetin sağlanması ise, uygun örnekleme yöntemlerinin dikkatle uygulanmasıyla mümkün olur. Aynı zamanda, örneklemin büyüklüğü de ne eksik ne de fazla olacak şekilde yeterli olmalıdır. Gereğinden büyük bir örneklem, popülasyonu daha iyi temsil ederek daha hassas ve güvenilir sonuçlar sağlayabilir. Ancak belirli bir büyüklükten sonra elde edilen doğruluk artışı oldukça sınırlı kalır ve bu durum, fazladan katılımcı dahil etmek için harcanan zaman, maliyet ve çabanın karşılığını vermez (Andrade, 2020). Dahası, gereksiz yere fazla sayıda katılımcının çalışmaya dahil edilmesi, onlara fazladan yük ve rahatsızlık vermek anlamına gelir ki bu da etik açıdan sakıncalıdır. Öte yandan, gereğinden küçük bir örneklem, araştırmanın temel sorusunu yanıtlamak için yeterli istatistiksel güce sahip olmayabilir. Bu durumda,

istatistiksel olarak anlamlı çıkmayan sonuçlar yalnızca örneklemin yetersizliğinden kaynaklanabilir (Tip II hata – yalancı negatiflik). Böyle bir senaryoda, çalışmaya katılan bireyler üzerinde fiziksel ya da psikolojik rahatsızlık yaratılmış olur; ancak elde edilen bilgi, ne bilimsel anlamda katkı sağlar ne de gelecekteki hastaların yararına olur. Bu da araştırmanın etik değerini zedeler (Andrade, 2020).

Hipotez testine dayalı çalışmalarda örneklem büyüklüğü, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşmak için matematiksel olarak hesaplanır. Geleneksel yaklaşıma göre, hipotez popülasyon için doğruysa, bu durumun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde (%5 anlamlılık düzeyi –  $P < 0,05$ ) tespit edilebilmesi için çalışmanın %80 güç ile planlanması gerekir (Norman vd., 2012).

Bazı araştırmacılar bu gücü %90'a çıkararak daha güçlü sonuçlar elde etmeyi hedeflerken, bazıları da anlamlılık eşiğini 0,05 yerine 0,01 olarak belirler. Ancak bu tür tercihler örneklem büyüklüğünü önemli ölçüde artırdığı için, çalışmayı hem daha pahalı hale getirir hem de uygulanabilirliğini zorlaştırır (Andrade, 2013).

Çoğu araştırmacı, çalışmaya katılan bireylerin bir kısmının takipten çıkması, eksik verilerin oluşması, laboratuvar gereksinimlerini karşılamayan numunelerin alınması gibi durumları göz önünde bulundurarak, hesaplanan örneklem büyüklüğüne genellikle %10 oranında pay ekler. Bu oran, çalışmanın özel koşullarına göre gerekçelendirilebilir şekilde daha fazla da olabilir. Örneklem büyüklüğünü belirlemek için bazı temel varsayımlar yapılması gerekir.



Bunlar arasında; gruplar arasındaki beklenen ortalamalar ve standart sapmalar, olay riskleri, ya da beklenen etki büyüklüğü yer alır.

Örneğin, bir araştırma; tedavi grubunda %60, plasebo grubunda ise %40 yanıt oranı bekliyorsa, bu farkı tespit edecek yeterli güce sahip olacak şekilde örneklem hesaplanmalıdır. Eğer bu tür tahminler yapılamıyorsa, alana özgü küçük çaplı pilot çalışmalar, örneklem tahmini için temel oluşturabilir (Norman vd., 2012).

Çok merkezli çalışmalarda, farklı hasta profilleri, uygulayıcılar, çevresel faktörler ve değerlendirme yöntemleri nedeniyle istatistiksel gürültü (varyasyon) artar. Bu nedenle bu tür çalışmalarda daha büyük örneklemelere ihtiyaç duyulabilir.

Örneklem büyüklüğü hesaplamaları; manuel olarak yapılabileceği gibi, istatistiksel yazılımlar kullanılarak da kolaylıkla gerçekleştirilebilir. İnternette birçok ücretsiz hesaplayıcı mevcuttur. Örneğin, G\*Power adlı program hem ücretsiz olarak indirilebilir hem de kapsamlı örneklem büyüklüğü analizleri için kullanıcı dostu bir arayüz sunar. Bu yazılımın rehber ve eğitim dokümanları da erişime açıktır. Araştırmalarda örneklem büyüklüğü genellikle birincil hipoteze göre belirlenir. Bu bağlamda şu kavramlar birbirinden ayrılmalıdır:

- Birincil sonuç: Örneğin, depresyon şiddetinde azalma
- Birincil sonuç ölçütü: Örneğin, Montgomery–Åsberg Depresyon Ölçeği (MADRS)
- Birincil hipotez: Örneğin, ilacın MADRS puanlarında plaseboya kıyasla daha fazla azalma sağlayacağı varsayımı

Bu hipotez, çalışmanın birincil analizinde test edilir.

Ancak çoğu araştırma yalnızca tek bir hipotez içermez. Örneğin, aynı ilaç depresyon, intihar eğilimi, anksiyete, işlevsellik ve yaşam kalitesi gibi birçok parametre üzerinde değerlendirilebilir. Bu parametrelerin her biri için ideal örneklem büyüklüğü farklıdır. Ancak çalışmada tek bir örneklem kullanıldığından, yalnızca birincil sonuç için yeterli güç sağlanabilir. Bu durumda diğer değişkenler için çalışma ya yetersiz güçte (underpowered) ya da gereğinden fazla güçlü (overpowered) olur. Bu nedenle bu tür sonuçlar, ikincil sonuçlar olarak değerlendirilir ve buna karşılık gelen ikincil hipotezler, yalnızca keşifsel analizler kapsamında ele alınır. Unutulmamalıdır ki, bir çalışmada çok sayıda hipotez aynı anda test edildiğinde, bazı sonuçlar istatistiksel olarak tesadüfen anlamlı çıkabilir (Tip I hata – yalancı pozitiflik) (Andrade, 2019).

Araştırmada birincil hipotezin test edilmesi sonucunda P değeri 0,07 elde edildi. Bu durumda, örneklem büyüklüğünün yetersiz olduğu ve eğer örneklem daha büyük olsaydı istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılabilirdi söylenebilir mi? Hayır. Bu varsayım doğru değildir. Çünkü daha büyük örneklem, popülasyonun gerçek değerine daha yakın sonuçlar verir. Küçük örneklem ise hem popülasyon değerine yakın hem de uzak sonuçlar üretebilir; yani daha yüksek ya da daha düşük etki tahminleri yapabilir. Dolayısıyla örneklem büyüklüğünün artırılması her zaman anlamlı bir sonuç elde edileceği anlamına gelmez. Burada dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta daha vardır: Bir tahmine ilişkin P değeri ne kadar küçük olursa

olsun, bu durum popülasyon değerini değiştirmez. İstatistiksel anlamlılık, örneklemin büyüklüğüne ve varyansına duyarlıdır, ancak temel istatistiksel tahmin (örneğin ortalama fark, oran, korelasyon katsayısı) aynı kalır. Örneğin, bir ilaca ve plaseboya verilen yanıt oranlarının tam olarak eşit olması veya boy uzunluğu ile bir hastalığın başlangıç yaşı arasında hiçbir korelasyon olmaması beklenmez. Bu nedenle, örneklem büyüklüğü yeterince büyük olduğunda, bu tür küçük farklar bile istatistiksel olarak anlamlı hale gelebilir (Kraemer, 2019). Ancak bu durum, her zaman klinik olarak anlamlı olduğu anlamına gelmez. Klinik anlamlılık, tedavi etkinliğinin veya gözlemlenen farkın hasta bakımı açısından gerçekten önemli olup olmadığını değerlendirir. Araştırma sonuçları yorumlanırken, istatistiksel bulguların klinik bağlamda da anlamlı olup olmadığı mutlaka sorgulanmalıdır.

## **2. İMMÜNOLOJİK ARAŞTIRMALARDA UYGULANAN TEMEL VE İLERİ TEKNİKLER**

### **2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), belirli DNA segmentlerini çoğaltmak amacıyla geliştirilen, yüksek hassasiyetli bir nükleik asit amplifikasyon tekniğidir. Bu yöntem, ısıya dayanıklı bir enzim olan Taq polimeraz kullanır; bu enzim, *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen DNA polimeraz I'in termostabil formudur. PCR, ilk kez 1985 yılında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından tanıtılmış ve bu çığır ağıcı çalışmaları nedeniyle Mullis, Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür. O tarihten bu yana PCR, genetik ve moleküler biyoloji

alanında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir (Ramesh vd., 1992; Lorenz, 2012; Ghannam ve Varacallo, 2023).

Bu teknik, bir test tüpü içerisinde çok küçük miktardaki bir DNA dizisine seçici olarak odaklanarak onu milyonlarca kopya haline getirme kapasitesine sahiptir. Bu amplifikasyon, DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatüre edilmesi, primerlerin bağlanması (annealing) ve Taq polimeraz aracılığıyla sentezin gerçekleştiği birkaç döngüden oluşur. Taq polimeraz'ın termal stabilitesi, tekrar eden yüksek sıcaklık döngülerine karşı dayanıklılığı sayesinde, reaksiyon boyunca DNA sentezinin sürekliliğini sağlar. PCR, sahip olduğu yüksek özgüllük ve hassasiyet sayesinde; bakteriyel ve viral enfeksiyonların hızlı tanısında, genetik bozuklukların taranmasında, adli genetik analizlerde ve moleküler düzeyde mutasyonların saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ramesh vd., 1992; Lorenz, 2012; Ghannam ve Varacallo, 2023).

Günümüzde PCR, yalnızca araştırma laboratuvarlarında değil, klinik tanı süreçlerinde de altın standart yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Farklı varyantlarının (RT-PCR, qPCR, digital PCR) geliştirilmesiyle birlikte, bu teknik moleküler biyolojinin temel taşlarından biri hâline gelmiştir.

PCR, çok küçük miktarda DNA örneğiyle başlar ve bu örneğin, belirli bir diziye odaklanarak milyonlarca kopyasının üretilmesini sağlar. Reaksiyon, genellikle bir termal döngüleyici yardımıyla gerçekleştirilen üç temel aşamadan oluşur: denatürasyon, annealing ve uzama extension. Denatürasyon; bu ilk aşamada, çift sarmallı DNA

ısıtılarak (yaklaşık 95°C) iki zincirine ayrılır. Bu sıcaklık, DNA'daki hidrojen bağlarını kırarak molekülü tek sarmallı hale getirir ve primerlerin bağlanabileceği şablon dizileri açığa çıkar. Annealing; DNA, ısıtıldıktan sonra 37–72°C arasında kontrollü bir şekilde soğutulur. Bu, primerlerin hedef DNA üzerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanmasına olanak tanır. Tavlama sıcaklığı genellikle 55–72°C aralığındadır ve kullanılan primerlerin uzunluğu (genellikle 20–25 nükleotid) ile GC içeriğine göre belirlenir. Bu aşamada, primerler DNA'nın 3' ucundaki özgül bölgelerine bağlanarak DNA sentezinin başlaması için gerekli temel yapıyı oluşturur. Extension; annealingten sonra, reaksiyon sıcaklığı genellikle 75–80°C'ye çıkarılır. Bu sıcaklık, Taq polimeraz enzimi için optimum koşulları sağlar. Enzim, primerlerden başlayarak 5' → 3' yönünde yeni DNA zincirlerini sentezler. Böylece her döngüde hedef DNA bölgesi iki katına çıkar. (Green ve Sambrook, 2019; Markham, 1993; Ramesh vd., 1992).

Bu üç adım, bir termal döngüleyici cihaz kullanılarak 30–40 kez tekrarlanır. Her döngüde ürün miktarı üstel olarak artar. Ancak döngü sayısı arttıkça, reaktiflerin tükenmesi, pirofosfat birikimi ve PCR inhibitörlerinin varlığı nedeniyle amplifikasyon verimliliği azalabilir. PCR'ın başarısını olumsuz etkileyebilecek birçok inhibitör mevcuttur. Bunlar arasında en yaygın olanlar:

- Proteinaz K (Taq polimerazı bozabilir)
- Fenol ve EDTA
- Heparin, spermidin, hemoglobin

- İyonik deterjanlar ve bazı boya maddeleri (örn. bromofenol mavisi, ksilen siyanol)

Bu maddelerin varlığı, DNA sentezini engelleyerek yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle, DNA şablonlarının analiz öncesi saflaştırılması önemlidir. Saflaştırma yöntemleri arasında:

- Etanol ile çöktürme
- Diyaliz
- Kloroform ekstraksiyonu
- Kromatografi teknikleri gibi yöntemler kullanılabilir.

Amplifiye edilen DNA ürünleri, genellikle agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir. Jel, etidyum bromür gibi interkalant boyalarla işaretlenir ve ultraviyole ışık altında görüntülenir. Daha yüksek özgülük gerektiren çalışmalarda, Southern blot hibridizasyonu gibi ek doğrulama yöntemleri kullanılarak PCR ürünleri teyit edilebilir. Bu sayede primer dimerleri gibi istenmeyen yan ürünler ayırt edilebilir (Green ve Sambrook, 2019). PCR, temel ve biyomedikal bilimlerde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Başlıca avantajları şunlardır: Hızlı sonuç verme: Sonuçlar genellikle birkaç saat ile 2–3 gün içinde elde edilir. Yüksek hassasiyet: 0,1–5 µg gibi çok az miktarda DNA/RNA ile çalışılabilir. Üstün çoğaltma kapasitesi:  $10^6$ – $10^9$  kopya arasında ürün üretilebilir. Klonlama ve gen ekspresyonu için uygunluk: Terminal bölgelerde kısıtlama bölgelerinin bulunması sayesinde, elde edilen ürünler klonlama ve ekspresyon çalışmalarında doğrudan kullanılabilir (Green ve Sambrook, 2019, Ramesh vd., 1992).

## 2.2. Real Time PCR

Gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR), küçük DNA segmentlerinin analizinde, klasik PCR'a alternatif olarak geliştirilen hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Bu teknik, kısaltılmış döngü süreleri, PCR sonrası aşamaların ortadan kaldırılması, florojenik etiketlerin kullanımı ve floresan emisyonlarının gerçek zamanlı olarak izlenmesi sayesinde, amplifikasyon sürecini anlık olarak takip etme imkânı sunar (Mackay vd., 2002).

Gerçek zamanlı PCR ile geleneksel PCR arasındaki en belirgin fark, amplikonların (çoğaltılmış DNA ürünlerinin) eşzamanlı olarak izlenebilmesidir. Bu izleme, DNA'ya özgü primerlerin veya amplikonlara/problara bağlanan florojenik moleküllerin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Böylece, DNA amplifikasyonu her döngüde floresan sinyal artışıyla izlenebilir ve ürünler daha oluşurken tespit edilebilir. Gerçek zamanlı PCR'ın bazı dezavantajları da vardır.

- Öncelikle, amplifikasyon sürecini izlemek için özel optik sistemlere sahip cihazlar gerektirir.
- Ayrıca, her florojenik boya her cihazla tam uyumlu değildir; bu da kullanılabilir reaktif seçeneklerini sınırlandırabilir.
- Son olarak, geleneksel PCR'a kıyasla daha yüksek maliyetlidir. Bu durum hem cihazların donanım gereksinimlerinden hem de florojenik boyaların sınırlı erişilebilirliğinden kaynaklanmaktadır.

Tüm bu sınırlamalara rağmen, gerçek zamanlı PCR; tanı, gen ekspresyonu analizi ve kantitatif genetik çalışmalar gibi birçok alanda yüksek hassasiyet ve zaman kazancı nedeniyle tercih edilmektedir (Mackay vd., 2002).

PCR, son derece hassas bir yöntem olmasına rağmen bazı önemli dezavantajlara da sahiptir. Yüksek duyarlılığı sayesinde, DNA veya RNA'daki en küçük kontaminasyonu bile algılayabilir. Ancak bu özellik, özellikle örnek hazırlığı aşamasında yaşanabilecek çapraz kontaminasyonlarda yanlış pozitif sonuçlara yol açma riskini artırır (Ghannam ve Varacallo, 2023). PCR'ın etkinliği, doğru şekilde tasarlanmış spesifik primer dizilerine bağlıdır. Primerlerin, hedeflenen patojen veya gen bölgesine yüksek özgüllükle bağlanması gerekir. Ancak bazen bu primerler, hedefe benzer ama tamamen eşleşmeyen dizilere de bağlanabilir. Bu durum, spesifik olmayan annealing olarak adlandırılır ve testin doğruluğunu olumsuz etkileyebilir (Ghannam ve Varacallo, 2023).

PCR, yüksek hassasiyeti, özgüllüğü ve hızlı sonuç verme kapasitesi sayesinde, temel ve biyomedikal bilimlerde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu özellikleri, onu hem laboratuvar hem de klinik uygulamalarda değerli ve vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir.

Teknik, özellikle çeşitli viral enfeksiyonların tanısında önemli rol oynamaktadır. PCR ile tespit edilebilen viral patojenler arasında insan papilloma virüsü (HPV), HIV, herpes simpleks virüsü (HSV), SARS-CoV-2, varisella-zoster virüsü (VZV), enterovirüsler, sitomegalovirüs (CMV) ve hepatit B, C, D ve E virüsleri bulunmaktadır (García-de-



Lomas ve Navarro, 1997; Islam ve Iqbal, 2020; Ayoade ve Kumar, 2022). Ayrıca PCR; bakteriyel, fungal ve parazitik mikroorganizmaların tespiti ile birlikte, immün yetmezlikler gibi genetik temelli hastalıkların tanısında da etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sayede klinik tanıda doğruluğu artırırken, hastaya özgü tedavi stratejilerinin geliştirilmesini mümkün kılar (García-de-Lomas ve Navarro, 1997; Islam ve Iqbal, 2020; Ayoade ve Kumar, 2022).

Real-Time PCR, mikrobiyal patojenlerin hızlı tespitine olanak tanıyarak, klinisyenlerin erken ve doğru tedavi kararları almasını sağlar. Bu hem hastaneye yatış sürelerini azaltır hem de gereksiz antibiyotik kullanımını önleyerek antibiyotik direnciyle mücadelede önemli bir katkı sunar.

Bu teknik sayesinde şu bakteriyel patojenler başarıyla tespit edilebilmektedir. Örneğin; *Mycobacterium spp.*, *Leptospira spp.*, *Chlamydia spp.*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* ve *Neisseria meningitidis*. Ayrıca, gerçek zamanlı PCR; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Helicobacter pylori* ve *Enterococcus* gibi antibiyotiğe dirençli suşların tanısında da etkili bir yöntemdir (Mackay, 2002).

Yüksek duyarlılığı sayesinde bu teknik, fulminan seyirli (ani ve şiddetli gelişen) hastalıkların erken tanısında da kullanılır. Bu özelliğiyle menenjit, sepsis ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi ciddi klinik tabloların yönetiminde hayati rol oynar.

### **2.3. Reverse Transkriptaz PCR**

Ters transkripsiyon PCR, mesajcı RNA (mRNA) moleküllerinden yola çıkarak DNA sentezleyen ve ardından bu DNA'yı çoğaltan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu yöntemde kullanılan DNA polimeraz enzimi, retrovirüslerden elde edilen ve RNA'ya karşı tamamlayıcı DNA (cDNA) üretebilen özel bir enzimdir (Ghannam, M. G. ve Varacallo, 2023; Islam ve Iqbal, 2020).

RT-PCR, genellikle geleneksel PCR ile birlikte uygulanarak, belirli genlerin ifade edilip edilmediğini belirlemeye yönelik kalitatif analizler yapılmasına olanak tanır. Ayrıca, gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile birlikte kullanıldığında, farklı örnek grupları arasında gen ekspresyon düzeylerinin kantitatif karşılaştırması da gerçekleştirilebilir. Özellikle COVID-19 pandemisi sırasında Reverse Transkriptaz-PCR, yüksek duyarlılık ve özgüllüğü sayesinde birincil tanı yöntemi olarak benimsenmiştir. SARS-CoV-2 virüsünü tespit etmek için RT-PCR testi, semptomatik veya asemptomatik bireylerde etkili ve güvenilir sonuçlar sağlamıştır. Virüse ait örnekler genellikle üst solunum yollarından alınır. Bu kapsamda; nazofarenks (burun yutağı), orofarenks (ağız yutağı), burun delikleri, ağız boşluğu gibi anatomik bölgelerden örnekleme yapılabilir (Ghannam, M. G. ve Varacallo, 2023; Islam ve Iqbal, 2020).

Geleneksel PCR, umut verici sonuçları sayesinde moleküler biyoloji alanında altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak güvenilir sonuçlar elde edebilmek için, amplifikasyon sonrası işlemler dikkatle

yürütülmelidir. Uygun olmayan işlem adımları, laboratuvarda kontaminasyon riski oluşturarak sahte pozitif sonuçlara yol açabilir.

Kontaminasyonu önlemek için:

- PCR işlemleri için ayrı ve özel bir alan oluşturulmalı,
- Laminer akış kabini tercih edilmeli,
- UV ışığı, kontaminant DNA'yı parçalamada kullanılmalıdır.

Laboratuvar personeli her zaman maske, eldiven ve saç bonesi takmalı; kullanılan tüm ekipmanlar (pipetler, tüpler, cam/plastik malzemeler) steril olmalı ve doğrudan ambalajından kullanılmalıdır.

Pozitif deplasmanlı pipetler, otomatik pipetlerin neden olduğu kontaminasyonu azaltmak için tercih edilmelidir. Mikrosantrifüj tüpleri, kullanılmadan önce yaklaşık 10 saniye santrifüj edilerek sıvının dibe toplanması sağlanmalıdır.

Ayrıca, post-amplifikasyon işlemleri, PCR alanından ayrı bir laboratuvar tezgahında yürütülmelidir.

## **2.4. İmmünoloji Araştırmalarında DNA Mikrodizileri**

DNA mikroarray teknolojileri, tıbbi açıdan önemli virüslerin tanımlanmasında yüksek potansiyele sahiptir (Herrera-Rodriguez vd., 2013). Bu yöntemde, test örneğinde bulunan floresanla işaretlenmiş viral nükleik asitler, cam lam gibi katı bir yüzeye immobilize edilmiş oligonükleotid problarla etkileşime girer. Bu problar, belirli bir virüsün genom dizilerine özgüdür. Hedef diziler ile immobilize problar arasında

gerçekleşen hibridizasyon, floresan tabanlı sistemlerle tespit edilir ve ölçülür (Cella vd., 2013; Cobo, 2012; Yu vd., 2012).

DNA mikroarray kullanımının, insan örneklerinde tıbbi virüslerin tespiti açısından ne kadar faydalı olduğunu gösteren geniş bir literatür bulunmaktadır. Örneğin, Chiu ve arkadaşları (Chiu vd., 2008). solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklardan alınan nazofarengeal aspiratlarda çoklu virüs tespiti için DNA mikroarray yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntem, RSV, influenza A ve rinovirüs/enterovirüs tespiti açısından RT-PCR ile karşılaştırıldığında %87–90 arasında genel duyarlılık ve  $\geq$ %99 özgüllük göstermiştir.

Başka bir çalışmada, DNA mikroarray yöntemi, klinik örneklerde HSV-1/2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 A/B ve adenovirüs gibi virüsleri 10 genom eşdeğeri (GE)/reaksiyon düzeyinde ve çapraz reaksiyon olmaksızın eşzamanlı olarak tespit edebilmiştir (Müller vd., 2009). Ayrıca menenjit ve ensefalit vakalarında viral etkenlerin tanımlanmasında, tekli virüs PCR yöntemine kıyasla %93 duyarlılık ve %100 özgüllük elde edilmiştir (Boriskin v., 2004).

DNA mikroarray; gastrointestinal virüsler (Martínez vd., 2015), kemirgen ve eklem bacaklılardan bulaşan virüsler (Khan vd., 2016), herpesvirüsler, enterovirüsler, flavivirüsler (Korimbocus vd., 2005), HIV-1, HIV-2, hepatit virüsleri (Granade vd., 2018) ve insan örneklerinde iki farklı dengue virüsü serotipinin eşzamanlı tespiti (Díaz-Badillo vd., 2014) gibi pek çok virüs grubunun yüksek verimli şekilde tespitinde de başarıyla kullanılmıştır.

Ayrıca HIV, hepatit B virüsü (HBV) ve SARS-CoV gibi virüslerin genotip tayini ve ilaç dirençli mutasyonlarının belirlenmesi (Martin vd., 2016; Masimba vd., 2014; Hua vd., 2015); influenza B virüslerinin soy ayrımı (Dankbar vd., 2007) ve 2002 yılında Çin’de yaşanan SARS salgınında, koronavirüs ailesinin yeni bir üyesinin keşfi DNA mikroarray teknolojisinin kullanım alanlarını daha da genişletmiştir (Wang vd., 2003).

DNA mikroarrayler, klinik örneklerde çok sayıda potansiyel viral patojeni aynı anda tespit edebilme kapasitesi sayesinde yüksek verimli tanı araçlarıdır (32). Ancak bu yöntemin yaygın klinik kullanımını sınırlayan bazı dezavantajları da vardır: Yüksek maliyet, yoğun iş gücü gereksinimi ve zaman alıcı işlemler (örneğin hibridizasyon süreci saatler hatta günler sürebilir) başlıca sınırlamalardandır. Ayrıca, spesifik olmayan hibridizasyon olayları testin duyarlılığını azaltabilir. Kullanılan oligonükleotid problemlerin etkinliği için, hedef virüsün genetik yapısına dair detaylı bilgi gereklidir. Bu nedenle mikroarray yalnızca prob setinde yer alan virüsleri tespit edebilir (Yu vd., 2012; Bexfield ve Kellam, 2011; Bumgarner, 2013).

## **2.5. Yeni Nesil Dizileme**

Yeni nesil dizileme (NGS), klinik örneklerden elde edilen viral nükleik asitleri doğrudan analiz edebilmesi sayesinde tanısal virolojide oldukça değerli bir teknolojidir (Lefterova vd., 2015; Vemula vd., 2016). Genel olarak NGS süreci; test örneğinin hazırlanması, uygun bir NGS platformu kullanılarak nükleik asit dizilerinin sekanslanması ve elde edilen verilerin biyoinformatik araçlarla analiz edilmesini içerir (Souf,

2016; Deurenberg vd., 2017). Günümüzde farklı şirketler, çeşitli dizileme teknolojileri, reaktif sistemler ve veri analiz yazılımları kullanarak farklı NGS cihazları üretmektedir (Vemula vd., 2016). Örneğin; pyrosequencing (Roche 454) teknolojisi, DNA sentezi sırasında nükleotidlerin eklenmesini takiben ortaya çıkan pirofosfatı tespit ederken; Illumina platformları, DNA polimerizasyonu sırasında eklenen nükleotidlerden yayılan floresan sinyalleri analiz eder. Gelişmekte olan teknolojilerden biri olan Oxford Nanopore'un MinION cihazı ise, DNA veya RNA moleküllerinin nanoporlardan geçişi sırasında oluşan iyonik akımı ölçerek dizileme işlemini gerçekleştirir (Vemula vd., 2016; Souf, 2016; Deurenberg vd., 2017). Her ne kadar MinION cihazı yüksek sekanslama hata oranına sahip olsa da (bazı çalışmalarda %38,2'ye kadar) (Laver vd., 2015), diğer NGS platformlarına göre önemli avantajlar sunmaktadır. Birincisi, gerçek zamanlı olarak 882 kb'ye kadar uzun okuma üretme kapasitesiyle, kısa sürede viral patojenlerin tüm genomlarının dizilenmesine olanak sağlar (Jain vd., 2018; Wang vd., 2017; Imai vd., 2018). İkincisi, taşınabilir yapısı ve çevrimdışı analiz yeteneği sayesinde, internet bağlantısına ihtiyaç duymadan sahada kullanılabilir; bu da özellikle salgınlar sırasında büyük bir avantajdır (Quick vd., 2017). Üçüncüsü, düşük sermaye maliyeti nedeniyle hem düşük gelirli ülkelerde hem de bütçe kısıtlaması olan laboratuvarlarda erişilebilirliği artırır (Laver vd., 2015).

NGS, tanısal virolojide pek çok farklı uygulamada başarıyla kullanılmıştır. Örneğin, Kustin ve arkadaşları (Kustin vd., 2019),

solunum yolu virüslerinin klinik örneklerden hızlı ve güvenilir biçimde tanımlanması amacıyla NGS teknolojisinden yararlanmıştır. Yöntem, influenza A (H1N1) pdm09 virüsünün takibi için de uygulanmıştır (Baillie vd., 2012). Ayrıca Dessilly ve arkadaşları (Dessilly vd., 2018), HIV-1'e karşı ilaç direnci mutasyonlarını tespit etmek amacıyla NGS kullanmış; başka bir çalışmada ise yeni bir Ebola virüsünün tanımlanmasında bu teknoloji önemli rol oynamıştır (Towner vd., 2008).

NGS'nin en büyük avantajlarından biri, PCR ve DNA mikroarray gibi geleneksel yöntemlerin aksine, hedef viral genom hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirmemesidir. Bu sayede, hedefe özgü PCR primerlerine veya oligonükleotid proplara ihtiyaç duyulmaz (Kustin vd., 2019; Lin vd., 2014). Ancak buna rağmen, NGS'nin klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımını bazı sınırlamalarla karşı karşıyadır. Bunlar arasında uzun geri dönüş süresi, işlem başına sınırlı örnek kapasitesi, cihazların yüksek maliyeti ve verilerin analizinde uzmanlık gerektiren biyoinformatik süreçler yer almaktadır (Dessilly vd., 2018; Jerome vd., 2019).

### **3. İMMÜNOLOJİDE PROTEİNLERİN TESPİTİ**

#### **3.1. ELISA**

Enzim immünoassayleri (EIA'lar), antijen-antikor etkileşimlerini tespit etmek ve nicel analizini yapmak amacıyla, enzimlerin katalitik özelliklerinden yararlanan immünojenik testlerdir. Bu yöntemler arasında yer alan Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizi (ELISA), klinik

tanı ve protein tespiti alanında yaygın olarak kullanılan heterojen bir EIA tekniğidir (Aydin, 2015).

ELISA testlerinde, reaksiyon bileşenlerinden biri genellikle antijen ya da antikor katı bir fazın (örneğin mikrotitre plakası, manyetik partikül ya da plastik boncuk) yüzeyine özgül olmayan adsorpsiyonla ya da kovalent bağ yoluyla tutturulur. Bu immobilizasyon işlemi, bağlı ve serbest bileşenlerin etkin bir şekilde ayrılmasını sağlar (Engvall, 2010).

ELISA'nın en yaygın biçimi olan sandviç ELISA'da, analizi yapılacak antijeni (Ag) içeren numune ya da kalibratör, katı faza bağlı spesifik bir antikor (Ab) ile inkübe edilir. Bağlanma gerçekleştikten sonra yıkama işlemi uygulanır ve enzime konjuge edilmiş ikinci bir antikor eklenir. Bu, Ab–Ag–Ab–enzim formatında bir "sandviç kompleksi" oluşturur. Serbest kalan antikorlar yıkama ile uzaklaştırılır ve ardından enzim substratı eklenir. Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün miktarı, örnekteki antijenin derişimi ile doğru orantılıdır (Aydin, 2015).

Bunun tersi olarak, numunedeki spesifik antikorları tespit etmek amacıyla da ELISA yöntemi uygulanabilir. Bu durumda, katı faza antijen bağlanır ve test örneğindeki hedef antikorun bağlanması sağlanır. Takiben, bu antikora özgü enzimle işaretlenmiş ikincil bir antikor kullanılır (Shah ve Maghsoudlou, 2016).

ELISA analizleri, özellikle serum ve tam kan örneklerinde viral enfeksiyonlara ya da otoantijenlere karşı gelişen antikorların tespiti amacıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, görünür renk değişimi oluşturan substratlar ile birlikte kullanılan enzim konjugatları



sayesinde, görsel olarak okunabilir ELISA testleri geliştirilmiş ve bu testler tarama, hızlı tanı ve evde kullanım gibi pratik alanlarda önemli avantajlar sağlamıştır (Konstantinou, 2017).

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), proteinlerin nicel ve nitel analizinde yaygın olarak kullanılan, yüksek hassasiyetli bir immünolojik testtir. Bu yöntem genellikle, proteine yüksek bağlanma kapasitesine sahip **polistiren 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarında** gerçekleştirilir.

### **3.1.1. ELISA Bileşenleri ve Temel Prensipler**

ELISA testinin bileşenleri kullanılan yöntemle göre değişmekle birlikte; genel olarak birincil ve/veya ikincil tespit antikoru, hedef antijen veya analit, kaplama antikoru/antijeni, yıkama ve bloklama tamponları, substrat ve kromojen gibi reaktifleri içerir (Shah ve Maghsoudlou, 2016).

Birincil tespit antikoru, yalnızca hedef proteine özgül bağlanma yeteneğine sahiptir (Shah ve Maghsoudlou, 2016). İkincil tespit antikoru ise, birincil antikora bağlanan ve genellikle bir enzim (örneğin HRP ya da AP) ile konjuge edilmiş antikordur (Konstantinou, 2017).

Bir ELISA deneyinin genel uygulama adımları dört temel aşamadan oluşur:

1. Kaplama: Antijen veya antikorun katı faza (plaka yüzeyine) bağlanması

2. Bloklama: Özgül olmayan bağlanmayı önlemek için genellikle BSA (sığır serum albümini) kullanılarak boş alanların doldurulması
3. Algılama: Bağlı antijen veya antikorun spesifik bir tespit antikoru ile tanınması
4. Son okuma: Substrat eklenerek reaksiyonun başlatılması ve renk değişiminin ölçülmesi

Bu adımlar arasında, bağlanmamış reaktanları uzaklaştırmak için PBS (fosfat tamponlu salin) ve iyonik olmayan bir deterjan içeren yıkama tamponlarıyla kuyucukların birkaç kez yıkanması gereklidir (Konstantinou, 2017).

Tespit aşamasında en yaygın kullanılan enzimler:

- Horseradish Peroxidase (HRP): Substratı hidrojen peroksittir, mavi renk oluşturur.
- Alkalın Fosfataz (AP): Genellikle *p-nitrofenil fosfat (pNPP)* substratıyla kullanılır; sarı renkli *nitrofenol* oluşumu ile sonuç verir. Tepki süresi genellikle 15–30 dakikadır.

ELISA sonuçları, absorbans ölçümleri ile değerlendirilir. Genellikle standart bir eğri oluşturmak amacıyla seri seyreltmeler uygulanır. Bu veriler logaritmik x eksenini (konsantrasyon) ve doğrusal y eksenini (absorbans) kullanılarak grafiğe dökülür (Tabatabaei ve Ahmed, 2022).

Kullanım amacına ve deney tasarımına göre dört temel ELISA tipi vardır:

- Doğrudan ELISA: Antijen kaplı plaka; tespit için işaretli antikor kullanılır.
- Dolaylı ELISA: Antijen kaplı plaka; işaretli ikincil antikor ile tespit yapılır.
- Sandviç ELISA: Antikor kaplı plaka; numunedeki antijen tespit edilir.
- Rekabetçi ELISA: Antijen ve antikor rekabet eder; genellikle düşük konsantrasyonlu analitlerin ölçümünde kullanılır.

### **3.1.2. Doğrudan ELISA (Direct ELISA)**

Doğrudan ve dolaylı ELISA yöntemleri, genellikle hedef antijenlerin ELISA plakasının kuyucuklarına immobilize edilmesiyle başlar (Lin, 2015a). Bu ilk adımda, antijenler 37 °C’de yaklaşık bir saat veya alternatif olarak 4 °C’de gece boyunca inkübe edilerek plaka yüzeyine bağlanmaları sağlanır. İnkübasyon sürecinin ardından, bağlanmamış antijenlerin uzaklaştırılması için plakalar yıkanır. Daha sonra, plakadaki özgül olmayan bağlanma bölgelerini bloke etmek amacıyla BSA (sığır serum albümini), ovalbumin, aprotinin veya benzeri hayvansal proteinler içeren bloklama reaktifleri uygulanır (Engvall, 2010). Bu bloklama adımı, spesifik olmayan bağlanmaları engelleyerek yanlış pozitif sonuç riskini azaltır. Bloklama sonrasında plakalar tekrar yıkanır ve enzimle konjuge edilmiş birincil tespit antikoru eklenir. Bu adım da

tipik olarak bir saat süren inkübasyon ile tamamlanır (Kohl ve Ascoli, 2017).

Doğrudan ELISA'da, kullanılan birincil tespit antikoru, hedef proteine doğrudan bağlanacak şekilde tasarlanmıştır (Hornbeck, 2001). Inkübasyon sonrası bağlanmamış antikolar yıkama işlemiyle uzaklaştırılır ve tespit için gerekli substrat içeren çözeltisi eklenir. En sık kullanılan enzimler arasında alkalın fosfataz (AP) ve horseradish peroksidaz (HRP) bulunur. Bu enzimler, substratla reaksiyona girerek renk değişimi oluşturur: AP, substrattan fosfat gruplarını hidrolize ederken; HRP, substratların oksidasyonu yoluyla renkli ürünler üretir (Kohl ve Ascoli, 2017).

Doğrudan ELISA'nın başlıca avantajları; protokolünün daha kısa olması ve ikincil antikor gerektirmemesi sayesinde çapraz reaktivite riskinin ortadan kalkmasıdır. Ancak bu yöntemin bazı sınırlamaları da vardır: özellikle düşük analit konsantrasyonlarında hassasiyetin sınırlı olması ve enzime konjuge birincil antikoların yüksek maliyetli olması, doğrudan ELISA'nın dezavantajları arasında yer alır (Shah ve Maghsoudlou, 2016).

### **3.1.3. Dolaylı ELISA (Indirect ELISA)**

Dolaylı ELISA protokolü, temel olarak doğrudan ELISA ile benzer adımları içerir. Ancak bu yöntemde, kullanılan antikor türleri ve buna bağlı olarak ek bir inkübasyon ve yıkama adımı bulunur (Lin, 2015b). Dolaylı ELISA'da iki farklı antikor kullanılır: ilgi duyulan hedef

proteine özgül birincil tespit antikor ve bu antikoru tanıyıp bağlanan, enzimle konjuge edilmiş ikincil antikor (Tabatabaei ve Ahmed, 2022).

Protokolde önce, örneğe birincil antikor eklenir ve bu antikorun hedef antijene bağlanmasına izin verilir. Takiben bağlanmamış antikorlar yıkama adımıyla uzaklaştırılır. Daha sonra, enzime konjuge edilmiş ikincil antikor eklenir ve plakalar yeniden inkübe edilir. Ardından bir yıkama işlemi daha gerçekleştirilir ve substrat eklenerek enzim-substrat reaksiyonuyla renk oluşumu sağlanır. Renk değişimi, doğrudan ELISA’da olduğu gibi tespit edilir (Kohl ve Ascoli, 2017).

Dolaylı ELISA’nın en önemli avantajlarından biri, doğrudan ELISA’ya kıyasla daha yüksek duyarlılığa sahip olmasıdır (Kohl ve Ascoli, 2017). Bu, sinyalin ikincil antikorlar aracılığıyla güçlendirilmesinden kaynaklanır. Ayrıca, farklı birincil antikorlarla uyumlu çok sayıda ticari ikincil antikorun mevcut olması, yöntemi hem daha ekonomik hem de daha esnek hale getirir. Bununla birlikte, bu yaklaşımda dikkat edilmesi gereken önemli bir dezavantaj, ikincil antikorların çapraz reaktivite göstermesi riskidir. Bu durum, özgüllük üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (Shah ve Maghsoudlou, 2016).

### **3.1.4 Sandviç ELISA**

Doğrudan ve dolaylı ELISA’dan farklı olarak, sandviç ELISA yöntemi yakalama (capture) antikorunun plaka kuyularına immobilize edilmesiyle başlar (Tabatabaei ve Ahmed, 2022). Yöntemin adı, hedef antijenin iki antikor yakalama ve tespit antikorları arasında “sandviç”

şeklinde yer alması nedeniyle bu şekilde tanımlanmıştır (Engvall, 2010).

Test protokolü, yakalama antikorunun plakaya eklenmesi ve 4 °C’de gece boyunca inkübasyonu ile başlar. Kaplama işlemi tamamlandıktan sonra plaka PBS ile yıkanır ve özgül olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla BSA ile bloklama yapılır. Bloklama genellikle oda sıcaklığında 1–2 saat sürer. Antijen eklenmeden önce bir yıkama adımı daha gerçekleştirilir (Kohl ve Ascoli, 2017).

Sonraki aşamada, test örneğindeki ilgili antijen plakalara eklenir ve 37 °C’de yaklaşık 90 dakika inkübe edilir. Antijenin, immobilize yakalama antikoruna bağlanmasının ardından plaka yıkanır ve birincil tespit antikoru eklenerek oda sıcaklığında 1–2 saat inkübe edilir. Takiben, bağlanmamış antikorlar yıkanır ve enzimle konjuge edilmiş ikincil antikor plakaya eklenerek yeniden inkübasyon yapılır. Son yıkama adımından sonra, substrat eklenerek renk değişimi gözlemlenir (Engvall, 2010).

Sandviç ELISA, tüm ELISA türleri arasında genellikle en yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip yöntem olarak kabul edilir (Kohl ve Ascoli, 2017). Bu üstün performans, hedef antijenin çift yönlü tanınmasından (yakalama ve tespit antikorları) kaynaklanır. Ancak, bazı sınırlamaları da vardır. Bunlar arasında:

- Yöntemin uzun süresi ve görece yüksek maliyeti,

- "Eşleştirilmiş antikor çiftlerinin" (aynı antijene farklı epitoplardan bağlanan iki antikor) temin edilme gerekliliği,
- Ve genellikle çok değerlikli antijenlere uygunluk gereksinimi yer alır (Shah ve Maghsoudlou, 2016).

### **3.1.5. Rekabetçi ELISA**

Rekabetçi ELISA, test serumunda belirli bir antijene karşı gelişmiş antikoru tespit etmeyi amaçlayan bir yöntemdir (Lequin, 2005). Bu yöntemde, enzimle konjuge edilmiş antikor ile test serumundaki özgül antikor, aynı antijen için yarışır (rekabet eder). ELISA plakasındaki kuyucuklara antijen kaplandıktan sonra, test örneği (antikor içerebilir) ve enzim konjugat içeren antikor birlikte kuyulara eklenir. Böylece, her iki antikorum aynı hedefe bağlanma şansı olur.

Eğer test serumu antikor içermiyorsa (negatif örnek), enzime bağlı antikor hedef antijene bağlanır ve substrat eklendiğinde renk değişimi oluşur. Buna karşılık, test serumu antikor içeriyorsa (pozitif örnek), bu antikorlar antijene bağlanarak enzime konjuge antikorların bağlanmasını engeller. Bu durumda substrat eklense bile renk oluşmaz. Yani, renk varlığı negatif sonucu, renksizlik ise pozitif sonucu gösterir (Shah ve Maghsoudlou, 2016).

Rekabetçi ELISA'nın bazı sınırlamaları vardır. Yöntem genellikle daha düşük özgülüğe sahiptir ve seyreltik örneklerde güvenilir sonuçlar vermeyebilir. Bununla birlikte, bazı avantajları da mevcuttur (Kohl ve Ascoli, 2017).

- Numunelerin saflaştırılması gerekmeden doğrudan kullanılabilmesi,
- Özellikle küçük moleküllü antijenler için uygun olması,
- Geniş antijen yelpazesini aynı anda değerlendirme kapasitesi,
- Ve düşük ölçüm değişkenliği ile tekrarlanabilirlik sağlaması.

Rekabetçi ELISA, özellikle klasik yöntemlerle ölçülmesi zor olan küçük, tek epitoplü veya düşük konsantrasyonlu antijenlerin analizi için değerli bir alternatif sunar.

### **3.1.6. Tanı Testlerinde ELISA'nın Kullanımı**

ELISA, çok çeşitli klinik tanı uygulamalarında yaygın olarak kullanılan güvenilir ve hassas yöntemlerdir (Aydın, 2015; Shah ve Maghsoudlou, 2016). ELISA'nın başlıca kullanım alanları arasında, kanda antikorların varlığının tespiti ve nicel analizi yer alır. Bu yöntemle otoimmün hastalıklarla ilişkili otoantikorlar (örneğin anti-dsDNA, anti-desmoglein-1, antinükleer antikorlar gibi) ile çeşitli enfeksiyonlara karşı gelişmiş antikorlar (antibakteriyel, antiviral, antifungal) tespit edilebilir. HIV, Hepatit A, B ve C gibi önemli enfeksiyon hastalıklarının tanısında ELISA oldukça sık kullanılmaktadır.

ELISA ayrıca, tümör belirteçlerinin düzeylerini izlemek ve prognoz hakkında bilgi edinmek amacıyla da kullanılır. Prostat spesifik antijen (PSA) ve karsinoembriyonik antijen (CEA) bu amaçla sık test edilen belirteçlerdendir. Bunun yanında, hormon düzeylerinin tayini de ELISA



ile yapılabilir. Özellikle luteinizan hormon, folikül uyarıcı hormon, prolaktin, testosteron ve insan koryonik gonadotropini (hCG) gibi hormonlar, doğurganlık değerlendirmeleri ve gebelik testleri kapsamında ölçülebilir.

Epidemiyolojik açıdan, ELISA hastalık salgınlarının takibi için de kritik rol oynamaktadır. Kolera, grip ve HIV gibi bulaşıcı hastalıkların yayılımının izlenmesinde hızlı ve yaygın tarama aracı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bireylerin geçmişteki enfeksiyonlara maruz kalıp kalmadığının belirlenmesi amacıyla da tercih edilir; bu bağlamda HIV, Lyme hastalığı ve hepatit virüslerine karşı gelişmiş antikorların varlığı saptanabilir.

ELISA, kan bağışlarında viral bulaşanların taranması amacıyla da güvenle kullanılır. Anti-HIV-1/2, anti-HCV ve HBsAg testleri, kan ürünlerinin güvenliğini sağlamak için rutin olarak uygulanmaktadır. Son olarak, ELISA testleri uyuşturucu bağımlılığının saptanmasında da önemli yer tutar. Amfetamin, metamfetamin, 3,4-metilendioksimetamfetamin (MDMA), kokain ve onun metaboliti olan benzoilekgonin gibi maddelerin varlığı, hassas ve özgül ELISA kitleriyle tespit edilebilmektedir.

### **3.1.7. ELISA'nın Çalışmalardaki Önemi**

ELISA testleri, yalnızca laboratuvar ortamlarıyla sınırlı kalmayıp; klinik tanı, halk sağlığı, adli toksikoloji ve araştırma alanları dahil olmak üzere çok çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Kuo vd., 2012; Tiscione, 2018). Bu yöntem; HIV gibi viral enfeksiyonların

hızlı antikor tarama testlerinden, bakteri, mantar ve parazitlerin tespitine, otoimmün hastalıkların tanısına, gıda alerjenlerinin saptanmasına, kan grubu tayinlerine ve gebelik hormonu (hCG) analizlerine kadar geniş bir yelpazede kullanılabilir. Örneğin, HIV taraması genellikle dolaylı ELISA tabanlı testlerle gerçekleştirilir. Bu testlerde kan ya da tükürük örnekleri alınarak virüse karşı gelişen antikorlar araştırılır. Ancak, ELISA HIV için yalnızca bir tarama testi olup; potansiyel yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle kesin tanı için genellikle Western blot gibi doğrulayıcı testler gereklidir. Ayrıca, çocuklar ve genç erişkinlerin cildini enfekte eden Molluscum contagiosum virüsü (MCV) gibi virüslerin saptanmasında da ELISA testlerinden faydalanılmaktadır. Günümüzde ELISA, küresel MCV seroprevalansını değerlendirme amacıyla da araştırmalarda kullanılmaktadır (Workowski vd., 2015; Sherwani vd., 2017).

ELISA, aynı zamanda otoimmün büllöz hastalıkların tanısında da etkili bir araçtır. Özellikle pemfigus ve büllöz pemfigoid hastalıklarında, sırasıyla desmoglein 1 ve 3, ve BP180 antijenine karşı gelişmiş otoantikorların tespiti için kullanılmaktadır (Atzori vd., 2008). Öte yandan, gıda alerjilerinin tanısı ve araştırılması için geliştirilen ultra hassas ELISA varyasyonları, çok düşük düzeylerde (pikogram ölçeğinde) alerjenleri saptayabilme kapasitesine sahiptir. Bu, özellikle ağır alerjik reaksiyonlara neden olabilen gıdaların halk sağlığı açısından değerlendirilmesinde kritik bir öneme sahiptir (Weng vd., 2016).

## **3.2. Western Blot**

Western blot terimi, ilk kez 1981 yılında Dr. Burnette tarafından, DNA analizinde kullanılan Southern blot ve RNA analizinde kullanılan Northern blot tekniklerinden esinlenerek ortaya atılmıştır (Burnette, 1981; Alwine vd., 1977). Western blot, karmaşık protein karışımlarındaki belirli proteinleri ayırma, tespit etme ve tanımlama amacıyla kullanılan güçlü bir analitik yöntemdir (Hnasko ve Hnasko, 2015). Bu teknik, proteinlerin öncelikle poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını ve ardından nitroselüloz veya naylon membrana elektro-blotlama yöntemiyle aktarılmasını içerir (Eslami ve Lujan, 2010).

Membran üzerine aktarılan proteinler, daha sonra enzimler veya radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş spesifik antikorlar aracılığıyla tanımlanır (Gallagher vd., 2008). Bu tür problemlerin kullanımı sayesinde, protein tespit sınırları, doğrudan immüno-presipitasyon ya da geleneksel protein boyama yöntemlerine göre 10 ila 100 kat daha hassas hale gelebilmektedir (Hirano, 2012). Ayrıca, oluşan bantların dansitometrik analizi ile, farklı örneklerdeki protein düzeyleri nicel olarak karşılaştırılabilir; bu da tedavi etkilerinin ya da zamana bağlı değişimlerin değerlendirilmesinde araştırmacılara değerli bilgiler sunar (Pillai-Kastoori vd., 2020).

### **3.2.1. Proteinlerin Eşit Yüklenmesi ve Numune Hazırlığı**

Doğru sonuçlar elde etmek için, Western blot deneylerinde her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklenmesi esastır. Proteinler, uygun

hücre lizis tamponları ve proteaz/fosfataz inhibitörleri kullanılarak ekstrakte edilir. Numune türüne göre farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılır; örneğin, doku örneklerinde homojenizasyon ya da sonikasyon tercih edilirken, hücre kültürlerinde ozmotik şok ya da deterjan lizisi daha uygundur. Ayrıca, kullanılan lizis tamponu hedef proteinin hücresel lokalizasyonuna uygun olmalıdır. Örneğin, RIPA tamponu nükleer ve mitokondriyal proteinler için idealdir. Bazı durumlarda, antikorların denatüre proteinleri tanıyamaması nedeniyle, daha nazik ve deterjansız tamponlar tercih edilebilir.

Protein konsantrasyonu genellikle Bradford testi ile ölçülür. Bu kolorimetrik yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanarak renk değişimi oluşturması prensibine dayanır. Elde edilen absorbans değeri, standart eğri üzerinden değerlendirilerek numunelerdeki protein miktarı hesaplanır. Her örnek daha sonra 1:1 oranında Laemmli örnek tamponu ile karıştırılır. Bu tampon; SDS, beta-merkaptotanol, gliserol ve bromofenol mavisi içerir. SDS, proteinleri denatüre ederek eşit anyon-kütle oranı sağlar; beta-merkaptotanol disülfid bağlarını kırar; gliserol numunenin kuyucuğa çökmesini kolaylaştırır ve bromofenol mavisi elektroforezde referans boyadır.

### **3.2.2. SDS-PAGE ile Proteinlerin Ayrılması**

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile sağlanır. SDS, tüm proteinleri negatif yüklü hale getirir ve bu sayede ayırım yalnızca moleküler büyüklüğe göre yapılabilir. Daha büyük proteinler

jelde daha yavaş hareket ederken, küçük proteinler daha hızlı ilerler. Jel sistemi genellikle iki kısımdan oluşur: proteinleri hizalayan istifleme jeli ve proteinleri ayıran çözme jeli.

SDS-PAGE'de en yaygın kullanılan sistem Laemmli süreksiz tampon sistemidir. Bu sistemde, farklı pH'lara sahip tamponlar sayesinde glisin'in yük durumu değişir ve proteinler istifleme jeline hizalanarak çözme jeline düzgün şekilde geçiş yapar. Böylece yüksek çözünürlüklü bir ayırım elde edilir. Örnekler genellikle moleküler ağırlık işaretleyicileri ile birlikte çalıştırılır; bu sayede proteinlerin yaklaşık boyutları belirlenebilir (Gavini ve Parameshwaran, 2023).

### **3.2.3. Elektroforetik Transfer (Blotlama)**

SDS-PAGE sonrasında ayrılan proteinler, elektroblotlama adı verilen yöntemle nitroselüloz veya PVDF membrana aktarılır. Bu transfer, ıslak veya yarı kuru sistemlerle yapılabilir. Islak transfer, geniş protein boyutlarında yüksek verimlilik sunarken, yarı kuru sistem daha hızlıdır ancak büyük proteinler için sınırlı olabilir. Towbin transfer tamponu, standart sistemlerde yaygın olarak kullanılır ve metanol içeriği sayesinde proteinlerin membrana bağlanmasını kolaylaştırır. PVDF membranlar, kimyasal dayanıklılıkları ve yüksek bağlama kapasiteleri nedeniyle nitroselüloz membranlara göre birçok avantaja sahiptir (Gavini ve Parameshwaran, 2023).

### **3.2.4. Antikor Problama ve Tespit**

Transferin ardından, membran yüzeyindeki özgül olmayan bağlanmaları engellemek için bloklama işlemi uygulanır. Bu işlem genellikle kazein veya sığır serum albümini içeren tamponlarla gerçekleştirilir. Bloklamının ardından, hedef proteine özgü birincil antikor ile inkübasyon yapılır. Bu antikoru tanıyacak şekilde etiketlenmiş ikincil antikor, genellikle bir enzim (örneğin HRP veya AP) ile konjuge edilir (Gavini ve Parameshwaran, 2023).

Tespit aşamasında enzim aracılığıyla ışık yayan reaksiyonlar kullanılır. Kemilüminesans, bu bağlamda en yaygın kullanılan yöntemdir. Alternatif olarak, floresan etiketli antikorlar sayesinde substrat gerektirmeyen tespit sistemleri de yaygınlaşmaktadır. Bu sistemler, birden fazla hedef proteinin aynı membran üzerinde eşzamanlı olarak izlenmesini mümkün kılar (Gavini ve Parameshwaran, 2023).

Sonuç olarak, tespit edilen bantlar hem varlık/yokluk hem de göreceli yoğunluk açısından değerlendirilir. Bu amaçla genellikle bir housekeeping protein (örneğin  $\beta$ -aktin, GAPDH) de problanarak, normalize edilmiş kantitatif analiz yapılır. Böylece örnekler arasında anlamlı karşılaştırmalar yapılabilir (Gavini ve Parameshwaran, 2023).

### **3.2.5. Western Blotta Sınırlamalar ve Uygulamalar**

Western blotlama oldukça hassas ve çok aşamalı bir teknik olduğundan, sürecin her adımı titizlikle yürütülmelidir. En küçük bir teknik aksaklık, sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini ciddi şekilde etkileyebilir

(Meftahi vd., 2021). Özellikle yetersiz aktarım süresi, büyük moleküler ağırlıklı proteinlerin membrana tam olarak geçmesini engelleyebilir ve eksik ya da belirsiz bantlara yol açabilir. Ayrıca, ikincil antikorların özgül olmayan proteinlerle reaksiyona girmesi durumunda yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkabilir (Lück vd., 2021).

Western blotlama genellikle yarı kantitatif bir yöntem olarak kabul edilir; bu da tespit edilen proteinlerin moleküler ağırlıkları için yalnızca yaklaşık değerler sağladığı anlamına gelir (Ghosh vd., 2014). Öte yandan, güvenilir sonuçlar elde edebilmek için tekniğin deneyimli kişilerce uygulanması gerekmektedir (Lück vd., 2021). Ayrıca, hedef proteine karşı özgül bir birincil antikor mevcut değilse, bu protein Western blot ile tespit edilemez (Pillai-Kastoori vd., 2020).

Western blotun en belirgin avantajlarından biri, çok basamaklı ve zaman alıcı bir yöntem olmasına rağmen yüksek özgüllükle sonuç vermesi ve yanlış pozitiflik oranının düşük olmasıdır. Bu özellik, özellikle HIV tanısında önemli bir avantaj sağlar. ELISA testi genellikle ilk tarama amacıyla kullanılırken, Western blot testi HIV tanısını doğrulamak amacıyla ikinci aşamada uygulanır ve çok daha yüksek hassasiyet sunar. Günümüzde ticari HIV Western blot kitlerinde viral proteinler doğrudan membrana immobilize edilmekte ve hasta örneklerinden elde edilen antikorların bu proteinlere bağlanması izlenmektedir (Houn vd., 1987).

Western blotlama aynı zamanda Lyme hastalığı ve sığır spongiform ensefalopatisi gibi diğer enfeksiyöz ya da nörodejeneratif hastalıkların

tanısında da kullanılmaktadır (Lloyd ve Hawkins, 2018; Porcario vd., 2011). Klinik uygulamaların ötesinde, bu teknik araştırma alanında da geniş kullanım bulur. Özellikle protein-DNA ve protein-protein etkileşimleri, translasyon sonrası modifikasyonlar, izoform tespiti, epitop haritalama ve hücre altı lokalizasyon analizleri gibi çalışmalar için güçlü bir araçtır (Martins-Gomes ve Silva, 2018). Western blotlama, antikor temelli bir teknik olduğundan dolayı bulaşıcı olmayan hastalıkların tanısında da değerli bilgiler sunar. Örneğin, kanserle ilişkili proteinlerin farklı izoformları, hastalığın ilerleyişi ya da tipiyle ilgili önemli biyobelirteçler olabilir. Ayrıca, çeşitli otoantikorlar, otoimmün hastalıkların tanısında belirleyici rol oynayabilir (Meftahi vd., 2021).

Modern moleküler araştırma uygulamalarında, hedef proteinler sıklıkla kısa peptid etiketleri içerecek şekilde tasarlanır. Bu etiketler, biyolojik sistemde doğal olarak bulunmayan yabancı epitoplardır ve proteinin daha kolay tespit edilmesini sağlar. Örneğin, HA ve Myc etiketleri, Western blotta etikete özgül antikorlar kullanılarak proteinin varlığı ve göreceli miktarını doğrulamak için kullanılır.

#### **4. İMMÜNOLOJİDE İMMÜNOFLORESAN BOYAMA**

İmmünofloresan (IF), hemen her hücre ya da doku tipinde çok sayıda biyolojik bileşenin görselleştirilmesine olanak tanıyan, güçlü ve hassas bir mikroskopik tespit yöntemidir. Bu yüksek çözünürlüklü görselleştirme gücü, floroforlarla konjuge edilmiş özgül antikorların hedef antijenlerle etkileşimi yoluyla sağlanır. IF tekniği hem



araştırmalarda hem de klinik tanıda yaygın uygulama alanı bulmaktadır (Im vd., 2019).

IF değerlendirmesi kültür hücreleri, hücre süspansiyonları, doku kesitleri ve hatta tüm organizmalar üzerinde gerçekleştirilebilir. Taze biyolojik örnekler, doğrudan dondurulabildikleri gibi, Michel taşıma ortamında oda sıcaklığında 72 saate kadar saklanarak da analiz için uygun hale getirilebilir.

#### **4.1. Fiksasyon ve Numune Hazırlığı**

Fiksasyon, otolizi engellemek ve antijenik yapıları koruyarak morfolojik bütünlüğü sürdürmek amacıyla IF protokolünün kritik bir adımıdır. İdeal fiksatif, hücresel mimariyi bozmaksızın antijenleri stabilize eder ve antikorların hedef bölgelere ulaşmasını kolaylaştırır. Ancak, hiçbir fiksatif tüm epitoplari eşit Şekilde koruyamaz; dolayısıyla, optimal fiksatif ve fiksasyon süresi numune tipi ve hedef antijene göre ampirik olarak belirlenmelidir (Im vd., 2019).

Kimyasal fiksatifler çapraz bağlayıcı reaktifler (rn. formaldehit, glutaraldehit) veya organik çözücüler (rn. metanol, aseton) olabilir. Çapraz bağlayıcı ajanlar, moleküller arası metilen köprüleri oluşturarak proteinleri stabilize ederken, organik çözücüler hücre zarını geçirgen hale getirerek ek permeabilizasyon adımına olan ihtiyaı ortadan kaldırır (Im vd., 2019).

## 4.2. Parafin Gömme-Kesit Alma-Depararifizasyon

Fiksasyonu takiben dokular genellikle parafine gömülür. Sertleştirilmiş bloklardan alınan ince kesitler, lam üzerine monte edilerek çok katmanlı hücre yapılarında hedef bölgelere antikor ve boyaların etkin erişimini sağlar. Parafin bloklar oda sıcaklığında saklanabilir ancak nemden ve ışıktan korunmalıdır. Kesitler lam üzerine alındıktan sonra, ksilen ile deparafinizasyon ve ardından etanol-destile su yıkamalarıyla rehidrasyon işlemi gerçekleştirilir (Im vd., 2019).

## 4.3. Antijen Geri Kazanımı (Retrieval)

Fiksasyon sırasında oluşan kimyasal çapraz bağlar, epitoplarmın maskelenmesine ve antikorlarla etkileşime girememesine neden olabilir. Bu durumu düzeltmek için antijen geri kazanımı uygulanır. İki ana yöntem mevcuttur:

- PIER (Proteaz İndüklenmiş Epitop Alımı): Proteinaz K, tripsin gibi enzimlerle epitoplarmın maskesi kaldırılır. Ancak, yüksek enzim aktivitesi doku morfolojisini bozabilir; bu nedenle inkübasyon süresi ve enzim konsantrasyonu dikkatle optimize edilmelidir.
- HIER (Isı İndüklenmiş Epitop Alımı): Isı ve pH kontrollü tamponlarla protein konformasyonu geri kazandırılır. Kullanılan tamponlar düşük (glisin-HCl), nötr (sitrik asit) veya yüksek pH (Tris, EDTA) özellikte olabilir. Her protokol, hedef proteine ve doku tipine göre optimize edilmelidir (Im vd., 2019).

#### **4.4. İmmünofloresan Yöntem Türleri: Doğrudan ve Dolaylı**

IF uygulamaları doğrudan ve dolaylı IF olmak üzere iki temel yönteme ayrılır:

- Doğrudan IF: Florofor doğrudan birincil antikora konjuge edilmiştir. Hızlıdır ancak sinyal amplifikasyonu sınırlıdır.
- Dolaylı IF: Birincil antikor hedef epitopa bağlandıktan sonra, floroforla işaretli ikincil antikor eklenir. Bu yöntem, daha yüksek hassasiyet ve sinyal şiddeti sağlar. Aynı örnek içinde birden fazla antijenin eşzamanlı görselleştirilmesine de olanak tanır.

Antikor seçimi yapılırken tür uyumu ve çapraz reaktiviteye dikkat edilmelidir. İkincil antikorun, birincil antikorun üretildiği türe karşı geliştirilmiş olması gerekir. Ayrıca, sinyal amplifikasyonu için poliklonal antikorlar veya biyotin–streptavidin sistemleri de kullanılabilir (Im vd., 2019).

#### **4.5. Bloklama, Arka Planın Azaltılması, Florofor Seçimi ve Görüntüleme**

Antikorlarla spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek için bloklama işlemi uygulanır. Bloklama ajanları arasında BSA, süt proteini (kazein), jelatin, normal serum ve proteinsiz ticari tamponlar yer alır. Uygun bloklama koşulları deneysel olarak optimize edilmelidir (Im vd., 2019).

Florofor seçiminde; kullanılacak mikroskop türü (konfokal, epifloresan), floroforun sönme katsayısı, kuantum verimi ve fotostabilitesi göz önünde bulundurulmalıdır. En yaygın floroforlar arasında FITC ve TRITC bulunur. Birden fazla floroforun aynı anda kullanılması durumunda, spektral örtüşmeye dikkat edilmeli ve uygun kombinasyonlar tercih edilmelidir (Im vd., 2019).

#### **4.6. Sinyal Amplifikasyonu ve Multiplex Uygulamalar**

IF sistemleri, poliklonal ikincil antikorlar ve biyotin-streptavidin yapılar gibi amplifikasyon sistemleriyle sinyal şiddetini artırabilir. Bu, özellikle düşük düzeyde ifade edilen proteinlerin görselleştirilmesinde avantaj sağlar. Ayrıca, farklı renklerdeki floroforlar sayesinde çoklu antijen tespiti (multiplex) mümkün olur. Bu da IF'yi ko-lokalizasyon çalışmaları, protein ekspresyon profili çıkarımı ve yüksek çözünürlüklü mikroskopik analiz için ideal bir teknik haline getirir (Im vd., 2019).

Konfokal mikroskoplar sayesinde, kromojenik tekniklerdeki dağınık çökelti yerine keskin ve kantitatif görüntüler elde edilir. IF'nin bu üstün görüntüleme kapasitesi, modern mikroskopik tanı ve araştırmalarda vazgeçilmez hale gelmiştir.

### **5. İMMUNOHİSTOKİMYA**

İmmünohistokimya (IHC), anatomik cerrahi patolojide hücre sınıflandırması ve teşhis amacıyla yaygın olarak kullanılan yardımcı bir test yöntemidir. Bu teknik, hücre veya doku örneklerinde yer alan belirli antijenlere karşı geliştirilen özgül antikorların kullanımıyla, hücre

tipinin ve köken organın belirlenmesine olanak tanır. IHC en yaygın olarak formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) dokular üzerinde uygulanır. FFPE dokular, uzun süreli saklama kolaylığı sağlasa da teknik ilk kez dondurulmuş kesitler üzerinde geliştirilmiş olup, plastik gömülü dokularda da uygulanabilir (Taylor, 2014; Coons vd., 1941).

Son yıllarda IHC, yalnızca tanı koymakla sınırlı kalmayıp aynı zamanda meme, gastrointestinal sistem, akciğer, hematolenfoid ve merkezi sinir sistemi gibi birçok malignitede prediktif ve prognostik biyobelirteçlerin değerlendirilmesi amacıyla da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Chen ve Lin, 2015; Yong vd., 2014; Fitzgibbons vd., 2014).

### **5.1. İmmünohistokimya Protokolü ve Antijen Geri Kazanımı**

IHC prosedürü sırasıyla şu basamaklardan oluşur: antijen geri kazanımı (AR), birincil antikorun uygulanması, ikincil antikorun eklenmesi ve bir tespit reaktifi ile görselleştirme. Antijen geri kazanımı (AR), fiksasyon sırasında maskelenmiş antijen bölgelerini açığa çıkararak antikorların bağlanmasını kolaylaştıran ilk adımdır. Shi ve arkadaşları tarafından tanımlanan bu teknik, IHC'nin duyarlılığını önemli ölçüde artırarak uygulama alanını genişletmiştir (Fitzgibbons vd., 2014).

Farklı antijenler ve antikorlar için çeşitli antijen geri kazanım yöntemleri mevcuttur. En yaygın yöntem, ısıya bağlı antijen geri kazanımıdır (HIAR). Bu işlemde mikrodalga, düdüklü tencere, otoklav ya da su banyosu kullanılarak ısı uygulanır (Shi vd., 2011). Alternatif

olarak, enzim sindirimi, denatürant (formik asit, üre), deterjanlar (Triton X-100, SDS) ve oksitleyici ajanlar ( $H_2O_2$ ) gibi kimyasal yöntemler de kullanılabilir. Her yöntemin etkinliği hedef antijenin yapısına ve dokunun işlenme şekline bağlı olarak değişir.

## **5.2. Antikor Uygulaması ve Etiketleme Yöntemleri**

Birincil antikorlar, hedef antijene bağlanma özgülüğü açısından dikkatle titre edilmelidir. Monoklonal antikorlar yüksek özgüllük sunarken, poliklonal antikorlar daha yüksek hassasiyet sağlayabilir (Magaki vd., 2019). Başlangıç konsantrasyonu genellikle 1–5  $\mu\text{g/mL}$  arasında önerilir ve optimum seyreltme, pozitif kontrol dokular ile belirlenir. Boyama başarısını etkileyen diğer bir parametre ise antijen geri kazanım yöntemi, kullanılan kromojen ve ikincil antikorun dilüsyonudur (Magaki vd., 2019).

Antijen-antikor etkileşimini mikroskop altında görünür hale getirmek için antikorların etiketlenmesi gerekir. Doğrudan yöntemde, florofor ya da enzim birincil antikora konjuge edilir; ancak bu yöntem düşük sinyal nedeniyle nadiren tercih edilir. Dolaylı yöntem daha yaygın olup, florofor veya enzim ikincil antikora bağlanır; bu sayede sinyal amplifikasyonu sağlanır ve çeşitli birincil antikorlarla uyumluluk elde edilir (Magaki vd., 2019).

### **5.3. Tespit Sistemleri ve Sinyal Amplifikasyonu**

Görselleştirme, etiketli antikorlarla yapılan reaksiyon sonucunda gerçekleşir. En yaygın tespit sistemleri; horseradish peroksidaz (HRP) ve alkalın fosfataz gibi enzimlerle konjuge antikorlar ve bunlara karşılık gelen kromojenik substratlar (örneğin DAB) ile yapılır. Alternatif olarak, immünofloresan teknikler de kullanılabilir; ancak bu yöntemler için floresan mikroskopu gereklidir (Magaki vd., 2019).

Klasik avidin-biotin-peroksidaz yöntemi, endojen biotine bağlı olarak yüksek arka plan oluşturabileceğinden günümüzde yerini polimer bazlı sistemlere bırakmıştır. Bu sistemler, dekstran polimer omurgasına bağlı çok sayıda enzim molekülü ve ikincil antikor içererek daha güçlü sinyal üretimi sağlar (Magaki vd., 2019).

### **5.4. Arka Plan Boyaması ve Engelleme Stratejileri**

Nonspesifik antikor bağlanması ve endojen enzim aktivitesi, özellikle kemik iliği gibi hematopoetik hücrelerin yoğun olduğu dokularda, arka plan boyamasına neden olabilir. Bu sorunu önlemek için, ikincil antikorla aynı türden normal serum veya ticari bloke edici ajanlarla ön inkübasyon yapılabilir. Ayrıca, dokulara antikor uygulanmadan önce hidrojen peroksit ile ön muamele, endojen peroksidaz aktivitesini baskılayarak arka planı azaltır (Magaki vd., 2019).

## 5.5. İmmünohistokimya ile İmmünofloresandaki Farklılıklar

IF, hücre içi lokalizasyon, ko-lokalizasyon ya da aynı anda birden fazla proteini analiz etmek istendiğinde tercih edilir.

IHC, klinik patolojide tanı koymak, biyobelirteç tespiti yapmak ve arşivlenebilir kalıcı lamalar elde etmek için daha yaygındır.

IF, floresan ışık kullanarak hedef proteini parlayan bir sinyal olarak gösterir. Bu, özellikle hücre içi lokalizasyonu net biçimde ortaya koyar. Örneğin, bir protein çekirdekte mi yoksa sitoplazmada mı? Bunu IF çok hassas şekilde gösterebilir. IHC ise klasik ışık mikroskopuyla renkli çökeltiler oluşturur (örneğin kahverengi DAB sinyali) ve tanı koymak için daha kullanışlıdır çünkü mikroskopi eğitimi olmayan biri bile boyalı alanları daha kolay ayırt edebilir (Tablo 1).

**Tablo 1.** IF ve IHC'deki farklılıklar

Özellik	IF	IHC
<b>Tespit Mekanizması</b>	Fluoroforla işaretli antikorlar	Enzimle işaretli antikorlar
<b>Görselleştirme</b>	Fluoresan mikroskop (ışık)	Işık mikroskopu (renkli çökelti)
<b>Sinyal</b>	Floresans (örneğin FITC, TRITC)	Kromojenik renk (örneğin DAB kahverengi)
<b>Avantajı</b>	Çoklu hedefler aynı anda görülebilir (multiplexing)	Daha dayanıklı preparat, kolay arşivlenebilir



<b>Dezavantajı</b>	Fotobozunma (floresan zamanla solar), pahalı cihaz gerekir	Multiplexing sınırlı, arka plan sorunu olabilir
--------------------	--	---

## 6. AKIŞ SİTOMETRİSİ

Akış sitometrisi, tamponlanmış bir tuz çözeltisinde süspansiyon edilen tek hücre veya partiküllerin, lazer ışınları önünden hızla geçerken analiz edilmesini sağlayan güçlü bir hücresel analiz teknolojisidir. Her bir partikül, görünür ışık saçılımı ve bir veya daha fazla floresan parametre açısından değerlendirilmektedir. Işık saçılımı, iki yönde ölçülür: ileri saçılım (FSC), hücrenin göreceli büyüklüğünü yansıtırken; yan saçılım (SSC), hücrenin içsel granüleritesini veya kompleksliğini gösterir. Bu parametreler floresan sinyallerden bağımsızdır (Barteneva vd., 2012).

Örnek hazırlığı, hedeflenen parametrelere göre değişiklik gösterir. Floresan proteinlerin transfeksiyonu (örneğin GFP), DNA boyaması (örneğin Propidium İyodür) veya floresanla konjuge antikorlar (örneğin CD3-FITC) en yaygın uygulamalardır. Bu sayede hücresel fenotipleme, yaşam/ölüm analizi, proliferasyon, apoptoz ve protein ekspresyonu gibi birçok parametre aynı anda değerlendirilebilir (Han vd., 2014).

Akış sitometrisi; immünoloji, moleküler biyoloji, viroloji, kanser araştırmaları ve bulaşıcı hastalık takibi gibi çok sayıda alanda geniş uygulama alanına sahiptir. Kan ve kemik iliği gibi sıvı örnekler ile birlikte; lenf düğümleri, dalak ve katı tümörler gibi dokulardan elde edilen tek hücre süspansiyonları da analiz edilebilir. Ayrıca, hücrelerin

yalnızca analiz edilmesiyle sınırlı kalmayıp, ayrılması (cell sorting) için de akış sitometrisinden yararlanılmaktadır (Leipold vd., 2015).

Teknolojik gelişmeler, akış sitometrisi sistemlerini büyük ölçüde çeşitlendirmiştir. Günümüzde, 96 kuyucuklu plaka okuyucular, mikroskopi ile entegre sistemler, hatta kütle sitometrisi (CyTOF) gibi ileri düzey sistemler mevcuttur. Bu sistemler, karmaşık çoklu analizlerin yapılmasına olanak sağlar.

Son yıllarda, reaktiflerin çeşitlenmesi ve özellikle florokrom teknolojilerindeki gelişmeler, akış sitometrisinin çok parametreliliğini artırılmıştır. Özellikle tandem boyalar, polimer boyalar ve yeni floresan proteinler (örneğin mCherry, mNeptune) kullanılarak, 30'dan fazla parametrenin eşzamanlı ölçümü mümkün hale gelmiştir. Bu gelişmeler, aynı hücrede birçok biyobelirteç hakkında bilgi edinilmesini sağlayarak sistem biyolojisi yaklaşımını desteklemektedir.

Veri analizi, akış sitometrisi deneylerinin en kritik adımlarındandır. Geleneksel olarak iki parametrelili nokta grafikleri (dot plot) kullanılsa da, parametre sayısının artmasıyla birlikte PCA (Principal Component Analysis), SPADE, ve tSNE gibi yüksek boyutlu veri analiz yöntemleri önem kazanmıştır. Bu algoritmalar sayesinde, karmaşık hücre alt popülasyonları tespit edilmekte ve biyolojik verilerden anlamlı bilgiler çıkarılmaktadır (Mei vd., 2016; Matz vd., 1999).

## 6.1. Geleneksel Akış Sitometresi

Geleneksel akış sitometreleri üç ana bileşenden oluşur: akışkan sistemi, optik sistem ve elektronik sistem.

- Akışkan sistemi, numuneyi lazerin kesişme noktasına yönlendirmek ve hidrodinamik odaklama sağlamak için genellikle tamponlanmış tuzlu su çözeltisi olan bir kılıf sıvısı kullanır.
- Optik sistem, lazerler (uyarma optikleri), fotoçoğaltıcı tüpler (PMT'ler) ve fotodiyotlar (toplama optikleri) içerir. Dikroik filtreler, farklı dalga boylarındaki floresan sinyalleri uygun dedektörlere yönlendirirken; bant geçiren filtreler, dedektörlerin okuyacağı ışığın dalga boyu aralığını belirler.
- Elektronik sistem, dedektörlerden gelen analog sinyalleri dijital sinyallere dönüştürerek bilgisayarda analiz edilebilir hale getirir.

Geleneksel sistemlerde genellikle 20 parametreye kadar (FSC, SSC ve 18 floresan kanal) analiz yapılabilirken, bazı gelişmiş cihazlarda 30–50 parametre analiz edilebilir. En sık kullanılan lazerler: 405 nm, 488 nm, 532/552/561 nm, 640 nm ve 355 nm'dir. PMT'lerin yerine çığ fotodiyotları (APD) gibi daha hassas dedektörler de bazı cihazlarda tercih edilmektedir (Czerkinsky vd., 1983).

## **6.2. Akustik Odalama Sitometrisi**

Bu sistemler, hücreleri lazer ışını önüne daha stabil şekilde hizalamak için ultrasonik dalgalar kullanır. Bu teknoloji, yüksek örnek giriş hızı ve düşük tıkanma riski sunar. Tipik olarak 4 lazer ve 14 floresan kanal kapasitesine sahiptir (Czerkinsky vd., 1983).

## **6.3. Hücre Ayırıcı Sitometre (Cell Sorter)**

Hücre sıralayıcıları, belirli fenotiplere sahip hücre popülasyonlarını izole edip fiziksel olarak toplama kaplarına yönlendirebilen sistemlerdir. Numune, yüksek frekansta salınımlar ile damlalara ayrılır, ardından bu damlalara yük verilerek metal saptırma plakaları aracılığıyla toplanır (Czerkinsky vd., 1983). İki ana sistem mevcuttur:

- Kuvars küvet tabanlı sistemler: daha stabil ve hizalama gerektirmez.
- Jet-in-air sistemler: küçük partikül ayrımı için daha uygundur ancak günlük lazer hizalaması gerektirir (Czerkinsky vd., 1983).

## **6.4. Görüntüleme Akış Sitometrisi**

Görüntüleme Akış Sitometrisi, akış sitometrisini floresan mikroskopi ile birleştirerek hem hücre morfolojisi hem de çok parametrelili floresan analizini aynı anda yapabilir. Bu sistemler, ko-lokalizasyon, sinyalizasyon, DNA hasarı ve hücreler arası etkileşim gibi uygulamalarda öne çıkar (Czerkinsky vd., 1983).

## 6.5. Diğer Akış Sitometreleri

Kütle sitometrisi, antikorları floresan etiketler yerine ağır metal iyonları (genellikle lantanitler) ile işaretleyerek uçuş zamanı kütle spektrometrisi ile tespit yapar. Bu sistemlerde oto-floresans yoktur ve spektral örtüşme olmadığı için kompanzasyon gerekmez. Ancak numune işlem sırasında yok edilir ve hücre ayırma yapılamaz. Tipik analiz hızı geleneksel sistemlerden daha düşüktür (yaklaşık 1000 hücre/saniye).

Multiplex boncuk dizisi analizleri, küçük örnek hacminde çok sayıda analitin ölçümü için tasarlanmıştır. Yakalama boncukları ve raportör moleküller sayesinde 100'e kadar ELISA eşdeğeri analiz yapılabilir. Bu sistemler, iki lazerli kompakt cihazlar ve 96 veya 384 kuyucuklu plakalar ile çalışır (Czerkinsky vd., 1983).

Spektral analizörler, her floroforun tüm emisyon spektrumunu ölçerek sinyalleri karıştırmadan ayrıştırabilir. Bu yöntem, geleneksel PMT sistemlerinin yerini almaya başlamıştır. Özellikle yüksek parametrelili deneyler için spektral örtüşme problemi ortadan kaldırılmış olur.

Yeni detektör sitometreleri; PMT (Photomultiplier Tube) sistemleri hâlâ standarttır.

APD (Avalanche Photodiode) ve SiPD (Silicon Photodiode) gibi katı hal dedektörleri, özellikle kırmızı ve yakın IR spektrumlarında daha hassas tespit sağlayabilir ve yeni nesil cihazlarda giderek daha fazla kullanılmaktadır (Czerkinsky vd., 1983).

## **6.6. Akış Sitometrisinde Kullanılan Reaktifler ve Uygulama Alanları**

Akış sitometrisinde kullanılan reaktifler, analiz edilen hücresel parametrelerin çeşitliliği ve deneyin hedefi doğrultusunda büyük bir yelpazeye yayılır. Bu reaktifler arasında küçük organik floroforlar, protein bazlı boyalar, polimerler, kuantum noktalar, metal konjugatlar ve canlılık, proliferasyon gibi fonksiyonel belirteçler yer alır. Aşağıda reaktif türleri ve kullanım alanları detaylı şekilde ele alınmaktadır.

Fluorescein, Alexa Fluor 488, Texas Red, Alexa Fluor 647, Pacific Blue ve Cy5 gibi küçük moleküller, akış sitometrisinde antikora konjuge edilmek üzere sıklıkla kullanılır. Bu moleküller genellikle dar spektral yayılıma, iyi tanımlanmış uyarım/emisyon özelliklerine ve yüksek fotostabiliteye sahiptir. Alexa Fluor boyaları, özellikle fotobozunmaya karşı dayanıklılık açısından tercih edilir.

Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) ve PerCP gibi fikobiliproteinler, deniz organizmalarından türetilmiş büyük protein kompleksleridir. Büyük moleküler yapıları sayesinde güçlü sinyal üretirler ve özellikle düşük yoğunlukta antijenlerin saptanmasında kullanışlıdır. Ancak fotobozunmaya karşı daha hassastırlar, bu nedenle kısa süreli analizlerde tercih edilir.

Qdots, çok dar emisyon spektrumlarına sahip yarı iletken nanokristaller olup, UV veya mor lazerlerle etkin şekilde uyarılırlar. Spektral örtüşme ve telafi sorunları ile konjugasyon zorlukları nedeniyle son zamanlarda polimer boyalar tarafından büyük ölçüde yer değiştirilmiştir.

Brilliant Violet (BV), Brilliant Ultraviolet (BUV) ve Brilliant Blue (BB) gibi polimer boyalar, yüksek fotostabilite ve kuantum verimliliğine sahiptir. Lazer-spesifik emilim özellikleri sayesinde çoklu parametrelili analizlerde floresanlar arası spektral çakışmayı azaltarak daha yüksek çözünürlük sağlar.

Tandem boyalar, FRET (floresan rezonans enerji transferi) mekanizmasıyla enerji transferi yaparak sinyal gücünü artırır. PE-Cy7, APC-Cy5 gibi boyalar bu gruba örnektir. Yüksek parlaklıklarına karşın, tandem boyalar lotlar arasında değişkenlik gösterebilir ve bu da telafi işlemlerini zorlaştırabilir.

Kütle sitometrisinde kullanılan antikolar, lantanit serisinden tek izotoplu ağır metal iyonları ile etiketlenir. Bu etiketler floresan sinyal üretmez; bunun yerine uçuş zamanı kütle spektrometresiyle tespit edilir. Bu yaklaşım, spektral örtüşme sorununu ortadan kaldırırken, hücreleri yok ederek ölçüm yaptığı için hücre sıralaması yapılamaz.

GFP, YFP, CFP, DsRed ve mCherry gibi floresan proteinler, gen ekspresyonunun takibinde raportör sistemler olarak kullanılır. Günümüzde ultraviyolede yakın kızılötesine kadar uzanan geniş bir spektrumda yüzlerce farklı floresan protein mevcuttur. Modern akış sitometrelerinin çoklu lazer yapısı sayesinde bu proteinlerin büyük çoğunluğu kullanılabilir hale gelmiştir.

Propidium Iodide (PI), DAPI, 7AAD ve Hoescht gibi DNA/RNA bağlayıcı boyalar, hücre döngüsü analizi, canlılık tayini ve kök hücre

izolasyonu gibi uygulamalarda kullanılır. Ayrıca kromozomal farklılıkları belirlemek için de kullanılabilirler.

CFSE ve benzeri boyalar, hücre bölünmesini takip etmek için kullanılır. Her bölünmede boya miktarı yarıya iner, böylece hücrelerin kaç kez bölüdüğü hesaplanabilir. Bu yöntem, uzun süreli proliferasyon analizleri için idealdir.

Canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırmak için PI, DAPI gibi dışlama boyları kullanılır. Fixable Viability Dyes gibi amin bağlayıcı boylar ise hücre sabitlemesiyle uyumlu olup enfeksiyöz materyallerde güvenle kullanılabilir.

Hücre içi kalsiyum seviyelerini ölçmek için indo-1, fluo-3 gibi boylar kullanılır. Bu boylar kalsiyuma bağlandıklarında emisyon özelliklerini değiştirir ve sinyalizasyon olaylarının takibinde kritik rol oynar (Czerkinsky vd., 1983).

## **6.7. Akış Sitometresinde İmmünolojik Uygulamalar**

Akış sitometrisi, özellikle immünoloji alanında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. En yaygın uygulaması olan immünofenotipleme, karmaşık hücre popülasyonlarının yüzey ve hücre içi belirteçlere göre tanımlanmasını sağlar.

CD belirteçleri (Cluster of Differentiation), hücre yüzeyi proteinlerini tanımlamak için kullanılır. Örneğin:

- CD3, CD4, CD8: T hücrelerini tanımlar



- CD19, CD20: B hücrelerine özgüdür
- CD14, CD11b: Monositlerin işaretleyicileridir
- CD56, CD161: NK hücrelerinin tanımlanmasında kullanılır

Bu soy belirteçlerinin yanı sıra:

- CD25, CD69, CD62L gibi aktivasyon belirteçleri,
- CD45RO, CD27 gibi hafıza belirteçleri,
- CCR5, CXCR4, CCR6 gibi kemokin reseptörleri ve doku homing markerları,
- FoxP3, Ki67, IFN- $\gamma$ , IL-2 gibi hücre içi proteinler

ile hücrelerin fonksiyonel durumu detaylı olarak analiz edilebilir. Modern sitometreler, 28 parametreye kadar eşzamanlı analiz kapasitesine sahip olsa da tipik immünofenotiplleme panelleri 12–15 renk civarında tutulmaktadır (Czerkinsky vd., 1983).

## **7. İMMÜNOLOJİDE ELİSPOT KULLANIMI**

T lenfositleri, patojenlere, mikroplara ve virüslere karşı harekete geçen adaptif immün sistemin merkezi bir bileşenidir. Somatik hipermutasyon ve rekombinasyon, patojenik faktörlerin seçici olarak tanınmasını sağlayan ve antijen özgüllüğü olarak adlandırılan bir T-hücre reseptörleri (TCR) repertuarı oluşturur. T-hücresi hafızası, bireyin tüm yaşam süresi boyunca artan spesifik TCR havuzlarına dayanır. Antijene

özgü T-hücreleri, adaptif bağışıklık yanıtında kendine özgü ve kendine özgü olmayan antijenler arasında ayırım yapar ve aktive olarak özdeş antijen spesifiklikleri taşıyan B-hücresi klonlarını uyarır. Bu nedenle, antijene özgü B-hücrelerinin gelişimi, aktivasyonu ve klonal genişlemesi adaptif bağışıklık yanıtı için kritik adımlardır. Antijene özgü B-hücreleri alerji, konak savunması ve otoimmünitede kilit rol oynar. Bu nedenle, bu hücre alt kümesi immünolojik ve klinik araştırmalarda ilgi çekicidir. Antijene özgü hücreler ve özellikle bunların bellek alt kümeleri çok düşük sıklıkta ortaya çıkar. Bu nedenle, yalnızca enzime bağlı immünospot (ELISPOT) testi gibi çok hassas teknikler T-hücre alt kümelerini tespit etme ve analiz etme yeteneğine sahiptir. İlk ELISPOT testi 1983 yılında spesifik antikor salgılayan lenfositlerin sayımı için tanımlanmış (Czerkinsky vd., 1983; Sedgwick ve Holt, 1983) ve son yıllarda daha da geliştirilmiştir. Günümüzde ELISPOT testleri, T ve B lenfositleri, monositler, dendritik hücreler ve doğal halkiller hücreleri dahil olmak üzere tek hücre düzeyinde düşük frekanslı hücre alt kümelerinin tespiti için oldukça hassas ve etkili bir yöntem olarak temel araştırmalardan klinik teşhislere kadar çeşitli uygulamalar için gerçekleştirilmektedir.

ELISPOT analizi alerji, bulaşıcı hastalıklar, kanser, aşılama çalışmaları ve otoimmünite dahil olmak üzere birçok araştırma alanında kullanılmaktadır. Tekrarlanabilirliği yüksek olduğundan ve onaylanmış protokolleri uygulayan çeşitli laboratuvarlar arasında standardizasyon oldukça mümkün olduğundan, ELISPOT tahlili, örneğin bağışıklık tepkilerinin izlenmesi bağlamında olduğu gibi, antijene özgü T

hücrelerinin araştırılması ve karakterizasyonu için klinik teşhis ortamlarında merkezi yöntemlerden birini temsil eder (Möbs ve Schmidt, 2016)

## **8. İmmünolojide Hemaglütinasyon İnhibisyonu (HI) Testi**

Bazı virüslerin, örneğin dang virüsü, adenovirüs, kızamıkçık virüsü, kızamık virüsü ve influenza virüsünün yüzeylelerinde, kırmızı kan hücrelerini (RBC) bağlayarak aglütine eden hemaglütinin (HA) adlı bir antijen bulunur. Bu antijenin, RBC'leri bir araya getirerek aglütinasyonu tetikleme yeteneği, hemaglütinasyon inhibisyonu (HI) testinin geliştirilmesine temel oluşturmuştur.

HI testinde, bir serum örneği mikrotitre plakasında seri olarak seyreltikten sonra belirli bir miktarda viral hemaglütinin eklenir. Ardından uygun türde kırmızı kan hücreleri eklenerek reaksiyon gözlemlenir. Eğer serumda virüse özgü antikorlar mevcutsa, bu antikorlar hemaglütininin RBC'lerle etkileşmesini engeller ve aglütinasyon gerçekleşmez. Reaksiyonun pozitif olarak kabul edilmesi, serbest kalan RBC'lerin mikrotitre plakasının eğilmesiyle "akış" şeklinde gözlemlenmesiyle değerlendirilir. Aglütinasyonun tamamen inhibe edildiği en son serum dilüsyonu, testin pozitifliğini belirler ve bu dilüsyon değeri HI titresi olarak raporlanır (Alladi vd., 2019; Mather vd., 2013).

HI testi, özellikle influenza A (H1N1) pdm09 virüsü (Numazaki, 2015) ve kızamık virüsü (Noah vd., 2009) gibi çeşitli viral enfeksiyonların seroepidemiolojik araştırmalarında yaygın şekilde kullanılmıştır.

Örneğin, bir çalışmada pandemik influenza aşısının immünojenitesini değerlendirmek amacıyla HI testi uygulanmış ve RT-qPCR ile doğrulanmış 79 vaka ile 176 negatif kontrolden elde edilen verilerde %92 duyarlılık ve %91 özgüllük sağlandığı gösterilmiştir (Veguilla vd., 2011; Schiettecatte vd., 2012).

İmmünolojik temelli tanı testleri, insan viral enfeksiyonlarının rutin klinik tanısında dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin avantajları arasında yüksek duyarlılık ve özgüllük, basit uygulama, hızlı sonuç verme ve aynı anda çok sayıda örneğin analiz edilebilmesi sayılabilir. Bununla birlikte, bu testlerin bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Özellikle çeşitli interferans faktörleri test sonuçlarının doğruluğunu olumsuz etkileyebilir. Bunlar arasında:

- Çapraz reaktivite: Numunede, test edilen viral antijenle benzer epitoplara paylaşılan diğer ajanların bulunması yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir (Emerson ve Lai, 2013).
- Endojen antikorlar: Otoantikorlar, heterofilik antikorlar veya insan anti-hayvan antikorları gibi endojen immüno globulinlerin varlığı, tespit antikorlarıyla etkileşerek özgün olmayan bağlanmalara yol açabilir ve yine yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir (Scholzen ve Sauerwein, 2013).
- Endemik bölgelerde düşük özgüllük: Sıtma gibi bazı enfeksiyonların endemik olduğu bölgelerde, Plasmodium enfeksiyonunun yol açtığı poliklonal B hücre aktivasyonu sonucu oluşan geniş özgüllüğe sahip antikorlar, Zika virüsü gibi

diğer viral antijenlerle reaksiyona girebilir. Bu da serolojik testlerde yalancı pozitifliklere neden olabilir. Örneğin, bir çalışmada, PCR ile doğrulanmış sıtma hastalarına ait 34 serum örneğinden 14'ü ZIKV ELISA testinde pozitif veya sınırda sonuç vermiş, ancak bunların 11'inde virüs nötralizasyon testi ile ZIKV enfeksiyonu doğrulanamamıştır (Van Esbroeck vd., 2016).

Ayrıca HI testi, zaman alıcı ve zahmetli bir yöntem olup, standart reaktiflerin yaygın şekilde bulunmaması nedeniyle farklı laboratuvarlar arasında sonuçların karşılaştırılabilirliğini zorlaştırmaktadır. Benzer şekilde, IF testlerinde numunenin uzun süre UV ışığına maruz kalması sonucu floresans sinyalinin azalması, yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir. Bazı immünolojik testlerde kullanılan reaktifler ve ekipmanlar da maliyet açısından kısıtlayıcı olabilir.

## **9. İmmünolojide Rekombinant DNA Teknolojisi**

Rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi, canlı organizmaların genetik materyallerinde değişiklik yaparak bu organizmalarda veya bunların ürünlerinde arzu edilen özelliklerin elde edilmesini amaçlayan bir biyoteknolojik yaklaşımdır. Bu teknoloji, çeşitli kaynaklardan elde edilen DNA parçalarının, uygun bir vektör aracılığıyla hedef gen dizisinin eklenmesiyle gerçekleştirilir (Berk ve Zipursky, 2000). Genom düzeyindeki bu manipülasyon; yeni genlerin ve düzenleyici unsurların eklenmesi, ya da mevcut genetik elemanların

rekombinasyonu yoluyla endojen gen ekspresyonunun azaltılması veya tamamen susturulması şeklinde olabilir (Bazan-Peregrino, vd., 2013).

Rekombinant DNA elde edilmesinde, hedef gen dizilerinin spesifik olarak ayrıştırılması için restriksiyon endonükleazlar ile DNA parçaları kesilir; ardından bu parçalar DNA ligaz enzimi aracılığıyla vektör DNA'sına eklenir. Rekombinant vektör, daha sonra klonlama amacıyla bir konak hücreye aktarılır ve kültürde çoğaltılır. İlgili DNA parçasını taşıyan klonlar seçilerek izole edilir (Venter, 2007).

İlk rekombinant DNA molekülleri 1973 yılında Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang ve Stanley Cohen tarafından üretildi. 1975 yılında yapılan Asilomar Konferansı'nda, bu teknolojinin potansiyel biyogüvenlik riskleri ve düzenleyici çerçevesi tartışılmıştır. O dönem bilimsel camiada var olan çekincelere rağmen, rDNA teknolojisinin tarım ve tıbbi uygulamalarda geniş bir kullanım alanı bulması, başlangıçtaki öngörülere kıyasla daha uzun zaman alsa da, özellikle 1980'lerin ortalarından itibaren terapötik proteinler, hormonlar, aşılar ve tanı araçlarının geliştirilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Bazan-Peregrino vd., 2013).

Rekombinant DNA teknolojisi, genetik ifadenin araştırılması açısından güçlü bir araç sunar. Örneğin, simian virüsü temelli vektörlere insan insülin genlerinin klonlanmasıyla, genetik mutasyonların ekspresyonu kolaylıkla incelenebilir. Benzer şekilde, insan endostatin genini taşıyan adenoviral vektörler, tümör büyümesini anti-anjiyojenik mekanizmalarla inhibe edebilir. Ad-Endo adlı bu vektörün

replikasyonu, başka bir vektör olan dl1520 ile birlikte kullanıldığında artırılabilir (Li vd., 2013).

Buna ek olarak, hedeflenmiş gen bozulması teknikleriyle, benzer biyosentetik yollar kullanan konak organizmalarda antitümör bileşiklerin üretimi sağlanabilmektedir (Méndez ve Salas, 2003). Ayrıca, terapötik proteinlerin etki süresini uzatmak amacıyla glikozilasyon bölgeleri içeren dizilerle modifiye edilmiş proteinler de geliştirilmiştir. Örneğin, FSH  $\beta$ -alt birimi ile hCG  $\beta$ -alt biriminin C-terminal peptidini içeren kimerik genler bu amaca yönelik oluşturulmuştur (Fauser vd., 2009).

Günümüzde gen terapisi ve genetik modifikasyon uygulamaları için çeşitli vektör sistemleri geliştirilmiştir. Viral vektörler, klinik uygulamalarda özellikle dikkat çekmekte olup bazıları ticarileştirilmiştir. Klinik kullanıma uygun viral vektörler, in vivo veya ex vivo gen tedavisi, aşı geliştirme ve protein transdüksiyon gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Ancak retroviral vektörlerin ciddi yan etki potansiyeli nedeniyle kullanımı azalmıştır. Alternatif olarak, doğrudan “çıplak” DNA'nın hedef dokulara (özellikle kas dokusuna) enjekte edilmesi, düşük yan etki riskiyle birlikte etkili gen ekspresyonu sağlamaktadır (Khan vd., 2016).

Rekombinant DNA'nın E. coli hücrelerine elektroporasyonla aktarılması amacıyla geliştirilen P1 vektörleri, büyük DNA parçalarının klonlanması için kullanılmakta ve bu sistem ortalama 130-150 kb boyutlarında 15.000 klon içeren gen kütüphanelerinin oluşturulmasına

olanak sağlamaktadır. Bu tür PAC (P1-derived artificial chromosome) klonlama sistemleri, karmaşık genom analizi ve gen haritalama çalışmalarında oldukça faydalıdır (Khan vd., 2016). Ayrıca, düşük kopya sayılı vektörler olan pWSK29, pWKS30, pWSK129 ve pWKS130 gibi plazmidler, PCR ve rDNA teknolojisi ile geliştirilmiştir. Bu vektörler, tek yönlü delesyon oluşturma, tamamlayıcılık analizleri, DNA dizileme ve transkripsiyon çalışmaları gibi çok çeşitli moleküler biyoloji uygulamalarında kullanılmaktadır (Khan vd., 2016).

## **10. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME**

İmmünolojide kullanılan temel araştırma yöntemleri, immün sistemin karmaşık bileşenlerini moleküler, hücresel ve fonksiyonel düzeyde anlamamıza olanak sağlayarak, inflamasyonun mekanizmaları ve çeşitli hastalıkların patogenezi hakkında derinlemesine bilgi sunmaktadır. Akış sitometrisi, ELISA, immünohistokimya, immünofloresan ve Western blot gibi teknikler; immün hücrelerin fenotipik özelliklerini, sitokin düzeylerini, protein ekspresyonlarını ve hücre içi sinyal yollarını analiz ederek, hem doğuştan hem de adaptif immün yanıtların ayrıntılı bir şekilde incelenmesini mümkün kılar. Bu yöntemlerle elde edilen veriler, enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, alerjiler ve kanser gibi immün sistemi ilgilendiren durumların inflamatuvar yanıtları ile nasıl şekillendiğini ortaya koymak açısından kritik öneme sahiptir. İnflamasyonun düzenlenememesi, doku hasarına ve kronik hastalıkların gelişimine yol açabileceğinden, bu yöntemlerle yapılan araştırmalar, hastalıkların moleküler temellerinin



aydınlatılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından da büyük katkı sağlamaktadır.

## 11. KAYNAKÇA

- Alladi, C. S. H., Jagadesh, A., Prabhu, S. G., ve Arunkumar, G. (2019). Hemagglutination inhibition antibody response following influenza A(H1N1)pdm09 virus natural infection: a cross-sectional study from thirthahalli, Karnataka, India. *Viral Immunology*. 32(5), 230–233.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., ve Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5350–5354.
- Andrade, C. (2013). Signal-to-noise ratio, variability, and their relevance in clinical trials. *The Journal of clinical psychiatry*, 74(5), 479–481.
- Andrade, C. (2019). Multiple Testing and Protection Against a Type 1 (False Positive) Error Using the Bonferroni and Hochberg Corrections. *Indian journal of psychological medicine*, 41(1), 99–100.
- Andrade, C. (2020). Sample Size and its Importance in Research. *Indian journal of psychological medicine*, 42(1), 102–103.

- Atzori, L., Deidda, S., ve Aste, N. (2008). Enzyme-linked immunosorbent assay in autoimmune blistering diseases: preliminary experience of the Dermatology Department of Cagliari. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*, 143(1), 1–8.
- Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15.
- Ayoade, F. ve Kumar., S. (2022, October). *Varicella-zoster virus (chickenpox)*. Ncbi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448191/>
- Baillie, G. J., Galiano, M., Agapow, P. M., Myers, R., Chiam, R., Gall, A., Palser, A. L., Watson, S. J., Hedge, J., Underwood, A., Platt, S., McLean, E., Pebody, R. G., Rambaut, A., Green, J., Daniels, R., Pybus, O. G., Kellam, P., ve Zambon, M. (2012). Evolutionary dynamics of local pandemic H1N1/2009 influenza virus lineages revealed by whole-genome analysis. *Journal of virology*, 86(1), 11–18.
- Banfi, G., Salvagno, G. L., ve Lippi, G. (2007). The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 45(5), 565–576.

- Barteneva, N. S., Fasler-Kan, E., ve Vorobjev, I. A. (2012). Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 60(10), 723–733.
- Bayot, M. L. ve Tadi, P. (2023, August). *Laboratory tube collection*. Ncbi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555991/>
- Bazan-Peregrino, M., Sainson, R. C., Carlisle, R. C., Thoma, C., Waters, R. A., Arvanitis, C., Harris, A. L., Hernandez-Alcoceba, R., ve Seymour, L. W. (2013). Combining virotherapy and angiotherapy for the treatment of breast cancer. *Cancer gene therapy*, 20(8), 461–468.
- Berk, A., ve Zipursky, S. L. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York, NY, USA: WH Freeman
- Bexfield, N., ve Kellam, P. (2011). Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 190(2), 191–198.
- Boriskin, Y. S., Rice, P. S., Stabler, R. A., Hinds, J., Al-Ghusein, H., Vass, K., ve Butcher, P. D. (2004). DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5811–5818.

- Bowen, R. A., ve Remaley, A. T. (2014). Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochemia medica*, 24(1), 31–44.
- Bumgarner, R. (2013). Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 22, Unit–22.1.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112(2), 195–203.
- Cella, L. N., Blackstock, D., Yates, M. A., Mulchandani, A., Chen, W. (2013). Detection of RNA viruses: current technologies and future perspectives. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 23(2), 125–137.
- Chen, Z. E. ve Lin, F. (2015). Overview of predictive biomarkers and integration of IHC into molecular pathology, Springer, New York
- Chiu, C. Y., Urisman, A., Greenhow, T. L., Rouskin, S., Yagi, S., Schnurr, D., Wright, C., Drew, W. L., Wang, D., Weintrub, P. S., Derisi, J. L., ve Ganem, D. (2008). Utility of DNA microarrays for detection of viruses in acute respiratory tract infections in children. *The Journal of pediatrics*, 153(1), 76–83.

- Cobo, F. (2012). Application of molecular diagnostic techniques for viral testing. *The Open Virology Journal*, 6(1), 104–114
- Coons, A. H., Creech, H. J., ve Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*, 47, 200–202
- Cornes, M., van Dongen-Lases, E., Grankvist, K., Ibarz, M., Kristensen, G., Lippi, G., Nybo, M., Simundic, A. M., ve Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) (2017). Order of blood draw: Opinion Paper by the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 55(1), 27–31.
- Czerkinsky, C. C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O., ve Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 109–121.
- Dankbar, D. M., Dawson, E. D., Mehlmann, M., Moore, C. L., Smagala, J. A., Shaw, M. W., Cox, N. J., Kuchta, R. D., ve Rowlen, K. L. (2007). Diagnostic microarray for influenza B viruses. *Analytical chemistry*, 79(5), 2084–2090.

- Dessilly, G., Goeminne, L., Vandenbroucke, A. T., Dufrasne, F. E., Martin, A., ve Kabamba-Mukadi, B. (2018). First evaluation of the Next-Generation Sequencing platform for the detection of HIV-1 drug resistance mutations in Belgium. *PloS one*, *13*(12), e0209561.
- Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A. M., Raangs, E. C., Rosema, S., Veloo, A. C., Zhou, K., Friedrich, A. W., ve Rossen, J. W. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of biotechnology*, *243*, 16–24.
- Díaz-Badillo, A., Muñoz, M. deL., Perez-Ramirez, G., Altuzar, V., Burgueño, J., Mendoza-Alvarez, J. G., Martínez-Muñoz, J. P., Cisneros, A., Navarrete-Espinosa, J., ve Sanchez-Sinencio, F. (2014). A DNA microarray-based assay to detect dual infection with two dengue virus serotypes. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *14*(5), 7580–7601.
- Emerson, J. F., ve Lai K. K. Y. (2013). Endogenous antibody interferences in immunoassays. *Laboratory Medicine*, *44*(1), 69–73
- Engvall, E. (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*, *56*(2), 319-320.

- Eslami, A., ve Lujan, J. (2010). Western blotting: sample preparation to detection. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (44), 2359.
- Fausser, B. C., Mannaerts, B. M., Devroey, P., Leader, A., Boime, I., ve Baird, D. T. (2009). Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Human reproduction update*, 15(3), 309–321.
- Fitzgibbons, P. L., Bradley, L. A., Fatheree, L. A., Alsabeh, R., Fulton, R. S., Goldsmith, J. D., Haas, T. S., Karabakhtsian, R. G., Loykasek, P. A., Marolt, M. J., Shen, S. S., Smith, A. T., Swanson, P. E., ve College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center (2014). Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 138(11), 1432–1443.
- Gallagher, S., Winston Tank Transfer Systems, S. E., Fuller Tank Transfer Systems, S. A., ve Hurrell Tank Transfer Systems Reversible Staining of Proteins, J. G. R. (2008). Immunoblotting and immunodetection. *Current protocols in immunology*, Chapter 8, 8.10.1–8.10.28.
- García-de-Lomas, J., ve Navarro, D. (1997). New directions in diagnostics. *The Pediatric infectious disease journal*, 16(3 Suppl), S43–S48.



- Gavini, K. ve Parameshwaran., K. (2023, April). *Western blot*. Ncbi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/>
- Ghannam, M. G. ve Varacallo., M. A. (2023, July). *Biochemistry, polymerase chain reaction*. Ncbi. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>
- Ghosh, R., Gilda, J. E., ve Gomes, A. V. (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert review of proteomics*, 11(5), 549–560.
- Granade, T. C., Kodani, M., Wells, S. K., Youngpairoj, A. S., Masciotra, S., Curtis, K. A., Kamili, S., ve Owen, S. M. (2018). Characterization of real-time microarrays for simultaneous detection of HIV-1, HIV-2, and hepatitis viruses. *Journal of virological methods*, 259, 60–65.
- Green, M. R., ve Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor protocols*, 2019(6), 10.1101/pdb.top095109.
- Han, Y., Wang, S., Zhang, Z., Ma, X., Li, W., Zhang, X., Deng, J., Wei, H., Li, Z., Zhang, X. E., ve Cui, Z. (2014). In vivo imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems. *Nucleic acids research*, 42(13), e103.

- Heireman, L., Van Geel, P., Musger, L., Heylen, E., Uyttenbroeck, W., ve Mahieu, B. (2017). Causes, consequences and management of sample hemolysis in the clinical laboratory. *Clinical biochemistry*, 50(18), 1317–1322.
- Herrera-Rodriguez, S., Elizondo-Quiroga, D. and Alvarez-Maya, I. (2013) Infectious diseases detection by microarray: An overview of clinical relevant infections. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 6, 1006-1013.
- Hirano, S. (2012). Western blot analysis. *Methods Mol Biol*, 926, 87-97.
- Hnasko, T. S., ve Hnasko, R. M. (2015). The Western Blot. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1318, 87–96.
- Hornbeck P. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current protocols in immunology, Chapter 2*.
- Houn, H. Y., Pappas, A. A., ve Walker, E. M., Jr (1987). Status of current clinical tests for human immunodeficiency virus (HIV): applications and limitations. *Annals of clinical and laboratory science*, 17(5), 279–285.

- Hua, W., Zhang, G., Guo, S., Li, W., Sun, L., ve Xiang, G. (2015). Microarray-based genotyping and detection of drug-resistant HBV mutations from 620 Chinese patients with chronic HBV infection. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 19(3), 291–295.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., ve Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 299–311.
- Imai, K., Tamura, K., Tanigaki, T., Takizawa, M., Nakayama, E., Taniguchi, T., Okamoto, M., Nishiyama, Y., Tarumoto, N., Mitsutake, K., Murakami, T., Maesaki, S., ve Maeda, T. (2018). Whole Genome Sequencing of Influenza A and B Viruses With the MinION Sequencer in the Clinical Setting: A Pilot Study. *Frontiers in microbiology*, 9, 2748.
- Islam, K. U., ve Iqbal, J. (2020). An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 560616.

- Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., Tyson, J. R., Beggs, A. D., Dilthey, A. T., Fiddes, I. T., Malla, S., Marriott, H., Nieto, T., O'Grady, J., Olsen, H. E., Pedersen, B. S., Rhie, A., Richardson, H., Quinlan, A. R., Snutch, T. P., ... Loose, M. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature biotechnology*, 36(4), 338–345.
- Jerome, H., Taylor, C., Sreenu, V. B., Klymenko, T., Filipe, A. D. S., Jackson, C., Davis, C., Ashraf, S., Wilson-Davies, E., Jesudason, N., Devine, K., Harder, L., Aitken, C., Gunson, R., ve Thomson, E. C. (2019). Metagenomic next-generation sequencing aids the diagnosis of viral infections in febrile returning travellers. *The Journal of infection*, 79(4), 383–388.
- Khan, M. J., Trabuco, A. C., Alfonso, H. L., Figueiredo, M. L., Batista, W. C., Badra, S. J., Figueiredo, L. T., Lavrador, M. A., ve Aquino, V. H. (2016). DNA Microarray Platform for Detection and Surveillance of Viruses Transmitted by Small Mammals and Arthropods. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(9), e0005017.
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., ve Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International journal of genomics*, 2016, 2405954.

- Kohl, T. O., ve Ascoli, C. A. (2017). Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2017(6), pdb.prot093724.
- Kohl, T. O., ve Ascoli, C. A. (2017). Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harbor protocols*, 2017(5), 10.1101/pdb.prot093708.
- Kohl, T. O., ve Ascoli, C. A. (2017). Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc*, 2017(7), pdb.prot093740.
- Konstantinou, G.N. (2017). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*, 1592, 79-94.
- Korimbocus, J., Scaramozzino, N., Lacroix, B., Crance, J. M., Garin, D., ve Vernet, G. (2005). DNA probe array for the simultaneous identification of herpesviruses, enteroviruses, and flaviviruses. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 3779–3787.
- Kraemer H. C. (2019). Is It Time to Ban the P Value?. *JAMA psychiatry*, 76(12), 1219–1220.

- Kuo, H. T., Yeh, J. Z., Wu, P. H., Jiang, C. M., Wu, M. C. (2012). Application of immunomagnetic particles to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for improvement of detection sensitivity of HCG. *J Immunoassay Immunochem*, 33(4), 377-87.
- Kustin, T., Ling, G., Sharabi, S., Ram, D., Friedman, N., Zuckerman, N., Bucris, E. D., Glatman-Freedman, A., Stern, A., ve Mandelboim, M. (2019). A method to identify respiratory virus infections in clinical samples using next-generation sequencing. *Scientific reports*, 9(1), 2606.
- Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P. A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K., ve Studholme, D. J. (2015). Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular detection and quantification*, 3, 1–8.
- Lefterova, M. I., Suarez, C. J., Banaei, N., ve Pinsky, B. A. (2015). Next-Generation Sequencing for Infectious Disease Diagnosis and Management: A Report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 17(6), 623–634.
- Leipold, M. D., Newell, E. W., ve Maecker, H. T. (2015). Multiparameter Phenotyping of Human PBMCs Using Mass Cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1343, 81–95.

- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*, 51(12), 2415–2418.
- Li, G., Cabanero, M., Wang, Z., Wang, H., Huang, T., Alexis, H., Eid, I., Muth, G., ve Pincus, M. R. (2013). Comparison of glucose determinations on blood samples collected in three types of tubes. *Annals of clinical and laboratory science*, 43(3), 278–284.
- Li, L. X., Zhang, Y. L., Zhou, L., Ke, M. L., Chen, J. M., Fu, X., Ye, C. L., Wu, J. X., Liu, R. Y., ve Huang, W. (2013). Antitumor efficacy of a recombinant adenovirus encoding endostatin combined with an E1B55KD-deficient adenovirus in gastric cancer cells. *Journal of translational medicine*, 11, 257.
- Lima-Oliveira, G., Lippi, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., Picheth, G., ve Guidi, G. C. (2013). Sodium citrate vacuum tubes validation: preventing preanalytical variability in routine coagulation testing. *Blood coagulation ve fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 24(3), 252–255.
- Lin, A. V. (2015)a. Direct ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318, 61-7.
- Lin, A. V. (2015)b. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*, 1318, 51-9.

- Lin, Z., Farooqui, A., Li, G., Wong, G. K., Mason, A. L., Banner, D., Kelvin, A. A., Kelvin, D. J., ve León, A. J. (2014). Next-generation sequencing and bioinformatic approaches to detect and analyze influenza virus in ferrets. *Journal of infection in developing countries*, 8(4), 498–509.
- Lloyd, V. K., ve Hawkins, R. G. (2018). Under-Detection of Lyme Disease in Canada. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 6(4), 125.
- Lorenz T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (63), e3998.
- Lück, C., Haitjema, C., ve Heger, C. (2021). Simple Western: Bringing the Western Blot into the Twenty-First Century. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2261, 481–488.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292–1305.
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*, 1897, 289-298.
- Markham, A.F. (1993). The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. *BMJ*. 13, 306(6875), 441-6.



- Martín, V., Perales, C., Fernández-Algar, M., Dos Santos, H. G., Garrido, P., Pernas, M., Parro, V., Moreno, M., García-Pérez, J., Alcamí, J., Torán, J. L., Abia, D., Domingo, E., ve Briones, C. (2016). An Efficient Microarray-Based Genotyping Platform for the Identification of Drug-Resistance Mutations in Majority and Minority Subpopulations of HIV-1 Quasispecies. *PloS one*, *11*(12), e0166902.
- Martínez, M. A., Soto-Del Río, M.deL., Gutiérrez, R. M., Chiu, C. Y., Greninger, A. L., Contreras, J. F., López, S., Arias, C. F., ve Isa, P. (2015). DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses. *Journal of clinical microbiology*, *53*(1), 136–145.
- Martins-Gomes, C., ve Silva, A. M. (2018). Western Blot Methodologies for Analysis of In Vitro Protein Expression Induced by Teratogenic Agents. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1797*, 191–203.
- Masimba, P., Gare, J., Klimkait, T., Tanner, M., ve Felger, I. (2014). Development of a simple microarray for genotyping HIV-1 drug resistance mutations in the reverse transcriptase gene in rural Tanzania. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, *19*(6), 664–671.
- Mather S., Scott S., Temperton N., Wright E., King B., Daly J. (2013). Current progress with serological assays for exotic emerging/re-emerging viruses. *Future Virology*, *8*(8), 745–755.

- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., ve Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature biotechnology*, 17(10), 969–973.
- Medzhitov, R., ve Iwasaki, A. (2024). Exploring new perspectives in immunology. *Cell*, 187(9), 2079-2094.
- Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., ve Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 49(4), 509–517.
- Mei, H. E., Leipold, M. D., ve Maecker, H. T. (2016). Platinum-conjugated antibodies for application in mass cytometry. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 89(3), 292–300.
- Méndez, C., ve Salas, J. A. (2003). On the generation of novel anticancer drugs by recombinant DNA technology: the use of combinatorial biosynthesis to produce novel drugs. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 6(6), 513–526.
- Möbs, C., ve Schmidt, T. (2016). Research Techniques Made Simple: Monitoring of T-Cell Subsets using the ELISPOT Assay. *The Journal of investigative dermatology*, 136(6), e55–e59.

- Müller, R., Ditzen, A., Hille, K., Stichling, M., Ehricht, R., Illmer, T., Ehninger, G., ve Rohayem, J. (2009). Detection of herpesvirus and adenovirus co-infections with diagnostic DNA-microarrays. *Journal of virological methods*, 155(2), 161–166.
- Noah, D. L., Hill, H., Hines, D., White, E. L., Wolff, M. C. (2009). Qualification of the hemagglutination inhibition assay in support of pandemic influenza vaccine licensure. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(4), 558–566.
- Norman, G., Monteiro, S., ve Salama, S. (2012). Sample size calculations: should the emperor's clothes be off the peg or made to measure?. *BMJ (Clinical research ed.)*, 345, e5278.
- Numazaki, K. (2015). Study on assays for the detection of serum antibodies to measles from children and its standardization. *International Journal of Pediatrics and Neonatal Care*, 1, 108.
- Palarasah, Y., Skjoedt, M. O., Vitved, L., Andersen, T. E., Skjoedt, K., ve Koch, C. (2010). Sodium polyanethole sulfonate as an inhibitor of activation of complement function in blood culture systems. *Journal of clinical microbiology*, 48(3), 908–914.
- Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A. R., ve Harford, J. A. (2020). A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical biochemistry*, 593, 113608

- Porcario, C., Hall, S. M., Martucci, F., Corona, C., Iulini, B., Perazzini, A. Z., Acutis, P., Hamir, A. N., Loiacono, C. M., Greenlee, J. J., Richt, J. A., Caramelli, M., ve Casalone, C. (2011). Evaluation of two sets of immunohistochemical and Western blot confirmatory methods in the detection of typical and atypical BSE cases. *BMC research notes*, 4, 376.
- Quick, J., Grubaugh, N. D., Pullan, S. T., Claro, I. M., Smith, A. D., Gangavarapu, K., Oliveira, G., Robles-Sikisaka, R., Rogers, T. F., Beutler, N. A., Burton, D. R., Lewis-Ximenez, L. L., de Jesus, J. G., Giovanetti, M., Hill, S. C., Black, A., Bedford, T., Carroll, M. W., Nunes, M., Alcantara, L. C., Jr, ... Loman, N. J. (2017). Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nature protocols*, 12(6), 1261–1276.
- Ramesh, R., Munshi, A., ve Panda, S. K. (1992). Polymerase chain reaction. *The National medical journal of India*, 5(3), 115–119.
- Schietecatte, J., Anckaert, E., Smitz, J. (2012). Interferences in immunoassays. InTech
- Scholzen A., ve Sauerwein R. W. (2013). How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in Plasmodium infection. *Trends in Parasitology*, 29(5), 252–262.

- Sedgwick, J. D., ve Holt, P. G. (1983). A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods*, 57(1-3), 301–309.
- Shah, K., ve Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine (London, England: 2005)*, 77(7), C98–C101.
- Sherwani, S., Chowdhury, M., ve Bugert, J. J. (2017). ELISA for Molluscum Contagiosum Virus. *Current protocols in microbiology*, 47, 14A.6.1–14A.6.9.
- Shi, S. R., Shi, Y., Taylor, C. R. (2011). Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem*, 59,13–32
- Souf, S. (2016). Recent advances in diagnostic testing for viral infections. *Bioscience Horizons*, 9, 1–11.
- Tabatabaei, M. S., ve Ahmed, M. (2022). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*, 2508, 115-134.
- Taylor C. R. (2014). Immunohistochemistry in surgical pathology: principles and practice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1180, 81–109.

- Tiscione, N. B. (2018). The Validation of ELISA Screening According to SWGTOX Recommendations. *J Anal Toxicol*, 42(3), e33-e34.
- Towner, J. S., Sealy, T. K., Khristova, M. L., Albariño, C. G., Conlan, S., Reeder, S. A., Quan, P. L., Lipkin, W. I., Downing, R., Tappero, J. W., Okware, S., Lutwama, J., Bakamutumaho, B., Kayiwa, J., Comer, J. A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., ve Nichol, S. T. (2008). Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS pathogens*, 4(11), e1000212.
- Van Esbroeck M., Meersman K., Michiels J., Ariën K. K., Van den Bossche D. (2016). Letter to the editor: specificity of Zika virus ELISA: interference with malaria. *Eurosurveillance*, 21(21)
- Veguilla, V., Hancock, K., Schiffer, J., Gargiullo, P., Lu, X., Aranio, D., Branch, A., Dong, L., Holiday, C., Liu, F., Steward-Clark, E., Sun, H., Tsang, B., Wang, D., Whaley, M., Bai, Y., Cronin, L., Browning, P., Dababneh, H., Noland, H., ... Katz, J. M. (2011). Sensitivity and specificity of serologic assays for detection of human infection with 2009 pandemic H1N1 virus in U.S. populations. *Journal of clinical microbiology*, 49(6), 2210–2215.
- Vemula, S. V., Zhao, J., Liu, J., Wang, X., Biswas, S., ve Hewlett, I. (2016). Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses*, 8(4), 96.

- Venter, M. (2007). Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends in plant science*, 12(3), 118–124.
- Wang, D., Urisman, A., Liu, Y. T., Springer, M., Ksiazek, T. G., Erdman, D. D., Mardis, E. R., Hickenbotham, M., Magrini, V., Eldred, J., Latreille, J. P., Wilson, R. K., Ganem, D., ve DeRisi, J. L. (2003). Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS biology*, 1(2), E2.
- Wang, J., Ke, Y. H., Zhang, Y., Huang, K. Q., Wang, L., Shen, X. X., Dong, X. P., Xu, W. B., ve Ma, X. J. (2017). Rapid and Accurate Sequencing of Enterovirus Genomes Using MinION Nanopore Sequencer. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 30(10), 718–726.
- Weng, X., Gaur, G., ve Neethirajan, S. (2016). Rapid Detection of Food Allergens by Microfluidics ELISA-Based Optical Sensor. *Biosensors*, 6(2), 24.
- Workowski, K. A., Bolan, G. A., ve Centers for Disease Control and Prevention (2015). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 64(RR-03), 1–137.

- Yamagata, H., Kobayashi, A., Tsunedomi, R., Seki, T., Kobayashi, M., Hagiwara, K., Chen, C., Uchida, S., Okada, G., Fuchikami, M., Kamishikiryo, T., Iga, J. I., Numata, S., Kinoshita, M., Kato, T. A., Hashimoto, R., Nagano, H., Okamoto, Y., Ueno, S., Ohmori, T., ... Nakagawa, S. (2021). Optimized protocol for the extraction of RNA and DNA from frozen whole blood sample stored in a single EDTA tube. *Scientific reports*, *11*(1), 17075.
- Yong, W. H., Dry, S. M., ve Shabihkhani, M. (2014). A practical approach to clinical and research biobanking. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1180*, 137–162.
- Yu, A. C., Vatcher, G., Yue, X., Dong, Y., Li, M. H., Tam, P. H., Tsang, P. Y., Wong, A. K., Hui, M. H., Yang, B., Tang, H., ve Lau, L. T. (2012). Nucleic acid-based diagnostics for infectious diseases in public health affairs. *Frontiers of medicine*, *6*(2), 173–186.
- Yu, A. C., Vatcher, G., Yue, X., Dong, Y., Li, M. H., Tam, P. H., Tsang, P. Y., Wong, A. K., Hui, M. H., Yang, B., Tang, H., ve Lau, L. T. (2012). Nucleic acid-based diagnostics for infectious diseases in public health affairs. *Frontiers of medicine*, *6*(2), 173–186.





# İMMÜNÖLOJİDE TEMEL MOLEKÜLER ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ