

MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİDE

KULLANILAN YÖNTEMLER



Editörler

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER - 2026

ISBN: 978-625-93333-0-4

Editörler

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

Ocak / 2026

İstanbul, Türkiye



Telif Hakkı © Haliç Yayınevi

Tarih: 30.01.2026

Haliç Yayınevi

İstanbul, Türkiye

www.halicyayinevi.com

Tüm hakları saklıdır. Bu kitabın hiçbir bölümü, fotokopi dahil olmak üzere ya da bilgi depolama ve erişim sistemleri dâhil elektronik veya mekanik herhangi bir yöntemle, hem telif hakkı sahibinin hem de yayınevinin yazılı izni olmaksızın çoğaltılamaz.

© Haliç Yayınları 2025

Uluslararası Yayıncılar Birliği üyesidir.

Bu eserin dijital PDF sürümü Açık Erişim olarak sunulmaktadır ve Creative Commons Atıf–Ticari Olmayan 4.0 lisansı (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) koşulları kapsamında dağıtılmaktadır. Bu lisans; ticari olmayan kullanım şartıyla, esere uygun atıf yapılması koşuluyla, uyarılama, değiştirme, çoğaltma ve dağıtımına ek izin gerekmeksizin olanak tanır. Türetilmiş eserlerin aynı lisans koşullarıyla lisanslanması zorunlu değildir.

Uyarlayan: Merve KÜÇÜK

ISBN: 978-625-93333-0-4

Telif Hakkı © 2025 Haliç Akademik Yayınları — Tüm hakları saklıdır.

MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİDE KULLANILAN YÖNTEMLER

EDİTÖRLER

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

YAZARLAR

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye BAŞER

Dr. Öğr. Üyesi Bülent DABANLIOĞLU

Dr. Mahmut UÇAR

Dr. Ece KAPLAN

Uzman Moleküler Biyolog Betül ARI

Moleküler Biyolog Sıla EKTAŞ KALAYCI

Uzman Moleküler Biyolog Zeynep YAMAN

ÖNSÖZ

Moleküler mikrobiyoloji, yaşam bilimleri içinde temel ve hızla gelişen bir disiplin olup, mikroorganizmaların genetik, moleküler ve hücresel düzeylerde incelenmesi için güçlü araçlar sağlamaktadır. Moleküler tekniklerin yaygın olarak benimsenmesi, mikrobiyal yapı, işlev ve patojenik mekanizmaların daha hassas bir şekilde karakterize edilmesini sağlamış, böylece hem temel araştırmaları hem de klinik uygulamaları güçlendirmiştir. Bu gelişmeler, iyi tasarlanmış laboratuvar iş akışlarına, standartlaştırılmış metodolojilere ve deneysel verilerin doğru yorumlanmasına olan ihtiyacı artırmıştır.

Bu kitap, moleküler mikrobiyolojide kullanılan temel yöntemleri sistematik ve entegre bir çerçeve içinde sunmak amacıyla hazırlanmıştır. Dokuz bölümden oluşan çalışma, laboratuvar organizasyonu ve biyolojik güvenlik, nükleik asit izolasyonu, amplifikasyon tabanlı teknikler, elektroforetik ve sekanslama yöntemleri, protein ve hücresel analizler ve gelişmiş deneysel model sistemlerini ele almaktadır. Sadece teknik prosedürlere değil, aynı zamanda güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlayan temel prensiplere, kalite kontrol stratejilerine ve pratik hususlara da vurgu yapılmaktadır.

Bu kitabın, moleküler mikrobiyoloji alanında çalışan lisans ve yüksek lisans öğrencileri, araştırmacılar ve laboratuvar profesyonelleri için değerli bir teorik ve pratik referans kaynağı olmasını umuyoruz. Bu çalışmanın hazırlanmasında yer alan tüm katkıda bulunanlara içten teşekkürlerimizi sunarız.

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
BÖLÜM 1:	1
LABORATUVAR ORGANİZASYONU, GÜVENLİK VE TEMEL KAVRAMLAR	1
GİRİŞ	1
1.1.Modern Moleküler Laboratuvar Tasarımı: Kontaminasyon kontrolü, tek yönlü iş akışı (Pre-PCR ve Post-PCR alanları)	4
1.1.1. Genel Bakış ve Kavramsal Çerçeve	4
1.1.2. Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Kontaminasyonun Önemi	6
1.1.3. Fiziksel Alanların Planlanması ve Bölümlendirme	9
1.1.4. Tek Yönlü İş Akışı Prensipleri	11
1.1.5. Hava Akımı, Basınç ve Havalandırma Sistemleri	13
1.1.6. Ekipman ve Sarf Malzemelerinin Alan Bazlı Tahsisi	16
1.1.7. Dekontaminasyon ve Temizlik Prosedürleri	18
1.2. Biyogüvenlik ve Atık Yönetimi: BSL seviyeleri, kimyasal/biyolojik atıkların bertarafı	21
1.3. Çözelti Hazırlama ve Hesaplamalar: Molarite, dilüsyon formülleri, pH metre kullanımı ve tampon sistemleri	25
1.3.1. Molarite ve Konsantrasyon Kavramları	26
1.3.2. Dilüsyon (Seyreltme) Hesaplamaları	26
1.3.3. pH Kavramı ve pH Ölçümü	27
1.3.4. Tampon Sistemlerinin Temel Prensipleri	28
1.3.5. Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu	28
1.3.6. Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu	29
1.3.7. PBS (Phosphate Buffered Saline)	29

1.3.8. Çözelti Hazırlamada Sterilite ve Saklama Koşulları	29
1.4. Pipetleme ve Ekipman Kalibrasyonu: Pipetleme Hataları ve Cihazların Bakımı	30
KAYNAKÇA	34
BÖLÜM 2:	46
NÜKLEİK ASİT İZOLASYON STRATEJİLERİ	46
GİRİŞ.....	46
2.1. DNA İzolasyonu Teknikleri: Fenol-Kloroform yöntemi, Spin-kolon sistemleri ve Manyetik boncuk teknolojisi	47
2.1.1. Örnek Türüne Göre Hazırlık, Numune Kabul/Ret Kriterleri ve Ön İşlemler	48
2.1.2. DNA İzolasyon Mekanizmaları ve Prensipleri	54
2.2. RNA İzolasyonu ve RNase Kontrolü: RNA stabilizasyonu, Trizol yöntemi ve saflık kriterleri	62
2.2.1. Örnek Türüne Göre Hazırlık, Numune Kabul/Ret Kriterleri ve Ön İşlemler	63
2.2.2. RNA İzolasyon Mekanizmaları ve Prensipleri.....	67
2.3. Plazmit DNA İzolasyonu (Miniprep/Maxiprep): Alkali lizis yöntemi ve saflaştırma	72
2.3.1. Bakteri Kültürü Hazırlığı	73
2.3.2. Alkali Lizis Mekanizması	76
2.3.3. Saflaştırma ve Endotoksin Giderimi.....	77
2.4. Kantitatif ve Kalitatif Analizler: Nanodrop (Spektrofotometre) ve Qubit (Fluorometre) kullanımı.....	79
2.4.1. Nanodrop ile Saflık Kontrolü (A260/280, A260/230).....	79
2.4.2. Qubit ile Hassas Miktar Tayini.....	81
SONUÇ.....	82
KAYNAKÇA.....	84
BÖLÜM 3:	105

ELEKTROFORETİK TEKNİKLER	105
GİRİŞ	105
3.1. Agaroz Jel Elektroforezi: DNA/RNA Fragman Analizi ve Jel Görüntüleme Sistemleri	106
3.1.1. Agaroz Matris Yapısı ve Göç Dinamikleri	106
3.1.2. Tampon Sistemleri ve Voltaj Optimizasyonu	107
3.1.3. Jel Görüntüleme ve Floresan İşaretleyiciler.....	107
3.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE): Mikrobiyal Karakterizasyon ve Küçük Fragman Ayrımı.....	108
3.2.1. Akrilamid ve Bis-akrilamid Polimerizasyonu.....	108
3.2.2. Dikey Elektroforez ve Mikrobiyal Genetik Analiz	108
3.2.3. Sekanslama Jelleri ve Geleneksel Tanı Yaklaşımları	108
3.2.4. Mikrobiyolojide Spesifik PAGE Uygulamaları	109
3.3. Pulse-Field Jel Elektroforezi (PFGE): Çok Büyük DNA Moleküllerinin Analizi	109
3.3.1. Değişken Elektrik Alan Mekanizması ve Fiziksel Prensibi	110
3.3.2. Mikrobiyal Epidemiyoloji ve "Altın Standart" Tipleme	110
3.3.3. İntakt DNA Hazırlama Protokolü (Plug Hazırlama)	110
3.4. Denatüre Edici Jeller: RNA Bütünlüğü ve Transkript Analizi	110
3.4.1. Denatürasyon Ajanları ve Kimyasal Etkileşimler	111
3.4.2. Ribozomal Bant Analizi ve RNA Kalitesi	111
3.5. Kapiler Elektroforez (CE): Otomatize Fragman Analizi	111
3.6. İki Boyutlu (2D) Elektroforez.....	111
SONUÇ	112
KAYNAKÇA	113
BÖLÜM 4:	116

GİRİŞ	116
4.1. Deney Öncesi Stratejik Planlama: Primer Tasarımı ve Enzim Seçimi.....	117
4.1.1. Primer Tasarım Kriterleri.....	118
4.1.2. DNA Polimeraz Seçim Rehberi.....	121
4.2. PCR Reaksiyonunun Kurulması	123
4.2.1. Master Mix Hazırlığı	123
4.3. Termal Döngü Protokolü	126
4.4. PCR Sonrası Gelişmiş Analiz: Real-Time PCR (qPCR) Teknolojileri	129
4.4.1. Tespit Kimyaları	130
4.4.2. qPCR Veri Analizi ve Matematiksel Modeller	132
4.4.3. qPCR'da Standardizasyon ve Tekrarlanabilirlik: MIQE Çerçevesi.....	137
4.5. Özelleşmiş PCR Teknikleri	139
4.5.1. Reverse Transcription PCR (RT-PCR): RNA Analizi ...	139
4.5.2. Küçük RNA (miRNA, siRNA, piRNA) Amplifikasyon Stratejileri.....	141
4.5.2.1. Biyofiziksel Zorluk ve Uzatma (Elongation) Prensipleri.	142
4.5.3. Multiplex PCR.....	146
4.5.4. Nested (İç İçe) PCR.....	147
4.5.5. Dijital PCR (dPCR)	148
SONUÇ.....	149
KAYNAKÇA.....	150
BÖLÜM 5:	164
GENETİK MÜHENDİSLİĞİ VE KLONLAMA TEKNOLOJİLERİ	164
GİRİŞ	164

5.1. Restriksiyon Enzimlerinin Biyolojik Kökeni ve Savunma Mantığı	166
5.1.1. Restriksiyon Enzimlerinin Sınıflandırılması ve Deneysel İşlevsellik.....	168
5.1.2. Tanıma Dizileri, Palindromik Yapılar ve Moleküler Özgüllük	169
5.1.3. DNA Kesim Tipleri: Yapışkan ve Küt Uçların Yapısal ve Deneysel Sonuçları	171
5.1.4. DNA Ligasyonu: Ligaz Enzimlerinin Mekanizması ve Reaksiyon Dinamikleri.....	173
5.1.5. Klonlama ve Yönlendirilmiş Ligasyon Stratejileri	175
5.1.6. Ligasyon Verimini Etkileyen Faktörler ve Deneysel Sınırlılıklar.....	177
5.1.7. Genel Değerlendirme ve Kavramsal Bağlantılar	179
5.2. Vektör Sistemleri: Ekspresyon Vektörleri, Viral Vektörler ve Kozmidler	180
5.2.1. Vektör Kavramı ve Temel Yapısal Bileşenler	182
5.2.2. Ekspresyon Vektörleri ve Gen İfadesinin Düzenlenmesi... ..	185
5.2.3. Viral Vektörler ve Gen Aktarımında Kullanımları	187
5.2.4. Kozmidler ve Büyük DNA Fragmanlarının Taşınması.....	189
5.2.5. Vektör Sistemlerinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi	191
5.3. Transformasyon ve Transfeksiyon: Genetik Materyalin Hücrelere Aktarılma Yaklaşımları	194
5.3.1. Bakteriyel Transformasyonun Temel Prensipleri	196
5.3.2. Kimyasal Yetkinlik ve Isı Şoku Mekanizması.....	197
5.3.3. Elektroporasyon ve Fiziksel Gen Aktarımı	199
5.3.4. Transfeksiyonun Temel İlkeleri ve Hücresel Bariyerler	202
5.3.5. Lipofeksiyon ve Kimyasal Transfeksiyon Yöntemleri	204
5.3.6. Transient ve Stabil Gen Aktarımı	206

5.3.7. Yöntemlerin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi.....	208
5.3.8. Hücresel Bariyerler ve Aktarılan DNA'nın Hücre İçi Kaderi	210
5.3.9. Yöntem Seçiminde Deneysel ve Biyolojik Kriterler.....	213
5.4. Klon Seçimi ve Doğrulama: Moleküler Tarama ve Analitik Yaklaşımlar	214
5.4.1. Klon Seçiminin Deneysel Mantığı ve Güncel Yaklaşımlar	216
5.4.2. Mavi-Beyaz Tarama: Güncel Kullanımı ve Sınırlılıkları ...	219
5.4.3. Koloni PCR: Hız, Özgüllük ve Güncel Optimizasyon Stratejileri	221
5.4.4. Restriksiyon Haritalama: Klasik Yaklaşımın Güncel Yorumu	223
5.4.5. Dizileme Temelli Doğrulama: Sanger ve Yeni Nesil Yaklaşımlar.....	224
5.4.6. Yanlış Pozitif ve Yanlış Negatif Senaryolar	227
5.4.7. Çok Aşamalı Doğrulama Stratejileri	229
5.5. Genom Düzenleme Yaklaşımları: CRISPR-Cas Sistemleri ve Güncel Uygulamalar	231
5.5.1. CRISPR-Cas Sistemlerinin Biyolojik Kökeni ve Moleküler Temeli	233
5.5.2. Cas9 Aracılı DNA Kırığı ve Hücresel Onarım Yolları	235
5.5.3. gRNA Tasarımı ve Hedef Özgüllüğün Belirlenmesi	237
5.5.4. Off-Target Etkiler ve Sistematik Sınırlılıklar	239
5.5.5. Laboratuvar Uygulamaları ve Deneysel Doğrulama Stratejileri	241
5.5.6. Etik, Güvenlik ve Metodolojik Sınırlar	243
SONUÇ.....	245
KAYNAKÇA.....	248
BÖLÜM 6:	254

NÜKLEİK ASİT DİZİLEME VE GENOMİK	254
GİRİŞ.....	254
6.1. Zincir Sonlandırma (Chain-Termination) Prensipleri.....	256
6.1.1. Kapiler Elektrophoretik ve Kromatogram Tabanlı Okuma	258
6.1.2. Sanger Dizilemenin Doğruluk Profili ve Sınırlılıkları	261
6.1.3. Yeni Nesil Dizileme Sonrası Doğrulamada Sanger Dizilemenin Rolü	263
6.1.4. Klinik ve Moleküler Biyoloji Uygulamalarında Sanger Dizileme	264
6.2. Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing)	266
6.2.1. Kütüphane Hazırlama (Library Preparation)	268
6.2.2. Illumina Platformları ve Bridge Amplification Mekanizması	270
6.2.3. Oxford Nanopore Teknolojisi ve Tek Molekül Dizileme ..	273
6.2.4. Platformlar Arası Karşılaştırmalı Değerlendirme	275
6.3. Biyoinformatik Veri Analizi	277
6.3.1. Ham Veri İşleme ve Kalite Kontrol	279
6.3.2. Dizi Hizalama (Alignment) ve Referans Genom Kullanımı	281
6.3.3. Varyant Analizi ve VCF Formatı.....	282
6.3.4. Varyant Anotasyonu ve Genom Veri Tabanları	285
6.3.5. Klinik ve Araştırma Amaçlı Yorumlama Stratejileri	287
SONUÇ.....	289
KAYNAKÇA.....	291
BÖLÜM 7:	298
PROTEİN ANALİZİ VE PROTEOMİK	298
GİRİŞ	298
7.1. Protein Ekstraksiyonu ve Solubilizasyon	299

7.1.1. Mikrobiyal Spesifikasyon ve Hücre Parçalama Stratejileri	300
7.1.2. Proteaz İnhibitörleri ve Stabilizasyon	301
7.2. SDS-PAGE ve Western Blotting	302
7.2.1. SDS-PAGE ve Proteinlerin Ayrılması	302
7.2.2. Protein Transferi (Blotting) ve Membran Seçimi	303
7.2.3. Membran Bloklama (Blocking) Stratejileri	304
7.2.4. Antikor Seçimi ve İmmünobloklama Stratejileri	306
7.2.5. Kemilüminesans Görüntüleme Mekanizması	308
7.3. Protein Miktar Tayini	308
7.3.1. Bradford Metodu	309
7.3.2. BCA (Bisinşoninic Asit) ve Lowry Metotları	309
7.4. ELISA ve Protein-Protein Etkileşimleri	309
7.4.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve Mikrobiyal Uygulamalar	310
7.4.2. İmmünopresipitasyon (IP) ve Co-IP	311
7.4.3. Mayada İki-Hibrit (Y2H) Sistemi ve Virülans Haritalama	311
7.4.4. MALDI-TOF MS ile Protein Parmak İzi	312
SONUÇ	313
KAYNAKÇA	314
BÖLÜM 8:	323
FLOW SİTOMETRİ (AKIŞ SİTOMETRİSİ) VE HÜCRESEL ANALİZLER	323
GİRİŞ	323
8.1. Flow Sitometrinin Temel Prensipleri	324
8.1.1 Sıvı Dinamiği Sistemi	325
8.1.2 Optik Sistem	327

8.1.3 Elektronik Sistem	330
8.2. Florokromlar ve Floresan Etiketleme.....	331
8.2.1 Florokromların Sınıflandırması	333
8.3. Numune Hazırlama Teknikleri	335
8.3.1. Ön Hazırlık	335
8.3.2. Tek Hücre Süspansiyonu	336
8.3.3. Fiksasyon ve Permeabilizasyon.....	337
8.3.4. Bloklama	338
8.3.5. Boyama	339
8.3.6. Yıkama	339
8.4. Multicolor Flow Sitometri ve Veri Analizi	340
8.4.1. Veri Ön İşleme	341
8.4.2. Hücre Popülasyonlarının Tanımlanması	344
8.4.3. Örnekler Arası Karşılaştırma.....	347
8.4.4. Yorumlama	348
8.5 İmmünfenotipleme (Immunophenotyping)	348
8.5.1 Lenfosit Alt Grupları ve Tanısal Markörler	351
8.6. Flow Sitometrinin Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyolojide Kullanım Alanları	352
8.6.1 Mikrobiyolojide Flow Sitometri.....	352
8.6.2. Serolojik Tanı	356
8.6.3. Hücre Canlılığı ve Apoptoz Analizleri	356
8.6.4. Hücre Ayırma (FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorting)	357
8.6.5 Hücre Döngüsü ve DNA İçeriği Analizi.....	358
8.6.6. Hücre İçi Kalsiyum Tespiti	359
8.6.7. RNA-Flow Sitometri (PrimeFlow)	360

8.6.8.Kanser tespiti.....	360
8.6.9. Fonksiyonel Analizler ve Sitokin Ölçümü	361
8.7. Akış Sitometrisinde Kalite Kontrol (QC) ve Standardizasyon Protokolleri.....	361
8.7.1. Cihaz Optimizasyonu ve Kalibrasyonu	362
8.7.2. Günlük İzleme ve Levey-Jennings Analizleri	362
8.7.3. Kantitatif Standardizasyon: MESF ve ABC Birimleri ...	363
8.7.4. Uluslararası Raporlama Standartları: MIFlowCyt ve MIATA	363
SONUÇ.....	364
KAYNAKÇA.....	364
BÖLÜM 9:	369
HÜCRE KÜLTÜRÜ VE FONKSİYONEL MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER.....	369
GİRİŞ	369
9.1. Hücre Kültürü Temelleri ve Laboratuvar Yönetimi	371
9.1.1. Hücre Kültüründe Sterilite Prensipleri ve Aseptik Çalışma Yaklaşımı	371
9.1.2. Biyogüvenlik Kabini (BSL): Yapısı, Çalışma Prensipleri ve Doğru Kullanımı	373
9.1.3. Hücre Kültürü Besiyerleri: Temel Bileşenler ve Seçim Kriterleri	374
9.1.4. Hücre Dondurma (Kriyoprezervasyon): Temel İlkeler ve Uygulama.....	375
9.1.5. Hücre Çözme Protokolleri ve Canlılık Optimizasyonu ..	376
9.2. Hücre Hatları ve Karakterizasyon.....	377
9.2.1. Hücre Hatlarının Tanımlanması ve Sınıflandırılması	377
9.2.2. Primer Kültürlerin Özellikleri ve Uygulama Alanları	378

9.2.3. Immortalized Hücre Hatlarının Avantajları ve Sınırlılıkları	379
9.2.4. Hücre Sayımı: Hemositometre ile Nicel Analiz	380
9.2.5. Pasaj İşlemleri ve Tripsinizasyon	380
9.2.6. Mikoplazma Kontaminasyonu: Kaynaklar ve Önemi	381
9.2.7. Moleküler Yöntemlerle Mikoplazma Tespiti (PCR ve qPCR)	382
9.2.8. Karakterizasyonun Önemi ve Hücre Hattı Doğrulama ...	382
9.3. Hücre Kültüründe Mikrobiyolojik Analiz Stratejileri	383
9.3.1. Bakteriyel Adezyon ve İnvasion Testleri: Konakçı Hücreye Bağlanma ve Giriş Mekanizmalarının Ölçülmesi	384
9.3.2. Gentamisin Koruma Testi (Gentamicin Protection Assay)	385
9.3.3. İntrasellüler Replikasyon: Hücre İçi Sağkalım ve Çoğalma Dinamikleri	387
9.3.4. Uygulama Alanları ve Metodolojide İnovasyonlar	388
9.4. Viral Analizler ve Sitopatojenik Etki (CPE)	389
9.4.1. Virüs İzolasyonu ve Hücre Kültürü Modelleri	390
9.4.2. Sitopatojenik Etki (CPE)	390
9.4.3. Doku Kültürü Enfektif Dozu: TCID50 Mevzuatı, Protokoller ve Hesaplama	391
9.4.4. Plak Deneyi ile Viral Titrasyon: Altın Standart Yaklaşım	392
9.4.5. TCID50 ve PFU Karşılaştırması	393
9.4.6. CPE Temelli İnkübasyon ve Analizlerin Klinik & Araştırma Uygulamaları	394
9.5. Konakçı-Patojen Etkileşiminin Ölçülmesi	395
9.5.1. Sitotoksosite Analizleri: MTT, XTT ve LDH Salınım Testleri	395

9.5.2. Enflamatuvar Yanıt Ölçümü: Sitokin Salınımının ELISA ve qPCR ile Analizi	397
9.5.3. Apoptoz ve Nekroz: Floresan Boyamalar ile Tespiti	399
9.6. İleri Model Sistemleri.....	400
9.6.1. Birlikte Kültür (Co-Culture) Modelleri: Teorik Altyapı ve Uygulamalar.....	401
9.6.2. Üç Boyutlu (3D) Kültür ve Organoid Sistemleri	404
9.6.3. Co-Culture ve Organoid Sistemlerinin Birleşimi: Yeni Nesil Modelleme	406
9.6.4. Teknik Zorluklar ve Gelecek Perspektifler	407
9.7. İn Vitro İlaç ve Toksisite Taramaları	408
9.7.1. Sitotoksisite Testleri	408
9.7.2. Yeni Antimikrobiyal Ajanların Etkinlik ve Sitotoksisite Profiline Belirlenmesi	410
9.7.3. Yüksek Verimli Tarama (HTS) Sistemleri	411
9.7.4. HTS'nin Uygulama Adımları ve Protokoller	412
9.7.5. Verilerin Yorumlanması, Zorluklar ve Geleceğe Yönelik Stratejiler.....	413
KAYNAKÇA	415

BÖLÜM 1:

LABORATUVAR ORGANİZASYONU, GÜVENLİK VE TEMEL KAVRAMLAR

Dr. Öğr. Üyesi Bülent DABANLIOĞLU

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzincan, Türkiye

E-mail: bulent.dabanlioglu@erzincan.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye BAŞER

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzincan, Türkiye

E-mail: sumeyye.baser@erzincan.edu.tr

GİRİŞ

Laboratuvarlar, bilimsel bilginin üretildiği, doğrulandığı ve uygulamaya dönüştürüldüğü temel çalışma alanlarıdır. Sağlık bilimlerinden temel bilimlere, mühendislikten çevre araştırmalarına kadar geniş bir yelpazede yürütülen deneysel çalışmalar, belirli bir düzen, disiplin ve güvenlik anlayışı çerçevesinde gerçekleştirildiğinde anlamlı ve sürdürülebilir sonuçlar ortaya koyabilmektedir. Bu bağlamda laboratuvar organizasyonu, güvenliği ve temel kavramlar, yalnızca teknik bir gereklilik değil; aynı zamanda bilimsel etik, kalite yönetimi ve araştırma kültürünün ayrılmaz bir parçasıdır.

Laboratuvar organizasyonu, fiziksel altyapının planlanmasından insan kaynağının yönetimine, cihaz ve ekipmanların kullanımından belgelendirme süreçlerine kadar çok boyutlu bir yapıyı ifade eder. Etkin bir organizasyon hem araştırma verimliliğini artırmakta hem de hata oranlarını ve olası riskleri en aza indirmektedir. Özellikle biyolojik, kimyasal ve fiziksel risklerin bulunduğu laboratuvar ortamlarında, iyi yapılandırılmış bir organizasyon modeli; çalışan sağlığının korunması, deneysel sonuçların güvenilirliği ve mevzuata uyum açısından kritik öneme sahiptir. Laboratuvar güvenliği ise, potansiyel tehlikelerin tanımlanması, risklerin değerlendirilmesi ve bu risklere karşı önleyici ve koruyucu önlemlerin sistematik olarak uygulanmasını kapsayan bütüncül bir yaklaşımdır. Kimyasal maddeler, biyolojik etkenler, kesici-delici aletler, elektrikli cihazlar ve basınçlı sistemler gibi pek çok risk faktörü, laboratuvarlarda eş zamanlı olarak bulunabilmektedir. Bu nedenle güvenlik, yalnızca bireysel dikkat ve deneyime bırakılmamalı; standart çalışma prosedürleri (SOP), eğitim programları, kişisel koruyucu donanım kullanımı ve acil durum planları ile desteklenmelidir. Güvenli bir laboratuvar ortamı, çalışanların psikolojik olarak da kendilerini güvende hissetmelerini sağlayarak bilimsel üretkenliği olumlu yönde etkilemektedir. Laboratuvarlarda kullanılan temel kavramlar ve terminoloji, bilimsel iletişimin ortak bir dil üzerinden yürütülmesini sağlar. Numune, reaktif, kontrol, kalibrasyon, validasyon, kontaminasyon ve kalite kontrol gibi kavramlar, farklı disiplinlerdeki laboratuvar çalışmalarının ortak paydasını oluşturmaktadır. Bu kavramların doğru anlaşılması ve yerinde kullanılması hem deney tasarımının doğru yapılması hem de elde edilen

sonuçların doğru yorumlanması açısından zorunludur. Özellikle eğitim amaçlı laboratuvarlarda, temel kavramların sistematik bir şekilde öğretilmesi, öğrencilerin ilerleyen aşamalarda karşılaşacakları daha karmaşık uygulamalara sağlam bir zemin hazırlamaktadır. Günümüzde laboratuvarlar, yalnızca deney yapılan fiziksel meknlar olmaktan çıkmış; kalite yönetim sistemleri, akreditasyon süreçleri ve ulusal/uluslararası standartlarla şekillenen kurumsal yapılara dönüşmüştür. ISO standartları, iyi laboratuvar uygulamaları (GLP) ve biyogüvenlik rehberleri, laboratuvarların işleyişine yön veren temel erevesleri oluşturmaktadır. Bu standartlar, deneysel süreçlerin izlenebilirliğini, tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini artırarak bilimsel çıktının kalitesini yükseltmeyi amaçlamaktadır. Dolayısıyla laboratuvar organizasyonu ve güvenliği, yalnızca günlük uygulamalarla sınırlı olmayıp, stratejik planlama ve sürekli iyileştirme anlayışı ile ele alınmalıdır. Akademik ve araştırma laboratuvarlarında, disiplinler arası çalışmaların artmasıyla birlikte organizasyon ve güvenlik konularının önemi daha da belirgin hâle gelmiştir. Farklı uzmanlık alanlarından araştırmacıların aynı ortamda çalışması, bilgi paylaşımını ve yenilikçi yaklaşımları teşvik ederken; aynı zamanda yeni riskleri ve yönetim zorluklarını da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle laboratuvar yöneticileri ve sorumluları hem teknik bilgiye hem de etkili iletişim ve liderlik becerilerine sahip olmalıdır. Eğitim, denetim ve geri bildirim mekanizmaları, sürdürülebilir bir laboratuvar kültürünün oluşturulmasında temel araçlar olarak öne çıkmaktadır.

Bu bölümde, moleküler mikrobiyoloji laboratuvar organizasyonu, güvenliği ve temel kavramlar bütüncül bir bakış açısıyla ele alınacaktır. Giriş bölümünde sunulan bu çerçeve, ilerleyen alt başlıklarda laboratuvarların yapısal düzenlenmesi, personel sorumlulukları, güvenlik ilkeleri, risk yönetimi ve temel terminolojinin ayrıntılı olarak incelenmesine zemin hazırlamaktadır. Amaç hem öğrencilere hem de araştırmacılara, güvenli, düzenli ve bilimsel açıdan güçlü bir laboratuvar ortamı oluşturma'nın temel prensiplerini kazandırmaktır. Bu yaklaşım, bilimsel çalışmaların kalitesini artırmanın yanı sıra, etik ve sorumlu araştırma anlayışının yerleşmesine de katkı sağlayacaktır.

1.1.Modern Moleküler Laboratuvar Tasarımı: Kontaminasyon kontrolü, tek yönlü iş akışı (Pre-PCR ve Post-PCR alanları)

1.1.1. Genel Bakış ve Kavramsal Çerçeve

Moleküler mikrobiyoloji ve moleküler tanı laboratuvarları, özellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve diğer nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin rutin kullanıma girmesiyle birlikte, klasik laboratuvarlardan çok daha katı tasarım ve organizasyon ilkeleri gerektiren çalışma ortamları hâline gelmiştir. PCR temelli yöntemler, hedef DNA veya RNA moleküllerinin çok düşük kopya sayılarında dahi tespit edilmesine olanak tanıyan yüksek duyarlılığa sahiptir; ancak bu yüksek duyarlılık, aynı zamanda en küçük miktardaki çevresel veya işlem kaynaklı kontaminasyonların bile amplifiye edilerek yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmesi anlamına gelmektedir (Kwok &

Higuchi, 1989; Setia et al., 2026) Bu nedenle PCR tabanlı analizlerin güvenilirliği, yalnızca analitik performansa değil, doğrudan laboratuvar tasarımına ve kontaminasyon kontrol stratejilerine bağlıdır. Modern moleküler mikrobiyoloji laboratuvar tasarımı; fiziksel alanların planlanması, hava akımı ve basınç kontrolü, personel ve malzeme hareketlerinin düzenlenmesi, alanlara özgü ekipman ve sarf malzemelerinin tahsisi ile etkili dekontaminasyon stratejilerinin bütüncül bir yaklaşımla uygulanmasını gerektirir (B. W. Buchan & N. A. Ledebor, 2014; LaCroix, Palsson, & Feist, 2017). Bu çok katmanlı yapı, moleküler analizlerin yüksek duyarlılığından kaynaklanan riskleri azaltmayı ve laboratuvar verilerinin bilimsel geçerliliğini korumayı amaçlar. Bu yaklaşımın merkezinde yer alan temel kavramlardan biri “tek yönlü iş akışı” (unidirectional workflow) ilkesidir. Tek yönlü iş akışı, nükleik asit amplifikasyonu öncesi (Pre-PCR) ve sonrası (Post-PCR) süreçlerin hem fiziksel hem de operasyonel olarak kesin sınırlarla ayrılmasını ve bu alanlar arasında geri dönüşün engellenmesini esas alır (Forbes et al., 2018). Bu prensip, özellikle PCR sırasında oluşan ampliconların temiz alanlara taşınmasını önleyerek kontaminasyon riskini belirgin biçimde azaltır. Pre-PCR alanlarının yalnızca reaktif ve master mix hazırlanması gibi kontaminasyondan uzak işlemler için kullanılması, numune DNA/RNA’sının ve amplifiye ürünlerin bu alanlara kesinlikle sokulmaması gerektiği vurgulanmaktadır. Buna karşılık Post-PCR alanları, amplifikasyon ve ürün analizinin gerçekleştirildiği, kontaminasyon açısından yüksek risk taşıyan bölgeler olarak tanımlanır (Almeria et al., 2025; Espy et al., 2006) . Bu alanların fiziksel izolasyonu ve tek yönlü iş akışı prensibiyle

yönetilmesi, yanlış pozitif sonuçların önlenmesinde temel bir strateji olarak kabul edilmektedir. Ayrıca moleküler analizlerin doğası gereği, amplifiye ürünlerin aerosolizasyon yoluyla çevreye yayılabilme potansiyeli, laboratuvar tasarımında yalnızca alan ayrımını değil; aynı zamanda hava filtrasyonu, laminar akış kabinleri, mühendislik kontrolleri ve personel eğitiminin eş zamanlı olarak uygulanmasını zorunlu kılmaktadır (Kralik & Ricchi, 2017). Bu bütünleşik yaklaşım, kontaminasyonun önlenmesi, erken tespiti ve moleküler testlerin tekrar edilebilirliği ile klinik güvenilirliğinin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir.

1.1.2. Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında Kontaminasyonun Önemi

Kontaminasyon, moleküler mikrobiyoloji ve moleküler tanı laboratuvarlarında karşılaşılan en kritik kalite ve güvenilirlik sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı yöntemlerin son derece yüksek analitik duyarlılığı, hedef dışı DNA veya RNA'nın dahi çoğaltılabilmesine neden olabildiğinden, kontaminasyon moleküler testlerin doğruluğunu doğrudan tehdit eden bir faktör hâline gelmiştir (Doern et al., 2019). Bu nedenle kontaminasyon, yalnızca teknik bir aksaklık değil; aynı zamanda bilimsel geçerlilik, klinik güvenlik ve etik sorumluluk açısından ele alınması gereken temel bir problem olarak değerlendirilmektedir. Moleküler mikrobiyoloji laboratuvarlarında da kontaminasyon genel olarak üç ana başlık altında incelenmektedir: amplicon kontaminasyonu, numuneler arası çapraz kontaminasyon ve

çevresel kontaminasyon. Bu sınıflandırma, kontaminasyonun kaynağını ve önlenmesine yönelik stratejileri doğru şekilde tanımlamak açısından önem taşır (Carey et al., 2018; Millar, Xu, & Moore, 2002). Amplicon kontaminasyonu, daha önce PCR veya benzeri amplifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilmiş ürünlerin, yeni reaksiyonlara istemsiz olarak taşınması sonucu ortaya çıkar. PCR ürünleri, milyonlarca kopya hâlinde bulunmaları ve aerosolize olabilmeleri nedeniyle en güçlü kontaminasyon kaynaklarından biri olarak kabul edilir. Pipetleme sırasında oluşan aerosol damlacıkları, yüzeylere veya ekipmanlara yerleşerek uzun süre ortamda kalabilir ve daha sonraki analizlerde yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (Guan, Chang, Mok, & Lee, 2023). Bu nedenle amplicon kontaminasyonu, PCR tabanlı analizlerde yanlış pozitif sonuçların en yaygın nedeni olarak tanımlanmaktadır (L. Gao et al., 2023). Numuneler arası çapraz kontaminasyon ise, bir numunedeki nükleik asidin başka bir numuneye fiziksel temas, pipetleme hataları veya ortak ekipman kullanımı yoluyla aktarılması sonucu meydana gelir. Özellikle yüksek örnek hacmiyle çalışılan klinik moleküler tanı laboratuvarlarında, otomasyonun sınırlı olduğu veya personel iş yükünün yüksek olduğu durumlarda bu risk daha belirgin hâle gelmektedir (Silva, Epstein, & Vega Thurber, 2023). Çapraz kontaminasyon, yalnızca yanlış pozitif sonuçlara değil; aynı zamanda örneklerin yanlış sınıflandırılmasına ve klinik tanı hatalarına da neden olabilmektedir. Çevresel kontaminasyon ise laboratuvar ortamında bulunan yüzeyler, hava, su, ekipman ve personel kaynaklı nükleik asitlerin analiz sürecine dâhil olmasıyla ortaya çıkar. Laboratuvar yüzeylerinde biriken DNA kalıntıları, yetersiz temizlik ve

dekontaminasyon uygulamaları sonucunda uzun süre ortamda kalabilir. Ayrıca hava akımı, havalandırma sistemleri ve personel hareketleri de çevresel kontaminasyonun yayılmasında rol oynayabilir (Jurasz, Pawłowski, & Perlejewski, 2021). Bu kontaminasyon türlerinin kontrol altına alınamaması, yalnızca bireysel test sonuçlarını etkilemekle kalmaz; laboratuvarın uzun vadeli bilimsel güvenilirliğini, yayın kalitesini ve klinik karar süreçlerini de ciddi şekilde zedeler. Klinik moleküler mikrobiyoloji tanı laboratuvarlarında yanlış pozitif sonuçlar, gereksiz tedavilere, hasta kaygısına ve sağlık sisteminde ek maliyetlere yol açabilirken; araştırma laboratuvarlarında ise hatalı veriler bilimsel literatürde yanlış yönlendirmelere neden olabilir (Borst, Box, & Fluit, 2004). Bu nedenlerle modern moleküler laboratuvar tasarımında temel hedef, kontaminasyonun yalnızca sonuç aşamasında tespit edilmesi değil; oluşmadan önce önlenmesi olmalıdır. Bu yaklaşım, fiziksel alan ayrımı, tek yönlü iş akışı, alanlara özgü ekipman kullanımı, etkili dekontaminasyon protokolleri ve düzenli kalite kontrol uygulamalarını içeren proaktif bir risk yönetimi stratejisini zorunlu kılar (Borst et al., 2004; Jia et al., 2022). Kontaminasyonun erken tespiti için kullanılan negatif kontroller ve boş ekstraksiyon kontrolleri ise bu yapısal önlemleri tamamlayıcı unsurlar olarak değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak, kontaminasyon kontrolü moleküler laboratuvarlarda yalnızca teknik bir gereklilik değil; doğru tanı, güvenilir araştırma ve etik sorumlulukların sürdürülebilirliği açısından temel bir kalite göstergesi olarak kabul edilmelidir. Bu bağlamda

kontaminasyonun önemi, laboratuvar tasarımının merkezinde yer alan belirleyici bir faktör olarak ele alınmalıdır.

1.1.3. Fiziksel Alanların Planlanması ve Bölümlendirme

Moleküler mikrobiyoloji laboratuvar tasarımında fiziksel alanların planlanması ve fonksiyonel olarak bölümlendirilmesi, kontaminasyon kontrolünün sağlanmasında temel belirleyici unsurlardan biridir. Özellikle PCR ve diğer nükleik asit amplifikasyon temelli yöntemlerin kullanıldığı laboratuvarlarda, PCR öncesi (Pre-PCR) ve PCR sonrası (Post-PCR) alanların fiziksel olarak ayrılması, uluslararası kılavuzlar ve iyi laboratuvar uygulamaları tarafından zorunlu bir gereklilik olarak tanımlanmaktadır (Mayer, 1995). İdeal bir moleküler laboratuvar düzeninde Pre-PCR ve Post-PCR alanları fiziksel olarak ayrı odalarda konumlandırılmalı ve bu alanlar arasında doğrudan geçiş engellenmelidir. Alanların ayrı odalarda planlanmasının mümkün olmadığı durumlarda ise, en azından ayrı çalışma istasyonları, alanlara özgü ekipman kullanımı ve bağımsız veya yönlendirilmiş hava akım sistemleri ile fonksiyonel izolasyon sağlanmalıdır. Bunun temel amacı, yüksek kopya sayısına sahip amplifiye nükleik asitlerin, amplifikasyon öncesi temiz alanlara taşınmasını önlemektir (Darafarin, Movahedinia, Darafarin, & Farzami, 2021). Pre-PCR alanları, nükleik asit amplifikasyonu öncesinde gerçekleştirilen tüm işlemleri kapsayan ve kontaminasyon açısından en hassas bölgeler olarak kabul edilen alanlardır. Bu alanlarda reaktiflerin hazırlanması, master mix oluşturulması, primer ve prob çözeltilerinin hazırlanması ile numune dışı ön hazırlık işlemleri gerçekleştirilir. Pre-PCR alanlarının en kritik

özelliği, amplifiye DNA veya RNA ile kesinlikle temas etmemesi gerekliliğidir. Bu nedenle bu alanlara yalnızca temiz ve tek kullanımlık sarf malzemeleri sokulmalı; pipetler, santrifüjler ve diğer ekipmanlar yalnızca bu alana özgü olarak tahsis edilmelidir (Carson, Miller, Srougi, & Witherow, 2019). Pre-PCR alanlarında ayrıca pozitif basınçlı hava sistemi kullanılması önerilmektedir. Pozitif basınç, laboratuvar dışından veya kontamine alanlardan bu bölgeye hava girişini engelleyerek çevresel kontaminasyon riskini azaltır. Bunun yanı sıra UV ışık kaynakları, DNA parçalayıcı yüzey dekontaminasyon ajanları ve düzenli temizlik protokolleri, Pre-PCR alanlarının güvenliğini artıran tamamlayıcı önlemler arasında yer almaktadır (Hardy, 2020). Post-PCR alanları ise nükleik asit amplifikasyonunun gerçekleştirildiği ve amplifiye ürünlerin analiz edildiği bölümleri kapsar. PCR cihazlarının bulunduğu alanlar, jel elektroforezi uygulamaları, real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi ve amplifikasyon ürünlerinin doğrulama işlemleri bu alanlarda yapılır. Post-PCR alanları, yüksek miktarda amplifiye DNA veya RNA içermeleri nedeniyle kontaminasyon açısından “yüksek riskli bölgeler” olarak kabul edilmektedir (Blake W Buchan & Nathan A Ledebøer, 2014). Bu alanlarda gerçekleştirilen işlemler sırasında oluşabilecek aerosolize PCR ürünleri, yüzeylere, ekipmanlara ve laboratuvar havasına yayılabilmektedir. Bu nedenle Post-PCR alanlarının negatif basınçlı olarak tasarlanması, kontamine havanın diğer alanlara taşınmasını önlemek açısından önemlidir. Ayrıca Post-PCR alanlarında kullanılan sarf malzemelerinin ve ekipmanların Pre-PCR alanlarına geri sokulmaması, tek yönlü iş akışı ilkesinin temel bir gereğidir

(Boonyaratanakornkit, 2025). Fiziksel alanların planlanmasında yalnızca Pre-PCR ve Post-PCR ayrımı değil; aynı zamanda numune kabul, nükleik asit ekstraksiyonu ve amplifikasyon aşamalarının da mümkün olduğunca ayrı alanlarda yürütülmesi önerilmektedir. Bu çok aşamalı alan ayrımı, özellikle klinik moleküler tanı laboratuvarlarında kontaminasyon riskini daha da azaltmakta ve test sonuçlarının güvenilirliğini artırmaktadır (Boonyaratanakornkit, 2025; Graf, 2025).

Sonuç olarak, moleküler laboratuvarlarda fiziksel alanların planlanması ve bölümlendirilmesi, kontaminasyon kontrolüne yönelik pasif bir önlem değil; laboratuvarın tüm işleyişini yönlendiren aktif bir kalite güvence stratejisi olarak değerlendirilmelidir. Pre-PCR ve Post-PCR alanlarının etkin şekilde ayrılması, tek yönlü iş akışı ve uygun hava basınç sistemleriyle desteklendiğinde, moleküler analizlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği önemli ölçüde artırılmaktadır.

1.1.4. Tek Yönlü İş Akışı Prensibi

Tek yönlü iş akışı (unidirectional workflow), mikrobiyoloji laboratuvarlarında kontaminasyon kontrolünün temel yapı taşlarından biri olup; personelin, numunelerin, ekipmanların ve sarf malzemelerinin laboratuvar içerisinde yalnızca temiz alandan kirli alana doğru ilerlemesini esas alan bir organizasyon modelidir. Bu yaklaşımın temel amacı, amplifiye nükleik asitlerin veya potansiyel olarak kontamine materyallerin, daha temiz ve hassas çalışma alanlarına geri taşınmasını önlemektir (Oelkers, 2016). Tek yönlü iş akışında süreçler genellikle reaktif hazırlama → numune hazırlama → nükleik asit amplifikasyonu → amplifikasyon ürünlerinin analizi

sırasını izler. Bu akış, Pre-PCR alanlarından başlayarak Post-PCR alanlarında sonlanır ve herhangi bir aşamadan önceki bir alana geri dönüş kesinlikle önerilmez (Stoudt, Vásquez, & Martinez, 2021). Bu kuralın ihlali, özellikle PCR ürünlerinin aerosolize olarak taşınması sonucu, temiz alanlarda amplicon kontaminasyonuna yol açabilmektedir. Personel hareketleri, tek yönlü iş akışının uygulanmasında kritik bir rol oynar. Post-PCR alanında çalışmış bir personelin, aynı gün içerisinde Pre-PCR alanına dönmesi, kontaminasyon açısından yüksek risk oluşturur. Amplifiye DNA veya RNA'nın personelin giysileri, eldivenleri veya kişisel eşyaları aracılığıyla taşınabilmesi, yanlış pozitif sonuçların en önemli nedenleri arasında yer almaktadır (Chen, Li, & Xu, 2022). Bu nedenle ideal laboratuvar organizasyonunda, personelin çalışma alanları net kurallarla sınırlandırılmalı ve mümkünse farklı personel grupları Pre-PCR ve Post-PCR alanlarında görevlendirilmelidir. Tek yönlü iş akışının sürdürülebilirliği açısından kişisel koruyucu ekipmanların (KKE) alanlara özgü olarak kullanılması büyük önem taşır. Laboratuvar önlükleri, eldivenler, boneler ve ayakkabı koruyucularının her alan için ayrı olması ve alan değişimlerinde mutlaka değiştirilmesi gerekmektedir. Özellikle Post-PCR alanında kullanılan önlük ve eldivenlerin Pre-PCR alanına taşınması, kontaminasyon riskini belirgin şekilde artırmaktadır (Stoudt et al., 2021). Bu nedenle KKE değişim prosedürleri yazılı hâle getirilmeli ve personel bu konuda düzenli olarak eğitilmelidir. Numune ve malzeme hareketleri de tek yönlü iş akışı prensibine uygun şekilde planlanmalıdır. Reaktifler ve temiz sarf malzemeleri yalnızca Pre-PCR alanlarında açılmalı ve kullanılmalı;

Post-PCR alanlarında kullanılan pipet uçları, tüpler veya diğer sarf malzemeleri kesinlikle temiz alanlara geri sokulmamalıdır. Aynı şekilde, Post-PCR alanlarında kullanılan ekipmanların başka alanlarda kullanımı yasaklanmalıdır (Nettekoven & Thomas, 2002). Bu alanlara özgü renk kodlama veya etiketleme sistemleri, iş akışının doğru şekilde uygulanmasına katkı sağlamaktadır. Tek yönlü iş akışı prensibi, yalnızca fiziksel hareketlerin düzenlenmesiyle sınırlı olmayıp; aynı zamanda zaman yönetimini de kapsar. Aynı personelin farklı alanlarda çalışmasının zorunlu olduğu durumlarda, Pre-PCR işlemlerinin Post-PCR işlemlerinden önce tamamlanması ve alan değişiminden sonra kapsamlı dekontaminasyon uygulanması önerilmektedir. Ancak bu uygulama, ideal bir çözüm olarak değil, yalnızca zorunlu durumlarda başvurulması gereken bir istisna olarak değerlendirilmelidir (Eshetu; Stoudt et al., 2021).

Sonuç olarak tek yönlü iş akışı, moleküler laboratuvarlarda kontaminasyonun önlenmesine yönelik pasif bir kural değil; laboratuvarın tüm organizasyonunu ve günlük işleyişini belirleyen aktif bir kalite güvence yaklaşımıdır. Personel, numune ve malzeme hareketlerinin bu prensibe uygun olarak planlanması, PCR temelli analizlerin doğruluğunu artırmakta ve laboratuvar sonuçlarının bilimsel ve klinik güvenilirliğini güçlendirmektedir.

1.1.5. Hava Akımı, Basınç ve Havalandırma Sistemleri

Modern moleküler laboratuvar tasarımında hava akımı, basınç farkları ve havalandırma sistemleri, kontaminasyonun önlenmesinde pasif ancak son derece etkili mühendislik kontrolleri arasında yer

almaktadır. PCR ve benzeri yüksek duyarlılığa sahip nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin kullanıldığı laboratuvarlarda, aerosolize olabilen nükleik asit parçacıkları ve amplifiye ürünler, hava yoluyla çevreye yayılabilmekte ve bu durum laboratuvarın farklı bölümleri arasında çapraz kontaminasyona neden olabilmektedir. Bu nedenle hava akımının yönlendirilmesi ve alanlar arası basınç farklarının bilinçli olarak tasarlanması, moleküler analizlerin güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir (Kumar Teotia et al., 2024). Pre-PCR alanları, nükleik asit amplifikasyonu öncesinde gerçekleştirilen işlemleri kapsaması ve kontaminasyona en duyarlı bölgeler olması nedeniyle, genellikle pozitif hava basıncı altında tasarlanır. Pozitif basınç uygulaması, bu alan içerisindeki hava basıncının komşu alanlara göre daha yüksek olmasını sağlayarak, kapı açılması veya personel hareketleri sırasında dış ortamdan veya daha kirli alanlardan bu bölgeye hava girişini engeller. Böylece çevresel kontaminantların ve potansiyel olarak amplifiye nükleik asitlerin Pre-PCR alanına taşınma riski önemli ölçüde azaltılır (Guo et al., 2025). Pre-PCR alanlarında kullanılan havalandırma sistemlerinin, mümkün olduğunca HEPA filtreleri ile donatılması ve düzenli bakımının yapılması önerilmektedir. HEPA filtreler, havadaki partiküllerin büyük bir kısmını tutarak biyolojik kontaminasyon riskini azaltır. Ayrıca bu alanlarda hava akımının laminar özellik göstermesi, özellikle reaktif ve master mix hazırlığı sırasında hava kaynaklı kontaminasyon olasılığını minimize etmektedir (Tan, Othman, Kek, Lee, & Wong, 2025). Buna karşılık Post-PCR alanları, yüksek miktarda amplifiye DNA veya RNA içeren işlemlerin gerçekleştirildiği ve kontaminasyon açısından “yüksek riskli” olarak

tanımlanan bölgelerdir. Bu alanlarda negatif hava basıncı uygulanması tercih edilir. Negatif basınç, Post-PCR alanındaki havanın çevre alanlara doğru kaçmasını engelleyerek, amplifiye ürünlerin diğer laboratuvar bölümlerine yayılmasını önler. Böylece özellikle Pre-PCR alanlarının korunması sağlanmış olur (Liu et al., 2025). Post-PCR alanlarında havalandırma sistemlerinin bağımsız olması ve mümkünse bu alanlardan çıkan havanın tekrar sirkülasyona sokulmadan doğrudan dış ortama verilmesi önerilmektedir. Bu yaklaşım, amplicon içerebilecek aerosol partiküllerinin laboratuvar genelinde yayılmasını engelleyen önemli bir önlemdir (W. Gao et al., 2025). Ayrıca bu alanlarda düzenli yüzey dekontaminasyonu ile hava sirkülasyonunun kontrollü şekilde sağlanması, kontaminasyon riskinin yönetilmesinde tamamlayıcı bir rol oynamaktadır. Hava akımı ve basınç kontrolü yalnızca Pre-PCR ve Post-PCR alanlarıyla sınırlı olmayıp; numune kabul, nükleik asit ekstraksiyonu ve analiz alanlarını da kapsayacak şekilde laboratuvar genelinde hiyerarşik bir basınç zonlaması oluşturulmasını gerektirir. Bu zonlama, en temiz alanlardan en kirli alanlara doğru kademeli bir basınç düşüşü sağlayarak, tek yönlü iş akışı prensibini fiziksel olarak destekler (Alsved et al., 2018).

Sonuç olarak, hava akımı, basınç ve havalandırma sistemleri; moleküler laboratuvarlarda kontaminasyonun önlenmesine yönelik yalnızca teknik altyapı unsurları değil, aynı zamanda laboratuvar kalite yönetim sisteminin ayrılmaz bir parçası olarak değerlendirilmelidir. Uygun şekilde tasarlanmış ve düzenli olarak izlenen havalandırma sistemleri, moleküler testlerin doğruluğunu, tekrarlanabilirliğini ve

klirik güvenilirliğini önemli ölçüde artırmaktadır. Havalandırma sistemlerinde HEPA filtrelerin kullanılması, havadaki partikül ve mikroorganizma yükünü azaltarak moleküler çalışmalar için daha güvenli bir ortam sağlar. Ayrıca laminar akış kabinleri, özellikle reaktif hazırlama aşamalarında kontaminasyon riskini en aza indirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.1.6. Ekipman ve Sarf Malzemelerinin Alan Bazlı Tahsisi

Moleküler laboratuvarlarda kontaminasyonun  nlenmesine yönelik en etkili organizasyonel önlemlerden biri, ekipman ve sarf malzemelerinin alan bazlı olarak tahsis edilmesidir. PCR ve diğer nükleik asit amplifikasyon tekniklerinde kullanılan ekipmanların, farklı işlem basamaklarında ortak kullanımı; amplifiye nükleik asitlerin temiz alanlara taşınmasına ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle Pre-PCR ve Post-PCR alanlarında kullanılan tüm ekipman ve sarf malzemelerinin kesin sınırlarla ayrılması, iyi laboratuvar uygulamalarının temel gereklilikleri arasında yer almaktadır ("Structure, function and diversity of the healthy human microbiome," 2012). Pre-PCR ve Post-PCR alanlarında kullanılan pipetler, santrifüjler, vortex cihazları, ısı blokları ve diğer yardımcı ekipmanlar kesinlikle paylaşılmamalıdır. Her bir alan için ayrı ekipman setlerinin tahsis edilmesi, amplifiye DNA veya RNA'nın mekanik temas veya aerosol yoluyla taşınmasını engelleyen kritik bir önlemdir. Özellikle pipetler, PCR süreçlerinde kontaminasyonun en sık aracılık eden ekipmanları arasında yer almakta olup, alanlar arası ortak kullanımları ciddi risk oluşurmaktadır (Joynt et al., 2010). Sarf malzemeleri açısından da

benzer bir yaklaşım benimsenmelidir. Pipet uçları, mikro santrifüj tüpleri, PCR tüpleri ve plakları gibi tek kullanımlık malzemeler, alanlara özgü olarak depolanmalı ve kullanılmalıdır. Bu bağlamda aerosol filtreli pipet uçlarının kullanımı, pipetleme sırasında oluşabilecek aerosol partiküllerinin pipet gövdesine ve sonraki örneklerle taşınmasını önleyerek kontaminasyon riskini önemli ölçüde azaltmaktadır (Chibwe et al., 2024). Özellikle düşük kopya sayılı hedeflerin analiz edildiği moleküler tanı uygulamalarında, filtreli uç kullanımı standart bir uygulama olarak önerilmektedir. Ekipman ve sarf malzemelerinin alan bazlı tahsisinde renk kodlama ve açık etiketleme sistemleri yaygın olarak kullanılan pratik yöntemlerdir. Örneğin Pre-PCR alanına ait pipetlerin belirli bir renk ile işaretlenmesi, Post-PCR ekipmanlarından görsel olarak ayırt edilmesini kolaylaştırır ve insan kaynaklı hataların önüne geçer. Bu tür görsel kontrol mekanizmaları, yoğun iş yükü altında çalışan laboratuvarlarda özellikle önem kazanmaktadır (Kruse, Wehner, & Wisplinghoff, 2016). Alanlara özgü ekipman tahsisi yalnızca kontaminasyon riskini azaltmakla kalmayıp; aynı zamanda laboratuvar içi izlenebilirliği ve kalite kontrol süreçlerini de güçlendirmektedir. Belirli bir alana ait ekipmanla ilişkilendirilen olası kontaminasyon olaylarının kaynağının daha hızlı tespit edilmesi, kök neden analizlerinin etkinliğini artırmaktadır. Bu durum, kalite yönetim sistemleri kapsamında yürütülen iç denetimler ve düzeltici-önleyici faaliyetler açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (Binnicker, 2013). Ayrıca ekipmanların alan bazlı tahsisi, bakım, kalibrasyon ve temizlik protokollerinin daha sistematik şekilde uygulanmasına da olanak tanır. Her alan için ayrı tutulan bakım ve

kullanım kayıtları, ekipman performansının izlenmesini kolaylaştırmakta ve laboratuvarın akreditasyon süreçlerinde (örneğin ISO 15189) önemli bir gerekliliği karşılamaktadır. Böylece moleküler analizlerin analitik doğruluğu ve tekrarlanabilirliği desteklenmektedir.

Sonuç olarak, ekipman ve sarf malzemelerinin alan bazlı tahsisi, moleküler laboratuvarlarda kontaminasyon kontrolüne yönelik basit bir önlem olmanın ötesinde; laboratuvar organizasyonu, kalite güvence sistemi ve bilimsel güvenilirliğin temel bileşenlerinden biri olarak değerlendirilmelidir. Bu yaklaşımın tutarlı ve disiplinli bir şekilde uygulanması, PCR temelli analizlerin doğruluğunu artırmakta ve laboratuvar sonuçlarının klinik ve akademik değerini güçlendirmektedir.

1.1.7. Dekontaminasyon ve Temizlik Prosedürleri

Dekontaminasyon ve temizlik uygulamaları, modern moleküler laboratuvar tasarımının vazgeçilmez bileşenlerinden biri olup; fiziksel alan ayrımı, tek yönlü iş akışı ve ekipmanların alan bazlı tahsisi gibi yapısal önlemleri tamamlayıcı nitelik taşır (Alfy, El Sayed, & El-Shokry, 2022). PCR ve diğer nükleik asit amplifikasyon temelli yöntemlerde, çevresel yüzeylerde, ekipmanlarda veya havada bulunan son derece düşük miktardaki DNA veya RNA kalıntıları dahi amplifiye edilerek yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle dekontaminasyon, moleküler laboratuvarlarda yalnızca rutin bir temizlik işlemi değil; analitik güvenilirliği doğrudan etkileyen kritik bir kalite güvence süreci olarak değerlendirilmelidir (Widmer & Frei, 2011). Moleküler laboratuvarlarda dekontaminasyon stratejileri, hedeflenen

kontaminantın niteliğine göre planlanmalıdır. PCR ürünleri gibi amplifiye nükleik asitler, kimyasal ve fiziksel yöntemlere karşı görece dirençli olabildiğinden, klasik temizlik uygulamaları çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu bağlamda yüzey dekontaminasyonu için sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren solüsyonlar, DNA ve RNA'yı etkili biçimde parçalayabilmeleri nedeniyle yaygın olarak önerilmektedir. Özellikle %0,5–1 oranında hazırlanan hipoklorit çözeltilerinin çalışma yüzeylerinde belirli bir temas süresiyle uygulanması, amplifiye nükleik asitlerin inaktivasyonunda etkili bulunmuştur (Dancer, 2014). Kimyasal dekontaminasyonun yanı sıra, ultraviyole (UV) ışık kullanımı da moleküler laboratuvarlarda sık başvurulan bir yöntemdir. UV ışınları, nükleik asitlerde timin dimerleri oluşturarak DNA'nın amplifikasyon yeteneğini azaltır. Özellikle Pre-PCR alanlarında laminar akış kabinleri ve çalışma tezgâhlarının UV ile düzenli olarak dekontamine edilmesi, çevresel kontaminasyon riskini azaltan önemli bir destekleyici uygulamadır. Bununla birlikte UV dekontaminasyonunun, gölgede kalan yüzeylerde sınırlı etkiye sahip olduğu unutulmamalı ve bu yöntem kimyasal temizlikle birlikte uygulanmalıdır (Arduino, 2017). Ekipmanların dekontaminasyonu, moleküler laboratuvarlarda temizlik prosedürlerinin bir diğer kritik boyutunu oluşturur. Pipetler, santrifüjler, vortex cihazları ve PCR cihazlarının dış yüzeyleri düzenli aralıklarla uygun dekontaminasyon ajanlarıyla temizlenmelidir. Özellikle pipet şaftları ve pipet uçlarının temas edebileceği yüzeyler, aerosol kaynaklı kontaminasyon açısından yüksek risk taşımaktadır. Bu nedenle ekipman temizliği için yazılı prosedürler oluşturulmalı ve uygulamalar kayıt altına alınmalıdır.

(Wendt, Frei, & Widmer, 2015). Dekontaminasyonun etkinliği yalnızca kullanılan yöntemlere değil; uygulama sıklığına ve standardizasyonuna da bağlıdır. Günlük rutin temizlik, işlem sonrası dekontaminasyon ve periyodik derin temizlik gibi farklı düzeylerde uygulamalar tanımlanmalı ve bu uygulamalar laboratuvarın iş yüküne ve risk düzeyine göre planlanmalıdır. Özellikle Post-PCR alanlarında gerçekleştirilen işlemler sonrasında, yüzeylerin ve ekipmanların derhal dekontamine edilmesi önerilmektedir (Mizuno et al., 2025). Personelin dekontaminasyon prosedürlerine uyumu da bu sürecin başarısı açısından belirleyici bir faktördür. Temizlik ve dekontaminasyon işlemlerinin kimler tarafından, hangi sıklıkta ve hangi ajanlarla yapılacağı açıkça tanımlanmalı; personel bu konuda düzenli olarak eğitilmelidir. Ayrıca dekontaminasyon uygulamalarının etkinliğinin periyodik olarak değerlendirilmesi, olası kontaminasyon kaynaklarının erken aşamada tespit edilmesine katkı sağlamaktadır (Garvey, Kremer, & Rowan, 2025).

Sonuç olarak dekontaminasyon ve temizlik prosedürleri, moleküler laboratuvarlarda kontaminasyonun önlenmesine yönelik tamamlayıcı değil, merkezi bir kontrol mekanizması olarak ele alınmalıdır. Fiziksel alan ayrımı ve tek yönlü iş akışı ile sistematik ve standartlaştırılmış dekontaminasyon uygulamaları, PCR ve benzeri yöntemlerin analitik doğruluğunu artırmakta ve laboratuvarın bilimsel, klinik ve akademik güvenilirliğini sürdürülebilir kılmaktadır.

1.2. Biyogüvenlik ve Atık Yönetimi: BSL seviyeleri, kimyasal/biyolojik atıkların bertarafı

Moleküler biyoloji ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında biyogüvenlik uygulamaları, yalnızca laboratuvar personelinin sağlığını korumayı değil; aynı zamanda çevresel güvenliği, toplum sağlığını ve deneysel verilerin bütünlüğünü sağlamayı amaçlayan çok boyutlu bir yaklaşımdır (Akşit et al., 2019). Bu bağlamda biyogüvenlik; biyolojik ajanların, genetik materyallerin ve potansiyel olarak tehlikeli kimyasalların kontrollü kullanımı, saklanması ve bertaraf edilmesini kapsayan sistematik bir çerçeve sunar. Atık yönetimi ise biyogüvenliğin tamamlayıcı bir unsuru olarak, laboratuvar kaynaklı biyolojik ve kimyasal atıkların çevreye ve canlılara zarar vermeden uzaklaştırılmasını hedefler. Modern moleküler laboratuvarlarda artan genetik manipülasyon teknikleri, rekombinant DNA çalışmaları ve patojen mikroorganizmalarla yapılan araştırmalar, biyogüvenlik ve atık yönetimi uygulamalarının standartlaştırılmasını zorunlu kılmıştır (Guerrero, Agduma, Tanalgo, Abisado-Duque, & Navarro, 2024). Bu nedenle ulusal ve uluslararası rehberler doğrultusunda belirlenen biyogüvenlik seviyeleri (Biosafety Levels, BSL) ve atık bertaraf prosedürleri, laboratuvar tasarımının ve günlük işleyişin ayrılmaz bir parçası hâline gelmiştir. Biyogüvenlik, biyolojik ajanların neden olabileceği enfeksiyon, toksisite veya çevresel yayılım risklerini en aza indirmeyi amaçlayan uygulamalar bütünüdür. Bu kavram, özellikle patojen mikroorganizmalar, hücre kültürleri, viral vektörler ve genetiği

değiştirilmiş organizmalar (GDO) ile yapılan çalışmalarda kritik öneme sahiptir (Sharma & Goswami, 2024).

Biyogüvenliğin temel ilkeleri şu başlıklar altında toplanabilir:

- Risk değerlendirmesi
- Uygun biyogüvenlik seviyesinin belirlenmesi
- Fiziksel ve mühendislik kontrolleri
- Personel eğitimi ve kişisel koruyucu ekipman kullanımı
- Acil durum ve maruziyet protokolleri

Bu ilkeler, biyolojik risklerin kaynağında kontrol altına alınmasını ve olası kazaların etkilerinin sınırlandırılmasını amaçlamaktadır. Biyogüvenlik seviyeleri, laboratuvarlarda çalışılan biyolojik ajanların risk düzeyine göre sınıflandırılmıştır ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) ve Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından tanımlanan standartlara dayanmaktadır (Ismail, Ahmed, Chakma, Chakma, & Riyaduzzaman; Joseph, Phyu, Se-Thoe, & Chu, 2022).

BSL-1

BSL-1, insan sağlığı için minimal risk taşıyan, iyi tanımlanmış ve patojenik olmayan mikroorganizmalarla yapılan çalışmaları kapsar. Bu düzeyde standart mikrobiyoloji laboratuvar uygulamaları yeterlidir.

Özel havalandırma sistemleri veya biyogüvenlik kabinleri genellikle zorunlu değildir (Brown & Dunn, 2024).

BSL-2

BSL-2 laboratuvarlar, insanlarda hastalık oluşturabilen ancak genellikle tedavi edilebilir veya önlenabilir ajanlarla yapılan çalışmaları içerir. Klinik örnekler, patojen bakteriler ve bazı virüsler bu kapsamdadır. Bu düzeyde biyogüvenlik kabinlerinin kullanımı, sınırlı erişim ve biyolojik atıkların kontrollü bertarafı zorunludur (Brown & Dunn, 2024).

BSL-3

BSL-3 laboratuvarlar, solunum yoluyla bulaşabilen ve ciddi veya ölümcül hastalıklara yol açabilen patojenlerle yapılan çalışmaları kapsar. Negatif hava basıncı, HEPA filtreli havalandırma sistemleri ve sıkı erişim kontrolü bu düzeyin temel gereklilikleridir (Brown & Dunn, 2024).

BSL-4

BSL-4, yüksek derecede tehlikeli ve genellikle tedavisi olmayan ajanlarla yapılan çalışmaları içerir. Tam izolasyon, pozitif basınçlı koruyucu giysiler ve bağımsız hava sistemleri bu laboratuvarların karakteristik özellikleridir. Kişisel koruyucu ekipmanlar, biyolojik ve kimyasal risklere karşı ilk savunma hattını oluşturur. Laboratuvar önlükleri, eldivenler, gözlükler, yüz siperlikleri ve solunum

koruyucuları, biyogüvenlik seviyesine ve yapılan işlemin niteliğine göre seçilmelidir. KKE'nin doğru kullanımı ve uygun şekilde bertaraf edilmesi, çapraz kontaminasyon riskini önemli ölçüde azaltır (Brown & Dunn, 2024). Biyolojik atıklar, enfeksiyöz potansiyeline göre farklı kategorilerde değerlendirilir:

- Enfeksiyöz atıklar
- Patolojik atıklar
- Kesici-delici atıklar
- Genetik materyal içeren atıklar

Bu atıkların her biri, farklı toplama ve bertaraf prosedürlerine tabidir. Biyolojik atıkların bertarafında en yaygın kullanılan yöntemler arasında otoklavlama, kimyasal dezenfeksiyon ve yakma yer almaktadır (Pastorino, de Lamballerie, & Charrel, 2017). Otoklavlama, özellikle mikroorganizmaların inaktivasyonunda altın standart olarak kabul edilir. Kimyasal dezenfektanlar ise sıvı atıkların ön işlemlerinde tercih edilmektedir. Moleküler laboratuvarlarda kullanılan fenol, kloroform, etidyum bromür ve ağır metal içeren çözeltiler, çevresel açıdan yüksek risk taşır. Bu tür atıklar, biyolojik atıklardan ayrı olarak toplanmalı ve lisanslı bertaraf tesislerine gönderilmelidir. Rekombinant DNA teknolojileri ile elde edilen organizmaların atıkları, biyogüvenlik açısından özel düzenlemelere tabidir (Pavone et al., 2024). Bu atıkların bertarafı öncesinde inaktivasyon işlemleri zorunludur. Atıkların uygun şekilde etiketlenmesi, içeriğinin ve risk düzeyinin açıkça belirtilmesi, olası kazaların önlenmesinde kritik öneme sahiptir. İzlenebilirlik sistemleri, kalite yönetim standartlarının da temel bileşenidir.

Biyogüvenlik ve atık yönetimi uygulamalarının etkinliği, personelin bu konulardaki bilgi ve farkındalık düzeyi ile doğrudan ilişkilidir. Düzenli eğitim programları ve tatbikatlar, olası maruziyet ve dökülme durumlarında hızlı ve doğru müdahaleyi mümkün kılar. Biyogüvenlik, yalnızca teknik önlemlerle sınırlı olmayan; kurumsal kültürün bir parçası hâline gelmesi gereken dinamik bir süreçtir. Sürdürülebilir atık yönetimi yaklaşımları, çevresel sorumluluk bilinci ile bütünleşmelidir (Akşit et al., 2019; Control & Prevention, 2011).

1.3. Çözelti Hazırlama ve Hesaplamalar: Molarite, dilüsyon formülleri, pH metre kullanımı ve tampon sistemleri

Moleküler biyoloji ve biyomedikal araştırma laboratuvarlarında deneysel güvenilirliğin ve tekrarlanabilirliğin sağlanmasında çözelti hazırlama süreçleri temel bir rol oynamaktadır. Kullanılan tamponların, reaktiflerin ve çalışma çözeltilerinin doğru konsantrasyonlarda, uygun pH aralığında ve kimyasal stabilitesi korunacak şekilde hazırlanması, özellikle nükleik asit temelli tekniklerde (PCR, elektroforez, klonlama, sekanslama) deney sonuçlarının doğruluğunu doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle çözelti hazırlama ve buna bağlı matematiksel hesaplamalar, laboratuvar altyapısının vazgeçilmez bileşenleri arasında yer almaktadır (Xue Li, Dorothy Pei Shan, Zhen Xuan, & Burnett, 2023).

1.3.1. Molarite ve Konsantrasyon Kavramları

Molarite (M), bir çözeltide bulunan çözünen maddenin litre başına mol cinsinden miktarını ifade eder ve aşağıdaki formül ile tanımlanır:

$$M = \text{Mol sayısı} / \text{Çözelti hacmi (L)}$$

Molarite hesaplamaları, özellikle enzimatik reaksiyonlar, tampon sistemleri ve standart çözelti hazırlıklarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bir çözeltinin molaritesini belirlemek için öncelikle çözünen maddenin molekül ağırlığı (molar kütle) bilinmelidir. Tartılan maddenin gram cinsinden miktarı, molar kütleyle bölünerek mol sayısı hesaplanır ve hedeflenen hacme tamamlanır (Steven, 2020).

Örneğin, molekül ağırlığı 58.44 g/mol olan sodyum klorürden (NaCl) 1 L hacimde 1 M çözelti hazırlamak için 58.44 g NaCl tartılması gerekmektedir. Ancak moleküler biyoloji uygulamalarında çoğunlukla milimolar (mM) ve mikromolar (μM) konsantrasyonlar tercih edilmektedir.

1.3.2. Dilüsyon (Seyreltme) Hesaplamaları

Laboratuvar uygulamalarında stok çözeltilerden çalışma çözeltileri hazırlanırken dilüsyon hesaplamaları kullanılmaktadır. Bu hesaplamalar genellikle aşağıdaki temel formüle dayanmaktadır:

$$C_1XV_1 = C_2XV_2$$

Burada:

- C1: Stok çözeltinin konsantrasyonu
- V1: Stok çözeltiden alınacak hacim
- C2: Hedef çözeltinin konsantrasyonu
- V2: Nihai çözeltinin hacmi

Bu formül, özellikle enzim stokları, primer çözeltileri ve boya dilüsyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Dilüsyon işlemlerinde kullanılan pipetlerin kalibrasyonunun doğru olması, hesaplanan hacimlerin gerçek uygulamayla uyumlu olması açısından kritik öneme sahiptir. Seri dilüsyonlar, özellikle mikrobiyal sayım, toksisite analizleri ve standard eğri oluşturma çalışmalarında tercih edilir. Bu yöntemde her bir dilüsyon adımı bir önceki çözelti üzerinden gerçekleştirilir ve hata birikimini önlemek için dikkatli planlama gerektirir (Zhang, Huang, Yao, & Xue, 2021).

1.3.3. pH Kavramı ve pH Ölçümü

pH, bir çözeltideki hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması olarak tanımlanır:

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

Enzim aktivitesi, nükleik asit stabilitesi ve protein konformasyonu gibi birçok biyokimyasal süreç pH'a duyarlıdır. Bu nedenle tampon çözeltilerin hedef pH aralığında hazırlanması deneysel başarının ön koşullarından biridir. pH ölçümünde kullanılan pH

metreler, düzenli olarak kalibre edilmelidir. Kalibrasyon işlemi genellikle pH 4.00, 7.00 ve 10.00 tamponları kullanılarak gerçekleştirilir. Ölçüm sırasında elektrotların temizliği, hidrasyonu ve sıcaklık dengesi ölçüm doğruluğunu etkileyen önemli faktörlerdir (Vonau & Guth, 2006).

1.3.4. Tampon Sistemlerinin Temel Prensipleri

Tampon çözeltiler, zayıf bir asit ve onun konjuge bazı veya zayıf bir baz ve onun konjuge asidinden oluşur. Tampon kapasitesi, çözeltinin pH değişikliklerine karşı direnç gösterebilme yeteneğini ifade eder ve Henderson–Hasselbalch denklemi ile açıklanır:

$$\text{pH}=\text{pK}_a+\log[\text{HA}]/[\text{A}^-]$$

Bu denklem, tampon hazırlama sırasında asit/baz oranlarının ayarlanmasında temel rehber olarak kullanılır (Po & Senozan, 2001).

1.3.5. Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu, agaroz jel elektroforezinde yaygın olarak kullanılan bir tampon sistemidir. DNA'nın göçü sırasında düşük iyonik güce sahip olması nedeniyle uzun fragmentlerin ayrımında avantaj sağlar. EDTA bileşeni, Mg^{2+} iyonlarını şelatlayarak DNaz aktivitesini inhibe eder. TAE tamponu genellikle 50X stok olarak hazırlanır ve kullanım öncesinde seyreltilir. Ancak düşük tampon kapasitesi nedeniyle uzun süreli elektroforezlerde pH değişimleri gözlemlenebilir (Fabrice et al., 2025).

1.3.6. Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu

TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu, daha yüksek tampon kapasitesine sahip olması nedeniyle küçük DNA fragmentlerinin ayırımında tercih edilmektedir. Borat iyonları, elektrik akımına karşı daha stabil bir ortam sağlar. Bununla birlikte boratın bazı enzimatik reaksiyonları inhibe edebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (de Souza et al., 2025).

1.3.7. PBS (Phosphate Buffered Saline)

Phosphate Buffered Saline (PBS), fizyolojik pH ve ozmolariteye sahip olması nedeniyle hücre kültürü, immünohistokimya ve protein bazlı analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fosfat tampon sistemi, pH 7.2–7.4 aralığında stabilite sağlar. Ancak fosfat iyonları, bazı metal iyonlarına bağımlı reaksiyonlarda inhibitör etki gösterebilir (Rodino et al., 2020).

1.3.8. Çözelti Hazırlamada Sterilite ve Saklama Koşulları

Hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu genellikle otoklavlama veya membran filtrasyonu ile sağlanır. Isıya duyarlı çözeltiler için 0.22 µm filtreler tercih edilir. Saklama koşulları, çözeltinin kimyasal stabilitesine göre oda sıcaklığı, +4 °C veya –20 °C olarak belirlenmelidir (Matheron et al., 2020).

1.4. Pipetleme ve Ekipman Kalibrasyonu: Pipetleme Hataları ve Cihazların Bakımı

Moleküler mikrobiyoloji ve moleküler tanı laboratuvarlarında elde edilen sonuçların doğruluğu ve tekrarlanabilirliği, yalnızca kullanılan yöntemlerin analitik duyarlılığına değil; aynı zamanda manuel ve otomatik işlemlerin doğrulukla yürütülmesine doğrudan bağlıdır (Guan et al., 2023). Bu bağlamda pipetleme işlemleri ve laboratuvar ekipmanlarının düzenli kalibrasyonu, deneysel hataların azaltılmasında ve kalite güvencesinin sağlanmasında temel unsurlar arasında yer almaktadır. Özellikle PCR ve diğer nükleik asit amplifikasyon temelli yöntemlerde, mikrolitre ve hatta nanolitre düzeyindeki hacim hataları, sonuçların güvenilirliğini ciddi biçimde etkileyebilmektedir (Ciupe, Lovasz, Kristof, Sandu, & Sticlaru, 2025). Pipetleme, moleküler laboratuvarlarda en sık uygulanan ve aynı zamanda en fazla hata potansiyeli barındıran manuel işlemlerden biridir. Reaktiflerin, nükleik asit örneklerinin ve enzimlerin doğru hacimlerde aktarılması; PCR verimliliği, amplifikasyon kinetiği ve kantitatif analizlerin doğruluğu açısından belirleyici rol oynamaktadır. Özellikle real-time PCR gibi kantitatif yöntemlerde, pipetleme hataları doğrudan Ct değerlerinde sapmalara ve yanlış yorumlara yol açabilmektedir (Sandu et al., 2025). Düşük hacimli pipetleme işlemlerinde oluşabilecek küçük hatalar, oransal olarak büyük sonuç farklılıkları yaratabilmektedir. Bu durum, pipetleme doğruluğunun ve hassasiyetinin, moleküler laboratuvarlarda neden temel kalite parametreleri olarak değerlendirildiğini açıkça ortaya koymaktadır. Pipetleme hataları genel olarak sistematik hatalar ve rastgele hatalar

olmak üzere iki ana grupta değerlendirilmektedir. Sistematik hatalar, pipetin kalibrasyonunun bozulması veya yanlış kullanım alışkanlıkları gibi sürekli tekrar eden faktörlerden kaynaklanırken; rastgele hatalar, operatörün deneyimi, el stabilitesi ve çevresel koşullar gibi değişkenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (ISO 8655).

Başlıca pipetleme hatası kaynakları şunlardır:

- Pipetin nominal hacim aralığı dışında kullanılması
- Pipet ucunun tam oturtulmaması
- Hızlı veya düzensiz aspirasyon ve dispansasyon
- Pipetin dik tutulmaması
- Pipet uçlarının tekrar kullanılması
- Uygun olmayan pipet ucu seçimi

Bu faktörlerin her biri, özellikle enzimatik reaksiyonların hassas olduğu moleküler analizlerde ciddi sonuç sapmalarına yol açabilmektedir (Dettinger et al., 2022). Pipetleme sırasında oluşan aerosol partikülleri, yalnızca hacim doğruluğunu değil; aynı zamanda kontaminasyon riskini de artırmaktadır. Özellikle PCR ürünleriyle çalışılan ortamlarda, aerosolize olmuş nükleik asit parçacıkları, pipet şaftına ve çevresel yüzeylere yayılabilmektedir. Bu durum, amplicon kontaminasyonunun en yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Xue Li et al., 2023). Bu riski azaltmak amacıyla moleküler laboratuvarlarda aerosol filtreli pipet uçlarının kullanımı standart bir uygulama hâline gelmiştir. Filtreli uçlar, sıvı ve aerosol geçişini fiziksel olarak engelleyerek hem pipetin iç mekanizmasını hem de sonraki

örnekleri korumaktadır (Mona Noor et al., 2021). Pipetleme doğruluğu üzerinde operatör deneyimi ve eğitimi belirleyici rol oynamaktadır. Aynı pipeti kullanan farklı kişilerin, anlamlı derecede farklı hacim hataları oluşturabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle pipetleme tekniklerinin standartlaştırılması ve personelin düzenli aralıklarla eğitilmesi, kalite yönetim sistemlerinin temel bileşenlerinden biridir (Xue Li et al., 2023). Eğitim programlarında pipetin doğru tutulma açısı, aspirasyon–dispansasyon hızları, ön ıslatma (pre-wetting) tekniği ve doğru pipet ucu kullanımı gibi temel prensipler vurgulanmalıdır. Pipet kalibrasyonu, pipetin belirlenen hacmi doğru ve tekrarlanabilir şekilde verebildiğinin doğrulanması sürecidir. Uluslararası standartlara göre (ISO 8655), pipetlerin belirli aralıklarla kalibre edilmesi ve bu işlemlerin kayıt altına alınması gerekmektedir. Kalibrasyon yapılmayan veya kalibrasyonu bozulmuş pipetlerin kullanımı, sistematik hacim hatalarına ve güvenilmez sonuçlara yol açmaktadır (ISO 8655). Moleküler laboratuvarlarda pipetlerin kalibrasyon sıklığı; kullanım yoğunluğu, çalışılan hacim aralıkları ve laboratuvarın kalite gereksinimlerine bağlı olarak belirlenmelidir. Genel olarak, yoğun kullanılan pipetler için 3–6 ayda bir, daha az kullanılan pipetler için ise yılda en az bir kez kalibrasyon önerilmektedir (Park et al., 2018). Kalibrasyon genellikle gravimetrik yöntemle yapılmakta olup, bu yöntemde pipetlenen sıvının ağırlığı ölçülerek hacim hesaplanmaktadır. Bu yaklaşım, yüksek doğruluk ve izlenebilirlik sağlaması nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Moleküler laboratuvarlarda pipetlerin yanı sıra santrifüjler, termal sıklırlar, inkübatörler, biyogüvenlik kabinleri ve spektrofotometreler gibi cihazların da

düzenli kalibrasyonu gereklidir. Özellikle PCR cihazlarında sıcaklık sapmaları, amplifikasyon verimliliğini doğrudan etkileyerek yanlış negatif veya değişken sonuçlara yol açabilmektedir (Zhao, Yuan, Lin, Zheng, & You, 2024). Kalibrasyonun yanı sıra önleyici bakım (preventive maintenance) uygulamaları, ekipman performansının sürdürülebilirliğini sağlamak açısından kritik öneme sahiptir. Cihaz üreticilerinin önerdiği bakım aralıklarına uyulması, arıza riskini azaltmakta ve cihaz ömrünü uzatmaktadır. Bakım ve kalibrasyon kayıtlarının düzenli tutulması, akreditasyon süreçleri açısından da zorunludur (ISO 15189). Pipetleme doğruluğu ve ekipman kalibrasyonu, moleküler laboratuvarlarda uygulanan kalite yönetim sistemlerinin ayrılmaz bir parçasıdır. ISO 15189 ve benzeri standartlar, ölçüm belirsizliğinin kontrol altına alınmasını ve kullanılan tüm ölçüm ekipmanlarının izlenebilir olmasını şart koşmaktadır. Bu bağlamda pipetleme ve kalibrasyon uygulamaları, yalnızca teknik değil; aynı zamanda yönetsel bir sorumluluk alanı olarak değerlendirilmelidir (Jean-Marc et al., 2025).

Sonuç olarak pipetleme ve ekipman kalibrasyonu, moleküler laboratuvarlarda deneysel doğruluğun ve veri güvenilirliğinin temel belirleyicilerindendir. Pipetleme hatalarının en aza indirilmesi, düzenli kalibrasyon ve bakım uygulamaları ile desteklendiğinde, moleküler analizlerin analitik performansı önemli ölçüde artırılmaktadır. Bu süreçlerin sistematik ve belgelenmiş şekilde yürütülmesi hem akademik araştırmaların hem de klinik moleküler tanı uygulamalarının bilimsel güvenilirliğini sürdürülebilir kılmaktadır.

KAYNAKÇA

- Akşit, A., Erdoğan, E., Karaca, S., Özkan, B., Gürgel, A., Yürük, M., . . . Uyar, Y. (2019). Biosafety principles in parasitology laboratories. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*, 4(4), 117-151.
- Alfy, M. M., El Sayed, S. B., & El-Shokry, M. (2022). Assessing decontamination practices at a medical microbiology research laboratory. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 4(2), 124-129.
- Almeria, S., Grocholl, J., Mullins, J., Durigan, M., Ewing-Peebles, L., Rogers, E. L., . . . Wang, S. S. (2025). Multi-laboratory validation of a modified real-time PCR assay (Mit1C) for the detection of *Cyclospora cayetanensis* in fresh produce. *Food Microbiol*, 128, 104727. doi:10.1016/j.fm.2025.104727
- Alsved, M., Civilis, A., Ekolind, P., Tammelin, A., Andersson, A. E., Jakobsson, J., . . . Löndahl, J. (2018). Temperature-controlled airflow ventilation in operating rooms compared with laminar airflow and turbulent mixed airflow. *Journal of Hospital Infection*, 98(2), 181-190. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.10.013
- Arduino, M. J. (2017). Decontamination in the microbiology laboratory. *Biological safety: principles and practices*, 463-473.
- Boonyaratankornkit, J. (2025). Molecular Microbiology Standardization. *Manual of Molecular Microbiology: Fundamentals and Applications*, 203-213.
- Borst, A., Box, A. T., & Fluit, A. C. (2004). False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions

- for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23(4), 289-299. doi:10.1007/s10096-004-1100-1
- Brown, C. A., & Dunn, J. J. (2024). Laboratory safety. *Clinical laboratory management*, 343-372.
- Buchan, B. W., & Ledebøer, N. A. (2014). Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*, 27(4), 783-822. doi:10.1128/cmr.00003-14
- Buchan, B. W., & Ledebøer, N. A. (2014). Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 783-822.
- Carey, R. B., Bhattacharyya, S., Kehl, S. C., Matukas, L. M., Pentella, M. A., Salfinger, M., & Schuetz, A. N. (2018). Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Implementing a Quality Management System in the Medical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev*, 31(3). doi:10.1128/cmr.00062-17
- Carson, S., Miller, H. B., Srougi, M. C., & Witherow, D. S. (2019). *Molecular biology techniques: a classroom laboratory manual*: Academic Press.
- Chen, Y., Li, E.-M., & Xu, L.-Y. (2022). Guide to metabolomics analysis: a bioinformatics workflow. *Metabolites*, 12(4), 357.
- Chibwe, K., Sundararaju, S., Zhang, L., Tsui, C., Tang, P., & Ling, F. (2024). Intra-hospital microbiome variability is driven by accessibility and clinical activities. *Microbiology spectrum*, 12(8), e00296-00224.

- Ciupe, V., Lovasz, E.-C., Kristof, R., Sandu, M.-O., & Sticlaru, C. (2025). Design, Simulation and Experimental Validation of a Pneumatic Actuation Method for Automating Manual Pipetting Devices. *Machines*, 13(5), 389. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-1702/13/5/389>
- Control, C. f. D., & Prevention. (2011). Guidelines for biosafety laboratory competency. *MMWR*, 60(02), 1-6.
- Dancer, S. (2014). Cleaning and decontamination of the healthcare environment. In *Decontamination in hospitals and healthcare* (pp. 370-397): Elsevier.
- Darafarin, S., Movahedinia, S., Darafarin, H., & Farzami, M. R. (2021). Design of Physical Spaces in Medical Laboratories. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 15(5).
- de Souza, R. L., Franco, C. A., Nakagawa, S. I., Perdomo, D. N., Torres, T. B., Veloso, J. S., . . . Reis, A. (2025). Molecular identification, relative prevalence, and host range of *Berkeleyomyces* species associated with the lettuce and other leaf vegetables in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 50(1), 25. doi:10.1007/s40858-025-00708-1
- Dettinger, P., Kull, T., Arekatla, G., Ahmed, N., Zhang, Y., Schneider, F., . . . Schroeder, T. (2022). Open-source personal pipetting robots with live-cell incubation and microscopy compatibility. *Nature Communications*, 13(1), 2999. doi:10.1038/s41467-022-30643-7
- Doern, G. V., Carroll, K. C., Diekema, D. J., Garey, K. W., Rupp, M. E., Weinstein, M. P., & Sexton, D. J. (2019). Practical Guidance

- for Clinical Microbiology Laboratories: A Comprehensive Update on the Problem of Blood Culture Contamination and a Discussion of Methods for Addressing the Problem. *Clin Microbiol Rev*, 33(1). doi:10.1128/cmr.00009-19
- Eshetu, L. Evaluation of Hospital Laboratory Workflow Design in Ethiopia: Blood Specimen Collection and Chemistry Laboratory Testing.
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., . . . Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 19(1), 165-256. doi:10.1128/cmr.19.1.165-256.2006
- Fabrice, G., Kennedy, S., Jamuna, V., Balasubrahmanyam, A., Matthew, L., & Kevin, W. (2025). Retention and efficiency of a novel slalom chromatography column: An alternative to agarose gel electrophoresis for DNA separation. *Journal of Chromatography A*, 1761, 466293. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466293
- Forbes, B. A., Hall, G. S., Miller, M. B., Novak, S. M., Rowlinson, M. C., Salfinger, M., . . . Wilson, M. L. (2018). Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 31(2). doi:10.1128/cmr.00038-17
- Gao, L., Li, L., Fang, B., Fang, Z., Xiang, Y., Zhang, M., . . . Peng, H. (2023). Carryover Contamination-Controlled Amplicon Sequencing Workflow for Accurate Qualitative and Quantitative Detection of Pathogens: a Case Study on SARS-

- CoV-2. *Microbiol Spectr*, 11(3), e0020623. doi:10.1128/spectrum.00206-23
- Gao, W., Wu, Z., Zuo, K., Xiang, Q., Zhang, L., Chen, X., . . . Liu, H. (2025). Global Safety and Health: The History of High-Level Biosafety Laboratories Toward Large Scientific Facilities. *Laboratories*, 2(1), 3. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2813-8856/2/1/3>
- Garvey, M., Kremer, T. A., & Rowan, N. J. (2025). Efficacy of cleaning, disinfection, and sterilization modalities for addressing infectious drug-resistant fungi: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 136(1), 1xaf005.
- Graf, E. (2025). Laboratory Design for Molecular Technologies. *Manual of Molecular Microbiology: Fundamentals and Applications*, 145-152.
- Guan, X. L., Chang, D. P. S., Mok, Z. X., & Lee, B. (2023). Assessing variations in manual pipetting: An under-investigated requirement of good laboratory practice. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab*, 30, 25-29. doi:10.1016/j.jmsacl.2023.09.001
- Guerrero, J. J. G., Agduma, A. R., Tanalgo, K. C., Abisado-Duque, R. G., & Navarro, F. J. B. (2024). Minimizing environmental footprints of biological wastes through biosafety and biosecurity measures. In *Biosafety and Biosecurity* (pp. 93-119): CRC Press.
- Guo, J., Zhang, W., Zhong, J., Zeng, X., Yang, K., Li, Z., . . . Zhang, C. (2025). Assessment of aerosol infection risk and airflow organization optimization in biosafety level 4 laboratories.

- Journal of Building Engineering*, 103, 112059.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jobbe.2025.112059>
- Hardy, D. J. (2020). Practical Aspects and Considerations When Planning a New Clinical Microbiology Laboratory. *Clinics in Laboratory Medicine*, 40(4), 421.
- Ismail, A., Ahmed, J., Chakma, M., Chakma, L., & Riyaduzzaman, M. The Role of Microbiology in Bioterrorism: Identification and Management of Biological Threats.
- Jean-Marc, G., Anne, V., Anna, C., Armand Perret, L., Ivan, M. B., Pradeep Kumar, D., . . . Egon, P. A. (2025). Ensuring internal quality control practices in medical Laboratories: IFCC recommendations for practical applications based on ISO 15189:2022. *Clinica Chimica Acta*, 571, 120240.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120240>
- Jia, Y., Zhao, S., Guo, W., Peng, L., Zhao, F., Wang, L., . . . Chen, J. (2022). Sequencing introduced false positive rare taxa lead to biased microbial community diversity, assembly, and interaction interpretation in amplicon studies. *Environ Microbiome*, 17(1), 43. doi:10.1186/s40793-022-00436-y
- Joseph, T., Phyu, S., Se-Thoe, S. Y., & Chu, J. J. H. (2022). Biorisk management for SARS-coV-2 research in a biosafety level-3 core facility. In *SARS-CoV-2: Methods and Protocols* (pp. 441-464): Springer.
- Joynt, G. M., Loo, S., Taylor, B. L., Margalit, G., Christian, M. D., Sandrock, C., . . . Sprung, C. L. (2010). Chapter 3. Coordination

- and collaboration with interface units. *Intensive care medicine*, 36(Suppl 1), 21-31.
- Jurasz, H., Pawłowski, T., & Perlejewski, K. (2021). Contamination Issue in Viral Metagenomics: Problems, Solutions, and Clinical Perspectives. *Front Microbiol*, 12, 745076. doi:10.3389/fmicb.2021.745076
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology, Volume 8 - 2017*. doi:10.3389/fmicb.2017.00108
- Kruse, E.-B., Wehner, A., & Wisplinghoff, H. (2016). Prevalence and distribution of *Legionella* spp in potable water systems in Germany, risk factors associated with contamination, and effectiveness of thermal disinfection. *American Journal of Infection Control*, 44(4), 470-474.
- Kumar Teotia, A., Singh Chauhan, A., Thota, P., Kumari, B., kumar, P., Verma, O., . . . Singh Raghuvanshi, R. (2024). Engineering advances in safe laboratory design for pharmaceutical microbiology and assessment of their biohazard risk measures. *Safety Science*, 174, 106458. doi:https://doi.org/10.1016/j.ssci.2024.106458
- Kwok, S. a., & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR.
- LaCroix, R. A., Palsson, B. O., & Feist, A. M. (2017). A Model for Designing Adaptive Laboratory Evolution Experiments. *Appl Environ Microbiol*, 83(8). doi:10.1128/aem.03115-16

- Liu, Z., Zhang, C., Hu, C., Rong, R., Shi, Y., & Li, C. (2025). Biological aerosol transmission characteristics and exposure risk assessment in a typical biosafety laboratory. *Energy and Built Environment*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enbenv.2025.04.002>
- Matheron, A., Guerault, M.-N., Vazquez, R., Cheron, M., Brossard, D., & Crauste-Manciet, S. (2020). Microbiological stability tests with simulated broth preparations and integrity testing for sterile standard cytotoxic preparations. *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy*, 5(1). doi:[doi:10.1515/pthp-2020-0002](https://doi.org/10.1515/pthp-2020-0002)
- Mayer, L. (1995). *Design and Planning of Research and Clinical Laboratory Facilities*: John Wiley & Sons.
- Millar, B. C., Xu, J., & Moore, J. E. (2002). Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *J Clin Microbiol*, 40(5), 1575-1580. doi:[10.1128/jcm.40.5.1575-1580.2002](https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1575-1580.2002)
- Mizuno, M., Kimbara, S., Ichise, H., Ishikawa, N., Nishihara, Y., Nishio, M., & Sekiya, I. (2025). Cleaning methods for biosafety cabinet to eliminate residual mycoplasmas, viruses, and endotoxins after changeover. *Regenerative Therapy*, 28, 73-80.
- Mona Noor, J., Abhishek, B., Riley, L., Anna, B., Pablo, P.-P., & Karin, J. (2021). Remote Laboratory Exercise to Develop Micropipetting Skills. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 22(1), 10.1128/jmbe.v1122i1121.2399. doi:[10.1128/jmbe.v22i1.2399](https://doi.org/10.1128/jmbe.v22i1.2399)

- Nettekoven, M., & Thomas, A. W. (2002). Accelerating drug discovery by integrative implementation of laboratory automation in the work flow. *Current medicinal chemistry*, 9(23), 2179-2190.
- Oelkers, P. (2016). Molecular Biology Laboratory Manual.
- Park, C.-Y., Yeon, J., Song, H.-J., Kim, Y.-S., Nahm, K.-B., & Kim, J.-D. (2018). Automated pipette failure monitoring using image processing for point-of-care testing devices. *BioMedical Engineering OnLine*, 17(2), 144. doi:10.1186/s12938-018-0578-1
- Pastorino, B., de Lamballerie, X., & Charrel, R. (2017). Biosafety and biosecurity in European containment level 3 laboratories: focus on French recent progress and essential requirements. *Frontiers in public health*, 5, 121.
- Pavone, S., Iscaro, C., Giammarioli, M., Beato, M. S., Righi, C., Petrini, S., . . . Feliziani, F. (2024). Biological containment for african swine fever (ASF) laboratories and animal facilities: the Italian challenge in bridging the present regulatory gap and enhancing biosafety and biosecurity measures. *Animals*, 14(3), 454.
- Po, H. N., & Senozan, N. M. (2001). The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations. *Journal of Chemical Education*, 78(11), 1499. doi:10.1021/ed078p1499
- Rodino, K. G., Espy, M. J., Buckwalter, S. P., Walchak, R. C., Germer, J. J., Fernholz, E., . . . Binnicker, M. J. (2020). Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for

- SARS-CoV-2 Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6), 10.1128/jcm.00590-00520. doi:doi:10.1128/jcm.00590-20
- Sandu, M.-O., Ciupe, V., Gruescu, C.-M., Kristof, R., Sticlaru, C., & Tulcan, E.-G. (2025). Determining the Proper Force Parameters for Robotized Pipetting Devices Used in Automated Polymerase Chain Reaction (PCR). *Robotics*, 14(1), 2. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2218-6581/14/1/2>
- Setia, R. D., Dogra, M., Gupta, G., Mangwana, S., Sachan, D., Rahman, A. E., & Handoo, A. (2026). False positives in transfusion-transmitted infection proficiency testing due to matrix effects in external quality assessment samples: lessons for clinical laboratories. *Laboratory Medicine*, 57(1). doi:10.1093/labmed/lmaf090
- Sharma, B., & Goswami, M. (2024). Safety Precautions in the Laboratory. In *The Handbook of Zoonotic Diseases of Goats* (pp. 109-120): CABI GB.
- Silva, D. P., Epstein, H. E., & Vega Thurber, R. L. (2023). Best practices for generating and analyzing 16S rRNA amplicon data to track coral microbiome dynamics. *Frontiers in Microbiology*, Volume 13 - 2022. doi:10.3389/fmicb.2022.1007877
- Steven, M. T. (2020). Chapter 6 - Laboratory calculations. 97-117. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00006-5>
- Stoudt, S., Vásquez, V. N., & Martinez, C. C. (2021). Principles for data analysis workflows. *PLOS Computational Biology*, 17(3), e1008770.

- Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. (2012). *nature*, 486(7402), 207-214.
- Tan, H., Othman, M. H. D., Kek, H. Y., Lee, C. H., & Wong, K. Y. (2025). Would surgery duration affect the microbial concentration in operating rooms? Implications for sustainable and low-carbon healthcare environments. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 27(12), 8585-8597. doi:10.1007/s10098-024-02984-y
- Vonau, W., & Guth, U. (2006). pH Monitoring: a review. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 10(9), 746-752. doi:10.1007/s10008-006-0120-4
- Wendt, C., Frei, R., & Widmer, A. F. (2015). Decontamination, disinfection, and sterilization. *Manual of clinical microbiology*, 183-216.
- Widmer, A. F., & Frei, R. (2011). Decontamination, disinfection, and sterilization. *Manual of clinical microbiology*, 143-173.
- Xue Li, G., Dorothy Pei Shan, C., Zhen Xuan, M., & Bernett, L. (2023). Assessing variations in manual pipetting: An under-investigated requirement of good laboratory practice. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*, 30, 25-29. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2023.09.001
- Zhang, Z., Huang, X., Yao, P., & Xue, J. (2021). A New Method for Weld Dilution Calculation through Chemical Composition Analysis. *Metals*, 11(1), 131. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-4701/11/1/131>

Zhao, X., Yuan, Z., Lin, L., Zheng, C., & You, H. (2024). Development of a New Lightweight Multi-Channel Micro-Pipette Device. *Machines*, 12(6), 359. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-1702/12/6/359>

BÖLÜM 2:

NÜKLEİK ASİT İZOLASYON STRATEJİLERİ

Dr. Mahmut UÇAR

Atatürk Üniversitesi

Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: drmahmutucar@hotmail.com

Moleküler Biyolog Sıla EKTAŞ KALAYCI

Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: sila.ektas14@erzurum.edu.tr

GİRİŞ

Nükleik asit izolasyonu, moleküler biyolojide merkezi bir adımdır ve amplifikasyon, sekanslama, klonlama ve ekspresyon analizi gibi analitik ve fonksiyonel uygulamalar için başlangıç materyali sağlar.

Bu bölüm, biyokimyasal ve fizikokimyasal prensiplerin farklı örnek tiplerine ve saflaştırma teknolojilerine nasıl uygulandığına odaklanarak, DNA ve RNA izolasyon stratejilerine genel bir bakış sunmaktadır. Klasik organik ekstraksiyon yöntemleri, katı faz sistemleri ve manyetik boncuk tabanlı yaklaşımlar, ön analitik hususlar ve kalite kontrol stratejileriyle paralel olarak ele alınmaktadır. Bu bölümler birlikte, nükleik asit izolasyon iş akışlarını anlamak, seçmek ve değerlendirmek için kavramsal bir çerçeve sağlamaktadır.

2.1. DNA İzolasyonu Teknikleri: Fenol-Kloroform yöntemi, Spin-kolon sistemleri ve Manyetik boncuk teknolojisi

Genomik DNA izolasyonu, proteinler, lipitler, polisakkaritler ve enzimatik inhibitörler tarafından kontaminasyonu en aza indirirken, biyolojik örneklerden yüksek molekül ağırlıklı, kimyasal olarak bozulmamış DNA'yı geri kazanmayı amaçlar. Çok sayıda ticari kit ve otomatik platform mevcut olmasına rağmen, çoğu DNA izolasyon iş akışı, çözeltide ve saflaştırma sırasında DNA davranışını belirleyen sınırlı sayıda temel biyokimyasal prensibe dayanmaktadır (Buljević et al., 2025; Ova et al., 2025).

Klasik fenol-kloroform ekstraksiyonu, nükleik asitlerden proteinleri ve lipitleri uzaklaştırmak için farklı çözünürlük ve faz ayırımına dayanır, ardından alkol aracılı DNA çöktürülmesi yapılır. Buna karşılık, silika spin kolonları ve manyetik boncuk teknolojileri gibi katı faz saflaştırma sistemleri, tanımlanmış iyonik koşullar altında DNA'nın yüklü veya işlevselleştirilmiş yüzeylere geri dönüşümlü bağlanmasından yararlanır. Bu yaklaşımlar daha yüksek hız, güvenlik

ve tekrarlanabilirlik sunar, ancak temelde DNA yük özelliklerine ve hidrasyon dinamiklerine bağlıdır (Sambrook & Russell, 2006; “Section 1- Isolation of Nucleic Acids,” 2004).

Organik ekstraksiyon, spin kolon sistemleri ve manyetik boncuklar arasındaki seçim, örnek türü, gerekli DNA saflığı, parça boyutu hususları, verimlilik ve sonraki uygulama dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenir. Her yöntemin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak, deneysel optimizasyon yerine rasyonel seçim ve sorun giderme olanağı sağlar (Byrne et al., 2022; Plouffe et al., 2014).

2.1.1. Örnek Türüne Göre Hazırlık, Numune Kabul/Ret Kriterleri ve Ön İşlemler

İzole edilmiş genomik DNA'nın kalitesi, yalnızca ekstraksiyon kimyasıyla değil, aynı zamanda örnek toplama, işleme ve ön işleme ile ilgili ön analitik değişkenlerle de belirlenir. Yetersiz örnek hazırlama, DNA bütünlüğünü geri dönüşümsüz olarak tehlikeye atabilir veya sonraki saflaştırma sırasında giderilemeyen kirleticiler içerebilir. Bu nedenle, DNA izolasyonundan önce açık kabul ve ret kriterleri uygulanmalıdır (Malentacchi et al., 2015; Piskata et al., 2019).

Farklı biyolojik örnek tipleri, farklı yapısal, enzimatik ve kimyasal zorluklar sunar. Hücre yoğunluğu, hücre dışı inhibitörlerin varlığı, nükleaz aktivitesi ve saklama koşulları gibi faktörler, lizis verimliliğini ve DNA stabilitesini doğrudan etkiler. Buna göre, tutarlı ve tekrarlanabilir DNA geri kazanımı sağlamak için örneğe özgü ön işleme stratejileri gereklidir (Rana, 2025; Zhao et al., 2024).

2.1.1.1. Hücre Kültürü (Adherent ve Süspansiyon Hücreler)

Kültürlenmiş hücreler, genomik DNA'nın en kontrollü ve tekrarlanabilir kaynaklarından birini temsil eder. Bununla birlikte, DNA kalitesi hücre sağlığına, işlem prosedürlerine ve lizis zamanlamasına büyük ölçüde bağlıdır. Hem yapışkan hem de süspansiyon kültürleri, kasıtlı lizis başlatılana kadar hücresel bütünlüğün korunmasını sağlamak için dikkatli bir şekilde ele alınmalıdır(Weiskirchen et al., 2023).

Yapışkan hücreler için, ekstraksiyonu engelleyebilecek serum proteinlerini ve nükleazları ortadan kaldırmak için önce kültür ortamı uzaklaştırılır. Daha sonra hücreler mekanik kazıma veya enzimatik işlem kullanılarak ayrılır ve ardından kalan ortam bileşenlerini uzaklaştırmak için nazikçe yıkanır(Shimoguchi et al., 2024). Süspansiyon hücreleri tipik olarak doğrudan santrifüjleme ile hasat edilir. Her iki durumda da kromozomal parçalanmaya yol açabileceğinden, aşırı kesme kuvvetlerinden ve uzun işlem sürelerinden kaçınılmalıdır (Lai et al., 2022).

Hücre canlılığı önemli bir kabul kriteridir. İzolasyondan önce yaygın apoptoz veya nekroz, endojen nükleaz aktivasyonuna ve kısmi DNA bozulmasına neden olur. Bu nedenle, düşük canlılığa veya uzun süreli aşırı büyümeye sahip örnekler genellikle reddedilir veya dikkatli bir şekilde işlenir. Hemen işleme mümkün olmadığında, DNA bütünlüğünü korumak için hücre pelletleri düşük sıcaklıklarda hızla dondurulabilir (Schulze-Osthoff et al., 1994).

Sert hücre duvarlarının yokluğu nedeniyle, kültürlenmiş hücreler, proteazlar ve şelatlayıcı maddelerle desteklenmiş deterjan bazlı tamponlar kullanılarak doğrudan kimyasal lizise oldukça uygundur. Bu yaklaşım, minimum mekanik bozulma ile genomik DNA'nın verimli bir şekilde salınmasını sağlar ve organik ekstraksiyon veya katı faz yöntemleriyle sonraki saflaştırma için güvenilir bir başlangıç noktası oluşturur (Islam et al., 2017; “Section 1- Isolation of Nucleic Acids,” 2004).

2.1.1.2. Hayvan Dokuları

Hayvan dokuları, kültür hücrelerine göre daha fazla heterojenlik ve yapısal karmaşıklık gösterir; bu da verimli DNA geri kazanımı sağlamak için örnek işleme ve mekanik parçalanmanın titizlikle kontrol edilmesini gerektirir. Hücre yoğunluğu, hücre dışı matris bileşimi ve endojen nükleaz aktivitesindeki dokuya özgü farklılıklar, standartlaştırılmış kabul kriterleri ve ön işlem stratejileri gerektirir (J. Xu et al., 2025).

Dokular, çıkarıldıktan hemen sonra, hızlı sıcaklık değişimlerine ve mekanik strese dayanacak şekilde tasarlanmış uygun kriyotüplere aktarılmalıdır. Soğuk zincirin korunması çok önemlidir, çünkü çözülme nükleaz aktivasyonuna izin verir ve DNA bozulmasını başlatır. Tekrarlanan dondurma-çözme döngülerine veya uzun süreli ortam sıcaklıklarına maruz kalmaya dair kanıt gösteren örnekler, genellikle yüksek kaliteli genomik DNA izolasyonu için uygun değildir (Bakhach, 2009).

Dokuların yoğun yapısını bozmak ve lizis reaktiflerine maruz kalan yüzey alanını artırmak için mekanik homojenizasyon gereklidir. Sıvı azot içinde havan ve tokmakla kriyojenik öğütme, özellikle lifli veya kolajen açısından zengin dokular için etkilidir, çünkü dondurma dokuyu kırılgan hale getirirken aynı zamanda nükleazları etkisiz hale getirir. Alternatif olarak, rotor-stator homojenizasyonu, sıvı lizis tamponlarında hızlı ve homojen bir parçalanma sağlar; ancak DNA parçalanmasını önlemek için aşırı kesme kuvvetlerinden kaçınılmalıdır (Goldberg, 2008; Zhang et al., 2019).

Homojenizasyon yönteminin seçimi, doku tipine, örnek boyutuna ve DNA uzunluğu ve bütünlüğü için sonraki gereksinimlere bağlıdır. Uygun mekanik ön işlem, tam lizis, tekrarlanabilir verim ve hem organik ekstraksiyon hem de katı faz saflaştırma yöntemleriyle uyumluluk sağlar (Santos et al., 2025; Zhang et al., 2019).

2.1.1.3. Tam Kan Örnekleri

Tam kan, özellikle klinik ve popülasyon bazlı çalışmalar için yaygın bir genomik DNA kaynağıdır. Bununla birlikte, karmaşık hücresel ve kimyasal bileşimi, güvenilir DNA izolasyonunu sağlamak için örnek kabul kriterlerine sıkı bir şekilde uyulmasını gerektirir. Kanda, genomik DNA neredeyse tamamen çekirdekli lökositlerden elde edilirken, eritrositler büyük miktarda hemoglobin sağlar ancak DNA içermez (Gong & Li, 2014; Research et al., 2016).

Kan örnekleri, EDTA içeren tüplerde toplanmalıdır, çünkü EDTA iki değerlikli katyonları şelat eder ve DNaz aktivitesini inhibe eder. Buna karşılık, heparin ve sitrat gibi antikoagülanlar DNA

izolasyonu için uygun değildir. Heparin, enzimatik sonraki uygulamalara güçlü bir şekilde müdahale ederken, sitrat yetersiz nükleaz inhibisyonu sağlar ve DNA stabilitesini tehlikeye atabilir. Bu nedenle, bu tüplerde toplanan örnekler genellikle reddedilir (Barra et al., 2015).

Hemoliz, kritik bir kalite parametresini temsil eder. Geniş çaplı eritrosit yırtılması, enzimatik reaksiyonları inhibe edebilen ve DNA ile saflaştırılabilen hemoglobin ve demir içeren bileşikler serbest bırakır (Marques-Garcia, 2020). Gözle görülür şekilde hemolize olmuş örnekler dışlanmalı veya ek temizleme adımlarına tabi tutulmalıdır. Standart protokoller, hipotonik tamponların lökositleri korurken kırmızı kan hücrelerini parçalayarak DNA içeren fraksiyonu zenginleştirdiği seçici bir eritrosit lizis ön işlemi içerir (Azman et al., 2019).

2.1.1.4. Bakteri Kültürleri

Bakteri kültürleri, genomik DNA'nın yaygın olarak kullanılan kaynaklarıdır; ancak sert hücre duvarları ve değişken büyüme durumları, etkili DNA izolasyonu için özel gereksinimler ortaya koymaktadır. Numune kalitesi ve DNA verimi, büyüme evresi, hücre duvarı bileşimi ve toplama yönteminden büyük ölçüde etkilenir.

Kültürler, hücrelerin metabolik olarak aktif olduğu ve otoliz veya stres kaynaklı DNA bozulmasına daha az eğilimli olduğu logaritmik (üstel) büyüme evresinde ideal olarak hasat edilir. Aşırı büyümüş veya durağan evredeki kültürler genellikle artmış düzeyde hücre dışı DNA, bozulmuş kromozomal materyal ve inhibitör

metabolitler içerir; bu da izolasyon verimliliğini ve saflığını tehlikeye atabilir (Akerlund et al., 1995).

Bakteri hücre duvarı, lizise karşı ana bariyeri temsil eder. Daha ince bir peptidoglikan tabakası ile karakterize edilen Gram-negatif bakteriler, genellikle deterjan bazlı lizise duyarlıdır. Buna karşılık, Gram-pozitif bakteriler, enzimatik ön işlem gerektiren kalın, yüksek oranda çapraz bağlı bir peptidoglikan matrisine sahiptir. Lizozim, peptidoglikandaki β -(1,4)-glikozidik bağları hidrolize etmek için yaygın olarak kullanılır; bu sayede hücre duvarı zayıflar ve sonraki kimyasal lizis kolaylaşır (Islam et al., 2017; Zhydzetski et al., 2024).

DNA izolasyonu, sıvı kültürlerden veya doğrudan tek tek kolonilerden başlatılabilir. Koloniler kullanıldığında, iyi izole edilmiş, taze yetiştirilmiş kolonilerin dikkatli seçimi kontaminasyonu en aza indirir ve genetik homojenliği sağlar (Sanders, 2012; “Section 1- Isolation of Nucleic Acids,” 2004).

2.1.1.5. Gaita (Dışkı) Örnekleri

Dışkı örnekleri, biyolojik karmaşıklıkları ve yüksek enzimatik ve kimyasal inhibitör içerikleri nedeniyle genomik DNA izolasyonu için en zorlu matrislerden birini temsil eder (Gangadoo et al., 2021). Dışkı, konakçı ve mikrobiyal hücrelere ek olarak, DNA ile saflaştırılabilen ve aşağı akış enzimatik reaksiyonlarını güçlü bir şekilde inhibe edebilen safra tuzları, bilirubin, polisakkaritler, lipidler ve parçalanmış biyomoleküller içerir (Karu et al., 2018).

Dışkı örnekleri için kritik bir kabul kriteri, uygun depolama ve stabilizasyondur, çünkü mikrobiyal ve konakçı nükleazlar ortam sıcaklıklarında DNA'yı hızla parçalar. Bu nedenle ön işlem stratejileri, genellikle safra asitlerini, pigmentleri ve diğer PCR inhibitörlerini azaltmak için tasarlanmış özel tamponlar kullanılarak tekrarlanan yıkama adımları yoluyla, lizis öncesinde inhibitör uzaklaştırmayı vurgular (Videnska et al., 2019).

Özellikle çeşitli ve dayanıklı hücre duvarlarına sahip mikrobiyal popülasyonlar için etkili hücre parçalanması esastır. Boncukla çalkalama kullanılarak yapılan mekanik lizis, tek başına kimyasal lizise direnebilen bakteri, mantar ve protozoal hücreleri fiziksel olarak parçalayan yüksek enerjili kesme kuvvetleri sağlar. Boncukla parçalama, kapsamlı nükleik asit salınımını sağlamak için genellikle deterjanlar ve kaotropik ajanlarla birleştirilir (Karu et al., 2018; Videnska et al., 2019).

2.1.2. DNA İzolasyon Mekanizmaları ve Prensipleri

Uygun örnek hazırlığının ardından, DNA izolasyonu, genomik DNA'nın nasıl salındığını, korunduğunu, ayrıldığını ve nihayetinde geri kazanıldığını belirleyen, iyi tanımlanmış bir dizi biyokimyasal ve fiziko-kimyasal mekanizma tarafından yönetilir. Kullanılan platform ne olursa olsun—organik ekstraksiyon, spin kolonları veya manyetik boncuklar—bu mekanizmalar, DNA'nın polianyonik fosfat omurgası, suda çözünürlüğü, moleküler boyutu ve kimyasal kararlılığı da dahil olmak üzere içsel özelliklerinden yararlanır (Ghatak et al., 2013; “Section 1- Isolation of Nucleic Acids,” 2004).

Tüm DNA izolasyon iş akışlarının özünde, (i) hücresel yapıları bozan, (ii) proteinleri ve nükleazları etkisiz hale getiren veya uzaklaştıran ve (iii) DNA'yı diğer biyomoleküllerden seçici olarak ayıran süreçler yer alır. Bu süreçler, dikkatlice kontrol edilen iyonik ve pH koşulları altında deterjanların, enzimlerin, şelatlayıcı maddelerin, organik çözücülerin, alkollerin ve katı yüzeylerin koordineli kullanımıyla gerçekleştirilir (Caruccio & Banerjee, 1999; Lim et al., 2016).

2.1.2.1. Hücre Lizisi ve Membran Parçalanma Mekanizmaları: Fiziksel Bütünlüğün Bozulması

DNA izolasyonunda ilk ve vazgeçilmez adım, genomik DNA'yı çözeltiye salmak için hücrenin fiziksel bütünlüğünün bozulmasıdır. Hücre zarları esas olarak hidrofobik etkileşimlerle stabilize edilmiş fosfolipid çift katmanlarından oluşurken, hücre duvarları ve sitoskeletal elemanlar gibi ek yapısal bileşenler mekanik dayanıklılık ve koruma sağlar. Etkili lizis, aşırı DNA parçalanmasına neden olmadan bu bariyerleri ortadan kaldırmalıdır (Ghatak et al., 2013).

Biyokimyasal açıdan, zar parçalanması, lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimlerinin destabilize edilmesiyle sağlanır. Kimyasal lizis ajanları, zar lipidlerinin amfipatik doğasını hedef alarak, çift katman organizasyonunun kaybına ve geçirgenliğin artmasına neden olur (Arouri & Mouritsen, 2013). Eş zamanlı olarak, hücre içi bölünme ortadan kaldırılır ve lizis tamponlarının DNA'nın depolandığı nükleoid bölgelerine erişmesine izin verilir.

Özellikle yapısal olarak sağlam örnekler için, kimyasal lizise ek olarak mekanik kuvvetler uygulanabilir. Bununla birlikte, genomik

DNA uzun ve esnek bir polimer olduğundan, aşırı kayma gerilimi geri dönüşümsüz kırılmaya yol açabilir. Bu nedenle, kimyasal lizis başladıktan sonra mekanik bozulma genellikle en aza indirilir ve karıştırma işlemi nazıkçe yapılır (Ghatak et al., 2013; Research et al., 2016).

2.1.2.2. Deterjanların Rolü

Deterjanlar, biyolojik membranları bozma ve hidrofobik molekülleri çözünür hale getirme yetenekleri nedeniyle DNA izolasyon tamponlarının temel bileşenleridir. Etkinlikleri, hidrofobik bir kuyruk ve hidrofilik bir baş grubundan oluşan amfipatik yapılarından kaynaklanır; bu yapı, lipidler ve sulu ortamlarla aynı anda etkileşime girmelerini sağlar (Anandan & Vrielink, 2016; Stetsenko et al., 2017).

Sodyum dodesil sülfat (SDS), hayvan hücrelerinden, bakterilerden ve birçok dokudan DNA izolasyonunda yaygın olarak kullanılan anyonik bir deterjandır. SDS, hidrofobik alkil zincirini lipid çift katmanına yerleştirirken, negatif yüklü sülfat başı sulu faza maruz kalır. Bu etkileşim, membran yapısını destabilize ederek çift katmanın parçalanmasına ve membran proteinlerinin çözünür hale gelmesine yol açar. Membran bozulmasına ek olarak, SDS, hidrofobik bölgelerine bağlanarak proteinleri denatüre eder, böylece nükleaz inaktivasyonuna ve protein uzaklaştırılmasına katkıda bulunur (Arakawa et al., 2024; Jafari et al., 2018).

Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), bitki ve polisakkarit bakımından zengin örneklerde yaygın olarak kullanılan katyonik bir deterjandır. SDS'nin aksine, CTAB, bitki dokularında bol miktarda

bulunan ve DNA saflaştırmaya müdahale edebilen asidik polisakkaritler ve polifenoller ile çözünmeyen kompleksler oluşturur. Bu kirleticileri seçici olarak çöktürerek, CTAB, membran bozulmasını kolaylaştırırken DNA saflığını da artırır (Beri & Gandhi, 2021; Maki et al., 1991).

SDS ve CTAB arasındaki seçim, lizis kimyasındaki temel farklılıklardan ziyade örnek bileşimindeki farklılıkları yansıtır. Her iki durumda da deterjan etkisi, sağlam hücre zarlarını karışık misellere dönüştürmek ve DNA'yı sonraki işlemler için çözeltiye etkili bir şekilde salmak için gereklidir (Sharma et al., 2007).

2.1.2.3. Enzimatik Sindirim (Proteinase K)

Membranın bozulmasının ardından, genomik DNA, histonlar, yapısal proteinler ve enzimatik kirleticilerle yoğun bir şekilde ilişkili kalır. Bu nedenle, DNA'yı nükleoprotein komplekslerinden serbest bırakmak ve DNA bütünlüğünü tehdit eden nükleazları ortadan kaldırmak için proteolitik sindirim gereklidir. Mevcut proteazlar arasında, Proteinaz K bu rol için en uygun proteazdır (Hauer et al., 2017).

Proteaz K, denatüre edici koşullar altında olağanüstü stabilitesi ve aktivitesi ile karakterize edilen geniş spektrumlu bir serin proteazdır. Birçok proteazın aksine, SDS gibi deterjanlar, yüksek konsantrasyonlarda üre ve EDTA gibi şelatlayıcı maddelerin varlığında aktif kalır.

Mekanistik olarak, Proteinaz K, hidrofobik amino asitlere bitişik peptit bağlarını keser ve histonları ve diğer DNA bağlayıcı proteinleri etkili bir şekilde parçalar. Kritik olarak, DNazları ve diğer kirlenici enzimleri de sindirerek, serbest bırakılan DNA'nın enzimatik olarak parçalanmasını önler. Protein uzaklaştırma ve nükleaz inaktivasyonunun birleşik etkileri, DNA verimini, saflığını ve stabilitesini önemli ölçüde artırır (Hauer et al., 2017; Skowron et al., 2020).

2.1.2.4. Şelatlayıcı Ajanlar (EDTA)

Şelatlayıcı maddeler, nükleaz aktivitesini inhibe ederek ve iki değerlikli metal iyonlarına bağlı hücresel yapıları destabilize ederek DNA izolasyonu sırasında kritik bir koruyucu rol oynarlar (George & Brady, 2023). Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), özellikle magnezyum (Mg^{2+}) ve kalsiyum (Ca^{2+}) olmak üzere iki değerlikli katyonlara olan yüksek afinitesi nedeniyle DNA ekstraksiyon tamponlarında en yaygın kullanılan şelatlayıcıdır (Heindorff et al., 1983; Nkuna et al., 2022).

Çoğu DNaz, katalitik aktivite için temel bir kofaktör olarak Mg^{2+} 'ye ihtiyaç duyar. EDTA, kararlı oktahedral koordinasyon kompleksleri oluşturarak bu iyonları bağlar ve böylece onları çözeltiden etkili bir şekilde uzaklaştırır. Bu metal iyonu yoksunluğu, DNazların hızlı inaktivasyonuna yol açarak genomik DNA'yı hücreden salındıktan hemen sonra enzimatik bozunmadan korur (Dominguez & Ward, 2009; Sissi & Palumbo, 2009).

Nükleaz inhibisyonuna ek olarak, EDTA dolaylı olarak hücre lizisine de katkıda bulunur. İki değerlikli katyonlar, fosfolipidler ve lipopolisakkaritler gibi negatif yüklü bileşenleri köprüleyerek membran yapılarını ve hücre duvarlarını stabilize eder. EDTA, bu iyonları şelatlayarak yapısal bütünlüğü zayıflatır ve deterjanların ve enzimatik işlemlerin etkinliğini artırır (Oyama & Kubota, 1991; Sissi & Palumbo, 2009).

2.1.2.5. Organik Ekstraksiyon: Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (PCI)

Fenol-kloroform-izoamil alkol (PCI) kullanılarak yapılan organik ekstraksiyon, sıvı-sıvı faz ayrımı ve biyomoleküllerin farklı çözünürlüğüne dayanan klasik bir DNA saflaştırma yöntemidir. Rutin iş akışlarında büyük ölçüde katı faz sistemleriyle değiştirilmiş olsa da PCI, yüksek saflıkta DNA elde etmek ve nükleik asit saflaştırmasının temel kimyasını anlamak için referans bir teknik olmaya devam etmektedir (H. Ali et al., 2016).

Sulu bir lizat PCI ile karıştırılıp santrifüjlendiğinde, iki karışmayan faz oluşur: üstte sulu bir faz ve altta organik bir faz, bir ara faz ile ayrılır. Bu ayrım, "benzer benzeri çözer" ilkesiyle tutarlı olarak, polarite farklılıklarından kaynaklanır. Yüksek oranda yüklü ve hidrofilik fosfat omurgasına sahip DNA, sulu fazda çözünür kalırken, lipitler ve hidrofobik moleküller tercihen organik faza geçer (Liu et al., 2022).

Fenol, protein denatürasyonunda merkezi bir rol oynar. Hidrojen bağlarını bozarak ve hidrofobik protein çekirdeklerini açığa

ıkararak, fenol proteinlerin aılmasına ve çözünürlüklerini kaybetmesine neden olur. Denatüre olmuş proteinler ara yüzeyde birikerek genellikle görünür beyaz bir tabaka oluşturur. Kloroform, faz ayrışmasını artırır ve sulu fazdan artık fenol uzaklaştırırken, izoamil alkol köpürmeyi azaltır ve ara yüzeyi stabilize eder (Ali et al., 2016; Liu et al., 2022).

2.1.2.6. Alkol Presipitasyonu (keltme) Mantiğı

Alkol keltme, sulu zeltilerden DNA'yı konsantre etmek ve geri kazanmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu süreç, DNA molekülünün kendisinin kimyasal modifikasyonundan ziyade, çözücü polaritesindeki değişiklikler ve elektrostatik etkileşimler tarafından yönetilir (Green & Sambrook, 2016).

Su, yüksek bir dielektrik sabitine sahiptir; bu da yükler arasındaki elektrostatik çekimi azaltarak DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgası gibi yüklü türleri stabilize eder. Etanol veya izopropanol gibi alkollerin eklenmesi, çözeltinin dielektrik sabitini düşürerek yk stabilizasyonunu zayıflatır. Sonuç olarak, DNA molekülleri arasındaki elektrostatik itme azalır ve agregasyon desteklenir (Singh et al., 2021).

Etkin keltme için tipik olarak sodyum (Na^+) gibi tek değerlikli katyonların varlığı gereklidir. Bu katyonlar, elektrostatik tarama yoluyla fosfat gruplarındaki negatif yükleri nötralize ederek DNA iplikleri arasındaki itmeyi daha da azaltır. Hem zc polaritesini hem de yk itmesini azaltarak, alkol ve tuz birlikte, santrifüjleme ile keltilebilen çözünmeyen bir DNA agregatının oluşumunu teşvik eder (Cruz-Len et al., 2022; Tan & Chen, 2005).

İzopropanol, çökmeyi sağlamak için etanolden daha düşük hacim gerektirir ancak tuzları daha kolay birlikte çökeltebilir; etanol ise daha büyük hacimler ve daha uzun santrifüj süreleri pahasına daha temiz DNA sağlar. Bu prensipleri anlamak, verim ve saflığı dengelemek için çökelme koşullarının rasyonel bir şekilde ayarlanmasına olanak tanır (Green & Sambrook, 2017).

2.1.2.7. Katı Faz Ekstraksiyonu: Silika Spin-Kolon Sistemleri

Silika bazlı spin kolon sistemleri kullanılarak yapılan katı faz ekstraksiyonu, modern laboratuvarlarda DNA saflaştırması için en yaygın olarak benimsenen yaklaşımdır. Bu sistemler, organik çözücülerin yerini, tanımlanmış kimyasal koşullar altında DNA'nın katı bir matrise geri dönüşümlü adsorpsiyonuyla değiştirerek, gelişmiş güvenlik, hız ve tekrarlanabilirlik sunar (Schmitz et al., 2020).

DNA'nın silikaya bağlanması, en yaygın olarak guanidinyum klorür veya guanidinyum tiyosiyanat olan kaotropik tuzların varlığında gerçekleşir. Kaotropik ajanlar, su moleküllerinin düzenli hidrojen bağı ağını bozarak hem DNA'dan hem de silika yüzeyinden hidrasyon kabuğunu etkili bir şekilde uzaklaştırır. Bu dehidrasyon, çözünürlüğü azaltır ve DNA ile silika membran arasında yakın moleküler teması teşvik eder (Vandeventer et al., 2012, 2013).

Kasyon köprüsü modeline göre, yüksek konsantrasyonlarda pozitif yüklü iyonlar, DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgası ile silika yüzeyindeki negatif yüklü silanol grupları arasında elektrostatik köprüler oluşturur. Bu yüksek tuzlu, düşük su aktiviteli koşullar altında,

DNA seçici olarak tutulurken, proteinler ve diğer kirleticiler alkol içeren tamponlar kullanılarak yıkanır (Yusufaly et al., 2014).

DNA daha sonra elüsyon aşamasında geri kazanılır; bu aşamada su veya Tris-EDTA tamponu gibi düşük iyonik kuvvete sahip çözeltiler tuz köprülerini bozar ve hidrasyonu geri kazandırır. Yeniden hidrasyon, DNA-silika etkileşimlerini zayıflatır ve DNA'nın çözeltiliye ayrışmasına olanak tanır. Elüsyonun verimliliği, tampon bileşimine, sıcaklığa ve elüsyon hacmine bağlıdır; bunların hepsi DNA konsantrasyonunu ve geri kazanımını etkiler (Vandeventer et al., 2013).

2.2. RNA İzolasyonu ve RNase Kontrolü: RNA stabilizasyonu, Trizol yöntemi ve saflık kriterleri

RNA izolasyonu, RNA'nın doğasında var olan kimyasal kararsızlık ve ribonükleazların (RNazlar) yaygın varlığından kaynaklanan farklı biyokimyasal zorluklar sunar. RNA profilleri dinamik hücresel durumları yansıttığı için, küçük bir bozulma bile deneysel sonuçları önemli ölçüde değiştirebilir. Sonuç olarak, RNA izolasyon stratejileri hızlı stabilizasyona, sıkı RNaz kontrolüne ve RNA bütünlüğünün ve saflığının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesine önem verir (Frazão et al., 2006).

RNA molekülleri, özellikle alkali koşullar altında, kendiliğinden hidrolize duyarlı hale getiren reaktif bir 2'-hidroksil grubuna sahiptir. Buna paralel olarak, RNazlar laboratuvar yüzeylerinde, ciltte ve reaktiflerde kalıcı olan ve etkili bir şekilde etkisiz hale getirilmezlerse RNA'yı hızla bozabilen son derece kararlı enzimlerdir. Bu faktörler hem kimyasal olarak koruyucu hem de

enzimatik olarak engelleyici izolasyon koşullarını gerektirir (Kornienko, Aramova, Tishchenko, Rudoy, & Chikindas, 2024; J. Liu & Lilley, 2007).

2.2.1. Örnek Türüne Göre Hazırlık, Numune Kabul/Red Kriterleri ve Ön İşlemler

RNA izolasyonunun başarısı, hücre homeostazının bozulmasıyla birlikte RNA bozunmasının hemen başlaması nedeniyle, ön analitik işlemlere kritik derecede bağlıdır. DNA'nın aksine, RNA bütünlüğü bir kez bozulduktan sonra geri kazanılamaz; bu nedenle, numune işlemenin en erken aşamalarında katı kabul ve ret kriterleri uygulanmalıdır (Jahn et al., 2008).

Numune uygunluğunu belirleyen temel faktörler arasında işlem hızı, sıcaklık kontrolü ve RNaz kontaminasyonuna maruz kalma yer alır. Numune toplama ve stabilizasyon arasındaki gecikmeler, görünür bozunma belirtileri veya uygun olmayan saklama koşulları, RNA kaybının ve numune reddinin yaygın nedenleridir. Ön işlem stratejileri, RNazları hızla etkisiz hale getirmek, doğal RNA profillerini korumak ve sonraki saflaştırma kimyasıyla uyumluluğu sağlamak için tasarlanmıştır (Anvari et al., 2020).

2.2.1.1. Hücre Kültürü

Kültürlenmiş hücreler, yaygın ve deneysel olarak esnek bir RNA kaynağıdır, ancak ekstrakte edilen RNA'nın bütünlüğü gecikmelere ve işlem koşullarına karşı oldukça hassastır. Kontrollü kültür ortamlarından çıkarıldığında, hücresel stres tepkileri ve endojen

RNazarlar hızla aktive olur ve bu da acil stabilizasyon veya lizis gerektirir (Birnbom, 1988).

Yapışkan hücre kültürleri için, hücre dışı RNazarları ve serum kaynaklı kirleticileri uzaklaştırmak için büyüme ortamı derhal aspire edilir. Daha sonra hücreler, aynı anda membranları parçalayan ve RNazarları etkisiz hale getiren guanidinyum bazlı lizis tamponları veya fenol içeren reaktifler kullanılarak doğrudan yerinde lizise edilir. Enzimatik veya mekanik ayrılma transkripsiyonel değişikliklere ve RNA bozulmasına neden olabileceğinden, lizisten önce mümkün olduğunca ayrılma adımlarından kaçınılmalıdır (P & N, 1987).

Süspansiyon kültürleri, hızlı santrifüjleme ile hasat edilir ve ardından lizis tamponunda hemen yeniden süspansiyon haline getirilir. Uzun yıkama adımları, işlem süresini ve RNaz maruziyetini artırdığı için önerilmez. Numune işlemleri boyunca, dış kaynaklı kontaminasyonu önlemek için eldiven, RNaz içermeyen sarf malzemeleri ve işlenmiş çözeltiler şarttır (P & N, 1987; “Section 1- Isolation of Nucleic Acids,” 2004).

2.2.1.2. Hayvan Dokuları

Hayvan dokuları, ötenazi sonrası RNazarların hızlı aktivasyonu ve devam eden transkripsiyonel değişiklikler nedeniyle RNA izolasyonu için önemli zorluklar oluşturmaktadır. Sonuç olarak, ötenazi ile RNA stabilizasyonu arasındaki zaman aralığı, RNA bütünlüğü ve biyolojik önemi açısından kritik bir belirleyicidir (Chakkingal Bhaskaran et al., 2023).

Dokular mümkün olduğunca hızlı bir şekilde çıkarılmalı ve hemen stabilizasyona tabi tutulmalıdır. Sıvı nitrojen içinde hızlı dondurma, enzimatik aktiviteyi hızla durduran ve sıcaklığı RNaz fonksiyonu için eşik değerin altına düşürerek RNA'yı koruyan yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Dondurulmuş dokular genellikle -80 °C'de saklanır ve bozulmayı en aza indirmek için dondurulmuş koşullar altında işlenir (Xie et al., 2025).

Alternatif olarak, dokular, dokuya nüfuz eden ve hemen dondurmaya gerek kalmadan RNazları kimyasal olarak inhibe eden RNAlater gibi RNA stabilizasyon çözeltilerine daldırılabilir. Bu yaklaşım, işleme ve taşımayı basitleştirirken, penetrasyon verimliliği doku boyutuna ve yoğunluğuna bağlıdır ve dikkatli bir optimizasyon gerektirir (Wang et al., 2018).

Gecikmiş işlem, kısmi çözülme veya yetersiz stabilizasyon gösteren örnekler, yüksek RNA bozulma riski nedeniyle genellikle reddedilir. Bu nedenle, hayvan dokularından tekrarlanabilir ve yüksek kaliteli RNA izolasyonu için toplama hızının ve stabilizasyon stratejisinin doğru kontrolü şarttır (Boiling et al., 2009).

2.2.1.3. Tam Kan Örnekleri

Tam kan, hızlı RNA bozulması ve RNaz açısından zengin plazma bileşenlerinin baskınlığı nedeniyle RNA izolasyonu için özellikle zorlu bir örnek türüdür. Dahası, olgun eritrositlerde çekirdek ve RNA bulunmadığından, anlamlı transkriptomik bilgiler öncelikle lökositlerden elde edilir; bu nedenle bu fraksiyonun seçici olarak korunması esastır (Wilfinger et al., 2023).

RNA uygulamaları için kan, kan hücrelerini anında parçalamak ve toplama noktasında RNazları etkisiz hale getirmek üzere tasarlanmış özel reaktifler içeren özel RNA stabilizasyon tüplerine alınmalıdır. Bu sistemler, toplama sonrası transkripsiyonel değişiklikleri ve RNA bozulmasını önleyerek in vivo gen ekspresyon profilini korur. Geleneksel antikoagülan tüpler (örneğin, yalnızca EDTA) RNA koruması için yetersizdir ve genellikle transkriptomik analizler için reddedilir (Duale et al., 2012).

Stabilizasyon tüpleri kullanılmayan iş akışlarında, hızlı lökosit ayrımı gereklidir. Bu, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme veya seçici eritrosit lizisi ve ardından anında RNA ekstraksiyonunu içerebilir. Bu süreçteki herhangi bir gecikme, RNA kaybı ve yapay gen ekspresyonu değişiklikleri riskini artırır (Nguyen et al., 2024).

Kan örnekleri için kabul kriterleri arasında doğru tüp tipi, pıhtılaşmanın olmaması ve önerilen saklama sürelerine ve sıcaklıklarına uyulması yer alır. Bu nedenle, tam kandan yüksek kaliteli RNA elde etmek için uygun stabilizasyon ve hızlı işleme vazgeçilmezdir (Consortium, 2025).

2.2.1.4. Bakteri Kültürleri

Bakteri kültürlerinden RNA izolasyonu, bakteriyel mRNA'nın son derece kısa yarı ömrü ve transkripsiyonun çevresel değişikliklere hızlı tepkisi nedeniyle özellikle zordur. İşlemde kısa süreli gecikmeler bile transkriptomda önemli değişikliklere yol açabilir; bu nedenle hızlı ve kontrollü işlem şarttır (Y. Wang et al., 2012).

Kültürler, genellikle logaritmik fazda olmak üzere, uygun büyüme evresinde hasat edilmeli ve hemen işlenmelidir. Doğal RNA profillerini korumak için, transkripsiyonel aktivite genellikle toplama sırasında hızlı soğutma, RNA stabilizasyon reaktiflerinin eklenmesi veya guanidinyum bazlı tamponlarda doğrudan lizis yoluyla durdurulur. Hasat ve RNaz inaktivasyonu arasındaki herhangi bir gecikme, RNA bozulmasını önemli ölçüde artırır ve gen ekspresyon ölçümlerini bozar (Barnett et al., 2007; Xie et al., 2025).

Bakteri hücre duvarı, verimli RNA salınımı için önemli bir fiziksel bariyer oluşturur. Peptidoglikan tabakasını zayıflatmak ve hızlı lizisi kolaylaştırmak için en yaygın olarak lizozim ile enzimatik ön işlem kullanılır. Bu adım, kalın, yüksek oranda çapraz bağlı hücre duvarlarına sahip Gram-pozitif bakteriler için özellikle kritiktir. Enzimatik sindirimi, RNazın tamamen etkisiz hale getirilmesini sağlamak için genellikle hemen ardından güçlü denatüre edici koşullar altında kimyasal lizis izler (Primo et al., 2018; Zhydzetski et al., 2024).

Bakteriyel RNA'nın kararsızlığı göz önüne alındığında, uzun işlem süreleri, tekrarlanan sıcaklık dalgalanmaları veya eksik lizis gösteren örnekler genellikle transkriptomik analiz için uygun değildir. Bu nedenle, bakteri kültürlerinden güvenilir RNA izolasyonu için hızlı işlem ve etkili hücre duvarı parçalanması şarttır (Jahn et al., 2008).

2.2.2. RNA İzolasyon Mekanizmaları ve Prensipleri

RNA izolasyonu, DNA saflaştırmasını yönetenlerden kritik noktalarda farklılık gösteren biyokimyasal prensiplere dayanır. Bu farklılıklar, RNA'nın yapısal özelliklerinden, kimyasal reaktivitesinden

ve ribonükleazların her yerde bulunmasından kaynaklanır. Bu nedenle, etkili RNA izolasyonu sadece RNA'nın hücreden salınmasını değil, aynı zamanda bozulmaya karşı anında ve sürekli korumayı da gerektirir (N. Ali et al., 2017; Yu et al., 2020).

Moleküler düzeyde, RNA davranışı tek zincirli yapısı ve riboz şekerinde reaktif bir 2'-hidroksil grubunun varlığı tarafından belirlenir. Bu fonksiyonel grup esneklik ve katalitik potansiyel kazandırır, ancak aynı zamanda RNA'yı kendiliğinden hidrolize karşı hassas hale getirir. Buna paralel olarak, RNazlar, çoğu proteini etkisiz hale getiren koşullar altında aktif kalan son derece kararlı enzimlerdir (Paladino & Zangi, 2013; Spitale et al., 2014).

RNA izolasyon stratejileri, hücreleri eş zamanlı olarak parçalamak, proteinleri açmak ve RNazları geri dönüşümsüz olarak etkisiz hale getirmek için güçlü denatüre edici ortamlardan yararlanır. Kaotropik tuzlar, asidik pH koşulları ve organik çözücüler, diğer biyomoleküller uzaklaştırılırken RNA'nın çözünür ve korunaklı kalmasını sağlayan koşullar oluşturmak için yaygın olarak birleştirilir (N. Ali et al., 2017; Stead et al., 2012).

2.2.2.1. RNA'nın Kimyasal Kararsızlığı

RNA, moleküler yapısındaki temel farklılıklar nedeniyle DNA'ya göre doğası gereği daha az kararlıdır. DNA'nın aksine, RNA tipik olarak tek zincirlidir ve deoksiriboz yerine riboz şekerini içerir. Bu yapısal konfigürasyon, RNA'ya işlevsel çok yönlülük sağlar ancak kimyasal bozulmaya karşı duyarlılığını önemli ölçüde artırır (Obara et al., 2024).

RNA'nın fosfodiester omurgası, enzimatik kataliz olmadan molekül içi reaksiyonların meydana gelebileceği hafif alkali koşullar altında parçalanmaya eğilimlidir. Sıcaklık dalgalanmaları, iki değerlikli katyonlar ve sulu ortamlara uzun süre maruz kalma, bozulmayı daha da hızlandırır. Sonuç olarak, numuneler derhal stabilize edilmezse RNA bütünlüğü hızla bozulabilir (Chheda et al., 2024; Kornienko, Aramova, Tishchenko, Rudoy, Chikindas, et al., 2024).

Kimyasal hassasiyete ek olarak, RNA'nın tek zincirli yapısı, omurgayı hidrolitik saldırıdan koruyan kararlı ikincil yapılar oluşturma yeteneğini sınırlar. Bu hassasiyet, RNA izolasyon prosedürleri boyunca pH, sıcaklık ve iyonik koşulların sıkı bir şekilde kontrol edilmesini gerektirir (Kornienko, Aramova, Tishchenko, Rudoy, Chikindas, et al., 2024; Li et al., 2015).

2.2.2.2. RNase Enzimlerinin Her Yerde Bulunan Doğası

RNA, içsel kimyasal kararsızlığının yanı sıra, RNA'nın parçalanmasında uzmanlaşmış çeşitli bir enzim grubu olan ribonükleazlar (RNazlar) tarafından parçalanmaya karşı da oldukça hassastır. RNazlar, insan derisinde, laboratuvar yüzeylerinde, toz parçacıklarında ve çoğu biyolojik sıvıda bulunarak biyolojik ve laboratuvar ortamlarında son derece yaygındır (Kornienko, Aramova, Tishchenko, Rudoy, Chikindas, et al., 2024).

RNazların belirleyici bir özelliği, olağanüstü yapısal kararlılıklarıdır. Birçok RNaz, üçüncül yapılarını koruyan ve ısıya, aşırı pH'a veya kimyasal denatüranlara maruz kaldıktan sonra aktif kalmalarını sağlayan birden fazla disülfid bağı içerir. Sonuç olarak,

DNazlara veya proteazlara karşı etkili olan standart sterilizasyon yöntemleri, RNazları tamamen etkisiz hale getirmek için genellikle yetersizdir (Rosenberg, 2008).

RNaz kontaminasyonu, reaktiflerden, plastik malzemelerden, cam eşyalardan veya kullanım prosedürlerinden kaynaklanabilir. Özellikle uzun süreli inkübasyon aşamalarında, eser miktarlar bile kapsamlı RNA bozulmasına neden olmak için yeterlidir. Bu nedenle, RNA iş akışları özel ekipman, RNaz içermeyen sarf malzemeleri ve titiz kontaminasyon kontrol uygulamaları gerektirir (Treweek et al., 2015).

RNazların kimyasal olarak etkisiz hale getirilmesi genellikle dietil pirokarbonat (DEPC) kullanılarak gerçekleştirilir; bu madde, RNaz katalitik aktivitesi için gerekli olan histidin kalıntılarını değiştirir. DEPC ile işlem görmüş su ve çözeltiler, RNA işleme için kontrollü bir ortam sağlar, ancak DEPC'nin kendisi kullanımdan önce otoklavlama yoluyla uzaklaştırılmalıdır. Kimyasal işlemler ve sıkı laboratuvar disiplini birlikte, RNA izolasyonu sırasında etkili RNaz kontrolünün temelini oluşturur (Kornienko, Aramova, Tishchenko, Rudoy, Chikindas, et al., 2024)

2.2.2.3. Asit Guanidinyum Tiyosiyanat-Fenol-Kloroform (AGPC) Yöntemi

Asit Guanidinyum Tiyosiyanat-Fenol-Kloroform (AGPC) yöntemi, hücrelerden ve dokulardan yüksek kaliteli RNA izole etmek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. TRIzol ve QIAzol gibi ticari reaktifler bu prensibe dayanmaktadır ve hücreleri eş zamanlı

olarak parçalamak, proteinleri denatüre etmek ve RNA'yı bozulmadan korumak için tasarlanmıştır.

Yöntem, fenol ve guanidinyum tiyosiyanat içeren tek fazlı bir çözeltiye dayanmaktadır. Guanidinyum tiyosiyanat, proteinler ve nükleik asitler içindeki hidrojen bağ ağlarını bozan güçlü bir kaotropik ajan görevi görür. Bu, hızlı hücre lizisine ve RNazların etkili bir şekilde inaktivasyonuna yol açarak, RNA'yı temas anında hemen stabilize eder (Chomczynski & Sacchi, 2006).

Fenol, hidrofobik etkileşimleri destabilize ederek ve protein yapılarını açarak protein denatürasyonuna katkıda bulunur. Kloroform eklendiğinde ve karışım santrifüjlendiğinde, sistem ayrı sulu ve organik fazlara ayrılır. Bu fazlar arasındaki nükleik asitlerin dağılımı esas olarak pH ve yük özelliklerine bağlıdır ve seçici RNA geri kazanımının temelini oluşturur (Yılmaz et al., 2022).

2.2.2.4. pH Bağımlı Faz Ayrımı

AGPC yönteminin en önemli ayırt edici adımı, faz ayrımı sırasında nükleik asitlerin pH'a bağlı olarak bölünmesidir. Kloroform ilavesi ve santrifüj işleminden sonra, karışım üstte sulu bir faza, ara faza ve altta organik bir faza ayrılır. DNA ve RNA'nın bu fazlar içindeki lokalizasyonu, öncelikle asidik koşullar altında iyonlaşma durumlarına bağlıdır (L. Xu et al., 2019).

Asidik pH'da (yaklaşık pH 4-5), DNA'nın fosfat grupları kısmen protonlanır ve molekülün genel negatif yükünü azaltır. Bu yük nötrleşmesi, DNA'nın sulu fazdaki çözünürlüğünü azaltarak organik

faza bağlanmasına veya denatüre proteinlerle birlikte ara fazda birikmesine neden olur (L. Xu et al., 2019).

Buna karşılık, RNA, yapısal ve kimyasal özellikleri nedeniyle asidik pH'da yeterli negatif yükü korur ve bu da sulu fazda çözünür kalmasını sağlar. Sonuç olarak, RNA, ara faz bozulmasını en aza indirirken üst sulu tabakayı dikkatlice aktararak seçici olarak geri kazanılabilir (Kornienko, Aramova, Tishchenko, Rudoy, & Chikindas, 2024; “Section 1 - Isolation of Nucleic Acids,” 2004).

2.3. Plazmit DNA İzolasyonu (Miniprep/Maxiprep): Alkali lizis yöntemi ve saflaştırma

Plazmid DNA izolasyonu, küçük, dairesel plazmid DNA molekülleri ile büyük, kromozomal genomik DNA arasındaki temel yapısal ve kinetik farklılıklardan yararlanır. Her ikisi de bakteri sitoplazmasında birlikte bulunurken, fiziksel özellikleri dikkatlice kontrol edilen kimyasal koşullar altında seçici ayrılmaya olanak tanır (Stadler et al., 2004).

Başlangıçta Birnboim ve Doly tarafından tanımlanan alkali lizis yöntemi, çoğu modern miniprep ve maxiprep protokolünün kavramsal temelini oluşturmaktadır. Bu strateji üç ardışık işleme dayanır: kontrollü hücre lizisi, makromoleküllerin alkali denatürasyonu ve seçici renatürasyon ve çökeltme. Bu koşullar altında, plazmid DNA çözeltide tutulurken, genomik DNA, proteinler ve membran bileşenleri seçici olarak uzaklaştırılır (Birnboim & Doly, 1979; Feliciello & Chinali, 1993).

Miniprep ve maxiprep iş akışları, temel mekanizmadan ziyade öncelikle ölçek ve sonraki aşama saflık gereksinimlerinde farklılık gösterir. Küçük ölçekli hazırlıklar tipik olarak analitik uygulamalar için optimize edilirken, büyük ölçekli hazırlıklar, transfeksiyonu veya in vivo kullanımı engelleyen endotoksinleri ve diğer kirleticileri uzaklaştırmak için ek saflaştırma adımları içerir (Mikhail et al., 2022).

2.3.1. Bakteri Kültürü Hazırlığı

Plazmid DNA izolasyonu, kimyasal lizizden önce bakteri kültürünün dikkatli bir şekilde hazırlanmasını gerektirir, çünkü kültür koşulları plazmid verimini, saflığını ve yapısal bütünlüğünü doğrudan etkiler. Antibiyotik seçimi, büyüme evresi ve hücre yoğunluğu gibi faktörler, plazmid kopya sayısını ve liziz sırasında salınan kontamine hücre materyalin miktarını belirler (Zhu et al., 2007).

Kültürler, genetik homojenliği ve tutarlı plazmid içeriğini sağlamak için genellikle tek bir bakteri kolonisinden başlatılır. Plazmidler konak hücre üzerinde metabolik bir yük oluşturduğundan ve seçim baskısı yokluğunda seçici olarak ortadan kaldırılabilirdiğinden, plazmid kaybını önlemek için sürekli antibiyotik seçimi şarttır (Tsang, 2017).

Aşırı büyümeyi önlemek için büyüme koşulları optimize edilmelidir. Hücrelerin orta logaritmik ila erken durağan fazda hasat edilmesi, plazmid bolluğu ve hücre bütünlük arasında optimal bir denge sağlar. Aşırı hücre yoğunluğu, liziz sırasında genomik DNA'nın parçalanma riskini artırır ve endotoksin ve diğer kontaminant seviyelerini yükseltir (O'Kennedy et al., 2000).

Lizisten önce, bakteri hücreleri santrifüjleme yoluyla toplanarak kompakt bir pelet oluşturulur. Kültür ortamının tamamen uzaklaştırılması çok önemlidir, çünkü kalan tuzlar, proteinler ve metabolitler, sonraki alkali lizis ve saflaştırma adımlarına müdahale edebilir (Islam et al., 2017).

2.3.1.1. İnokülasyon Stratejileri ve Antibiyotik Seleksiyonu

Plazmid DNA izolasyonu, kültürün klonal homojenliğini sağlamak için tek, iyi izole edilmiş bir bakteri kolonisinden aşılama ile başlamalıdır. Bu yaklaşım, genetik değişkenliği en aza indirir ve tüm hücrelerin aynı plazmid yapısını taşımasını sağlar; bu da tekrarlanabilir plazmid verimi ve sekans bütünlüğü için kritiktir.

Antibiyotik seçimi, plazmidin korunmasında merkezi bir rol oynar. Plazmidler konak hücreye metabolik bir yük bindirdiğinden, seçici baskı yokluğunda plazmidsiz hücreler, plazmid içeren hücrelere karşı rekabet edebilir. Büyüme ortamına uygun antibiyotiğin eklenmesi, plazmid taşıyan bakteriler için sürekli seçimi sağlar ve kültür genişlemesi sırasında plazmid kaybını önler (Kachkin et al., 2020).

Antibiyotik seçimi ve konsantrasyonu, plazmid tarafından kodlanan direnç belirteciyle eşleşmelidir. Optimal olmayan antibiyotik seviyeleri plazmid kaybına izin verebilirken, aşırı konsantrasyonlar bakteri büyümesini engelleyebilir ve genel plazmid verimini azaltabilir. Bu nedenle, izolasyondan önce etkili plazmid koruması için kültür boyunca tutarlı antibiyotik baskısı şarttır (Gullberg et al., 2014).

2.3.1.2. İnkübasyon Koşulları ve Büyüme Fazı

Bakteri kültürlerinin büyüme evresi, plazmit kopya sayısını ve lizis sırasında salınan hücrel kalıntıların oranını doğrudan etkiler. Orta logaritmik evrede (üstel büyüme) hasat edilen kültürler, hücreler metabolik olarak aktif olduğundan ve plazmit replikasyonu maksimum düzeyde olduğundan, genellikle optimum plazmit verimi sağlar. Tersine, çok erken hasat yetersiz plazmit birikimine neden olabilirken, aşırı büyümüş durağan evre kültürleri, lizis sırasında genomik DNA salınımını ve endotoksin içeriğini artırabilir (Cheah et al., 1987).

Bakteri yoğunluğu genellikle 600 nm'de optik yoğunluk (OD₆₀₀) kullanılarak izlenir. Belirli plazmit türü için uygun bir OD₆₀₀ hedeflemek, plazmit kopya sayısı ile hücre sağlığı arasında bir denge sağlar. Aşırı büyüme hücreleri strese sokabilir, plazmit kararsızlığını tetikleyebilir ve parçalanmış genomik DNA gibi hücre lizis artefaktlarını artırarak sonraki saflaştırmayı zorlaştırabilir (Beal et al., 2020).

Düzenli büyümeyi sağlamak için sıcaklık, havalandırma ve çalkalama hızı da dahil olmak üzere uygun kuluçka koşulları sağlanmalıdır. Bu koşullardan sapmalar, değişken plazmit içeriğine sahip heterojen hücre popülasyonlarına yol açarak hem verimi hem de tekrarlanabilirliği azaltabilir (Li et al., 1998).

2.3.1.3. Hücre Hasadı (Pellet Oluşturma) ve Yıkama

Optimal büyümenin ardından, bakteri hücreleri plazmit izolasyonu için hazırlanmak üzere hasat edilir. Hasat genellikle, hücreleri lizise veya mekanik hasara neden olmadan sıkı bir pellet haline

getirecek kadar yeterli kuvvette santrifüjleme ile gerçekleştirilir. Bu adım, hücreleri, daha sonraki alkali lizis işlemine müdahale edebilecek tuzlar, proteinler ve metabolitler içerebilen büyüme ortamından ayırır (Caruccio & Banerjee, 1999; Zhu et al., 2007).

Santrifüjlemeden sonra, süpernatant dikkatlice uzaklaştırılır ve hücre peleti, kalan ortam bileşenlerini uzaklaştırmak için TE (Tris-EDTA) gibi nötr bir tamponla yıkanabilir. Yıkama, inhibitör maddelerin lizis adımına geçmemesini sağlar; bu da plazmit verimini azaltabilir veya son preparatı kirletebilir.

Hücre peletinin bütünlüğü önemlidir; yeniden süspansiyon adımı (Tampon P1) düzgün bir şekilde yeniden süspansiyona izin vermek için bozulmamış kalmalıdır. Aşırı sert santrifüjleme veya tekrarlanan işlemler hücrelere zarar vererek erken lizise ve genomik DNA kontaminasyonunun artmasına yol açabilir. Uygun pelet oluşumu ve dikkatli yıkama, verimli ve tekrarlanabilir plazmit geri kazanımı için temel oluşturur (Palmer & Wingfield, 2012).

2.3.2. Alkali Lizis Mekanizması

Alkalın lizis yöntemi, plazmid DNA izolasyonunun temel taşıdır. Küçük, dairesel plazmidler ile büyük, kromozomal DNA arasındaki yapısal ve kinetik farklılıkları kullanarak, genomik DNA ve proteinleri uzaklaştırırken plazmid moleküllerini seçici olarak geri kazanır (Bimboim & Doly, 1979).

İşlem üç ardışık adımdan oluşur:

- Yeniden Süspansiyon (Tampon P1): Bakteri hücreleri, Tris (pH tamponlama), EDTA (nükleazları inhibe etmek için Mg^{2+} 'yi şelatlayan) ve glikoz (ozmotik denge) içeren bir çözeltide yavaşça yeniden süspansiyon haline getirilir. Plazmid preparatının kontaminasyonunu önlemek için genellikle RNA'yı parçalamak üzere RNaz A eklenir.
- Lizis ve Alkalın Denatürasyon (Tampon P2): Sodyum hidroksit (NaOH) ve SDS karışımı hücre zarlarını parçalar, proteinleri denatüre eder ve DNA'yı çözer. Hem plazmid hem de genomik DNA, bu alkalın koşullar altında tek zincirli hale gelir.
- Nötralizasyon ve Seçici Yeniden Doğallaştırma (Tampon P3): Potasyum asetat çözeltiyi nötralize ederek plazmid DNA'nın hızla süper sarmal, çift sarmallı formuna yeniden doğallaştırılmasını sağlar. Buna karşılık, çok daha büyük genomik DNA molekülleri düzgün bir şekilde yeniden birleşemez ve proteinler ve SDS ile çözünmeyen kompleksler halinde çökelen agregatlar oluşturur.

Santrifüjleme çökeltiyi uzaklaştırarak plazmid DNA'yı temizlenmiş lizatta bırakır. Bu yöntemin başarısı kinetik yeniden doğallaştırmaya dayanır: küçük plazmidler, karışık genomik DNA'dan daha hızlı yeniden birleşerek çözeltide seçici geri kazanımı mümkün kılar (El-Ashram et al., 2016).

2.3.3. Saflaştırma ve Endotoksin Giderimi

Alkalın lizis ve berraklaştırmadan sonra, plazmit içeren süpernatant, kalan proteinleri, tuzları ve endotoksinler

(lipopolisakkaritler, LPS) gibi potansiyel olarak toksik kirleticileri uzaklaştırmak için daha fazla saflaştırma gerektirir. Saflaştırma, plazmit DNA'sının transkripsiyon, sekanslama ve klonlama dahil olmak üzere hassas sonraki uygulamalar için uygun olmasını sağlar (Zhu et al., 2007).

Silika membranlı spin kolonları, plazmit yakalama için yaygın olarak kullanılır. Yüksek tuzlu, kaotropik koşullar altında, plazmit DNA silika matrisine bağlanırken, kirleticiler etanol içeren tamponlarla yıkanır. Yıkama adımları, kalan tuzları ve denatüre proteinleri uzaklaştırır ve düşük tuzlu tampon veya su ile elüsyon, saflaştırılmış plazmit DNA'sını serbest bırakır (Vandeventer et al., 2013).

Gram-negatif bakterilerin dış zarının bileşenleri olan endotoksinler, memeli hücreleri içeren uygulamalar için özel bir zorluk teşkil eder. Bağışıklık tepkilerini aktive edebilir ve transkripsiyon verimliliğini azaltabilirler. Özel endotoksin giderme stratejileri arasında, DNA'nın geçmesine izin verirken LPS'yi seçici olarak tutan deterjanlarla ek yıkamalar veya anyon değişim kromatografisi yer alır.

Son olarak, saflaştırılmış plazmid DNA uygun bir tamponda (tipik olarak TE veya nükleaz içermeyen su) elüe edilir ve bütünlüğünü ve stabilitesini koruyan koşullar altında saklanır. Uygun saflaştırma, deneysel ve terapötik uygulamalar için uygun, yüksek kaliteli, düşük kontaminasyonlu plazmid sağlar (Heumann & Roger, 2002).

2.4. Kantitatif ve Kalitatif Analizler: Nanodrop (Spektrofotometre) ve Qubit (Florometre) kullanımı

DNA veya RNA izolasyonundan sonra, sonraki uygulamalar için uygunluğu sağlamak amacıyla konsantrasyon, saflık ve bütünlüğün değerlendirilmesi esastır. Yaygın olarak kullanılan iki araç, her biri tamamlayıcı avantajlar sunan spektrofotometreler ve florometrelerdir (Vermessen et al., 2024).

Spektrofotometri, nükleik asit konsantrasyonu ve saflık oranlarının hızlı ve etiketsiz değerlendirmesini sağlarken, florometri seçici floresan boyalar aracılığıyla daha yüksek hassasiyet ve özgülük sunar. Ek olarak, jel elektroforezi nükleik asitlerin fiziksel bütünlüğünü ve moleküler boyutunu değerlendirmek için kullanılabilir. Bu yöntemlerin doğru kombinasyonu, araştırmacıların PCR, sekanslama veya transfeksiyon gibi deneyler için örnek uygunluğu konusunda bilinçli kararlar vermelerini sağlar (Bruijns et al., 2022; García-Alegria et al., 2020).

2.4.1. Nanodrop ile Saflık Kontrolü (A260/280, A260/230)

Nanodrop kullanılarak yapılan spektrofotometrik analiz, nükleik asitlerin hem konsantrasyonunu hem de saflığını değerlendirmek için hızlı ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Cihaz, özellikle 260 nm, 280 nm ve 230 nm olmak üzere belirli dalga boylarında absorbansı ölçer; bunlar sırasıyla nükleik asitlere, proteine ve diğer organik kirleticilere karşılık gelir.

Örnek kalitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan iki temel oran vardır:

- A260/280 oranı: Protein kontaminasyonunu gösterir. Saf DNA'nın oranı tipik olarak 1,8 civarındayken, saf RNA'nın oranı 2,0'ye daha yakındır. Daha düşük değerler, artık protein veya fenol varlığını gösterir.
- A260/230 oranı: Tuzlar, karbonhidratlar veya artık organik çözücüler tarafından kontaminasyonu yansıtır. 2,0-2,2 değerleri temiz nükleik asitleri gösterir; daha düşük oranlar, sonraki enzimatik reaksiyonları engelleyebilecek safsızlıkları işaret eder.

Nanodrop ölçümleri hızlıdır ve yalnızca küçük bir numune hacmi (1–2 μL) gerektirir; bu da onları nükleik asit izolasyonundan sonra rutin kontroller için ideal hale getirir (Bruijns et al., 2022; García-Alegría et al., 2020).

2.4.1.1. Ölçüm Prensipleri ve Absorbans

Nanodrop, nükleik asit konsantrasyonunu, absorbans (A) ile çözünen maddenin konsantrasyonu (c) arasındaki ilişkiyi veren Beer-Lambert Yasası'na dayanarak ölçer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Burada:

A = ölçülen absorbans

ϵ = molar yok olma katsayısı (moleküle özgü)

c = nükleik asit konsantrasyonu

l = ışığın numuneden geçiş yolu uzunluğu

Nükleik asitler, aromatik nükleotid bazları nedeniyle 260 nm'de tepe noktası olan ultraviyole (UV) ışığı emerler. Aromatik amino asitler (triptofan ve tirozin) içeren proteinler 280 nm'de, diğer organik kirleticiler ve tuzlar ise 230 nm'de absorbe ederler. Nanodrop, bu dalga boylarında absorbansı ölçerek ve Beer-Lambert Yasasını uygulayarak yaklaşık konsantrasyonu hesaplar ve numunenin saflığı hakkında bilgi sağlar (Desjardins & Conklin, 2010; García-Alegría et al., 2020).

2.4.2. Qubit ile Hassas Miktar Tayini

Qubit florometresi, DNA veya RNA'ya seçici olarak bağlanan floresan boyalar kullanarak nükleik asitlerin son derece hassas ve özgül bir şekilde nicelendirilmesini sağlar. Toplam absorbansı ölçen Nanodrop'un aksine, Qubit floresansı yalnızca hedef moleküle orantılıdır ve proteinlerden, tuzlardan veya serbest nükleotidlerden kaynaklanan girişimleri en aza indirir.

Qubit analizlerinde kullanılan floresan boyalar, nükleik asitlerin yokluğunda minimum arka plan floresansı gösterir. DNA veya RNA'ya bağlandığında, boya konformasyonel bir değişikliğe uğrar ve bu da floresan emisyonunu artırarak pikogram konsantrasyonlarında bile hassas tespit sağlar. Bu yüksek özgülük, Qubit'i özellikle düşük verimli örnekler, bozulmuş RNA veya potansiyel kirleticiler içeren DNA preparatları için kullanışlı hale getirir.

Seçici bağlanma ve floresan ölçümünü birleştirerek, Qubit, spektrofotometrik saflık kontrollerini tamamlayan güvenilir bir nicel değerlendirme sunar ve kütüphane hazırlama, qPCR veya transfeksiyon

gibi sonraki uygulamalarda güven sağlar (Nakayama et al., 2016; Vermessen et al., 2024).

2.4.2.1. Çalışma Prensipli (Seçici Bağlanma)

Qubit sistemi, nükleik asitlere seçici bağlanma gösteren floresan boyalara dayanmaktadır. Her boya, çapraz reaktiviteyi en aza indirgeyerek, çift sarmallı DNA, RNA veya tek sarmallı DNA ile tercihen etkileşime girecek şekilde tasarlanmıştır.

Hedef nükleik asidine bağlandığında, boya konformasyonel bir değişikliğe uğrar ve bu da floresan emisyonunu önemli ölçüde artırır. Bu değişiklik, Qubit florometresi tarafından ölçülür ve örnekteki nükleik asit miktarıyla orantılı bir sinyal sağlar. Bağlanmamış boya minimum floresan gösterir, bu da arka plan gürültüsünü azaltır ve hassasiyeti artırır (Michel et al., 2020).

Boyanın özgüllüğü kritiktir: örneğin, çift sarmallı DNA'ya özgü bir boya, RNA varlığında floresan vermez, bu da karışık nükleik asit içeren örneklerde bile doğru nicelleştirme sağlar. Bu özellik, Qubit ölçümlerini, yeni nesil sekanslama veya düşük kopya sayısına sahip plazmid preparatları gibi hassas nükleik asit konsantrasyonunun gerekli olduğu uygulamalar için özellikle güvenilir kılar (Nakayama et al., 2016).

SONUÇ

Nükleik asit izolasyonu, moleküler biyolojide veri kalitesinin kritik bir belirleyicisidir ve sonraki uygulamaların doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini doğrudan etkiler. Bu bölümde gösterildiği gibi,

DNA ve RNA izolasyon stratejileri iyi tanımlanmış biyokimyasal prensiplere dayanır, ancak örnek tipine, moleküler stabiliteye ve analitik hedeflere bağlı olarak yönteme özgü uyarlamalar gerektirir.

Tek bir izolasyon yaklaşımı evrensel olarak en uygun değildir; bunun yerine, etkili nükleik asit geri kazanımı, ön analitik değişkenlerin titiz kontrolüyle birlikte, ekstraksiyon kimyası ve saflaştırma platformlarının bilinçli seçimine bağlıdır. Özellikle, örnek işleme ve stabilizasyon, izolasyon yönteminin kendisinden daha fazla nükleik asit bütünlüğünü etkiler; bu, özellikle RNA için kritik bir husustur.

Lizis, saflaştırma ve geri kazanım sırasında nükleik asit davranışının mekanistik bir anlayışı, rasyonel yöntem seçimini, verimli sorun gidermeyi ve deneysel tekrarlanabilirliği iyileştirmeyi sağlar. Bu tür bilgiler, araştırma, tanı ve uygulamalı biyoteknoloji ortamlarında güvenilir moleküler veriler üretmek için hayati önem taşımaktadır.

KAYNAKÇA

- Akerlund, T., Nordstrom, K., & Bernander, R. (1995). Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(23), 6791. <https://doi.org/10.1128/JB.177.23.6791-6797.1995>
- Ali, H., Jafar, S., & Qurat-ul-Ain, Q.-A. (2016). Optimized genomic DNA extraction by a modified organic phenol- chloroform method without using PCR for best results. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(1), 100–104. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.IJRMS20160012>
- Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. Di. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017, 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- Anandan, A., & Vrielink, A. (2016). Detergents in Membrane Protein Purification and Crystallisation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 922, 13–28. https://doi.org/10.1007/978-3-319-35072-1_2
- Anvari, M. S., Gharib, A., Abolhasani, M., Azari-Yam, A., Gharalari, F. H., Safavi, M., Mirzaie, A. Z., & Vasei, M. (2020). Pre-analytical Practices in the Molecular Diagnostic Tests, A Concise Review. *Iranian Journal of Pathology*, 16(1), 1. <https://doi.org/10.30699/IJP.2020.124315.2357>
- Arakawa, T., Niikura, T., Kita, Y., & Akuta, T. (2024). Sodium Dodecyl Sulfate Analogs as a Potential Molecular Biology Reagent. *Current*

Issues in Molecular Biology, 46(1), 621.
<https://doi.org/10.3390/CIMB46010040>

Arouri, A., & Mouritsen, O. G. (2013). Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 130–140.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.09.002>

Azman, W. N. W., Omar, J., Koon, T. S., & Ismail, T. S. T. (2019). Hemolyzed Specimens: Major Challenge for Identifying and Rejecting Specimens in Clinical Laboratories. *Oman Medical Journal*, 34(2), 94.
<https://doi.org/10.5001/OMJ.2019.19>

Bakhach, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, 5(3), 119. <https://doi.org/10.4161/ORG.5.3.9583>

Barnett, T. C., Bugrysheva, J. V., & Scott, J. R. (2007). Role of mRNA stability in growth phase regulation of gene expression in the group A streptococcus. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1866–1873.
<https://doi.org/10.1128/JB.01658-06>

Barra, G. B., Santa Rita, T. H., Vasques, J. de A., Chianca, C. F., Nery, L. F. A., & Costa, S. S. S. (2015). EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clinical Biochemistry*, 48(15), 976–981.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.02.014>

Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., Buckley-Taylor, R., Gershater, M., Kiga, D., Marken, J., Sanchania, V., Sison, A., Workman, C. T., Pehlivan, M., Roige, B. B., Aarnio, T.,

- Kivisto, S., Koski, J., Lehtonen, L., Pezzutto, D., ... Zhou, J. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*, 3(1), 512. <https://doi.org/10.1038/S42003-020-01127-5>
- Beri, S., & Gandhi, D. (2021). Quantification of residual cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and sodium deoxycholate (DOC) in Haemophilus influenzae type b (Hib) polysaccharide using NMR. *Biologicals*, 70, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.02.001>
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/NAR/7.6.1513>
- Birnboim, H. C. (1988). Rapid extraction of high molecular weight RNA from cultured cells and granulocytes for Northern analysis. *Nucleic Acids Research*, 16(4), 1487. <https://doi.org/10.1093/NAR/16.4.1487>
- Boiling, J., Edlund, K., Segersten, U., Tahmasebpour, S., Engström, M., Sundström, M., Malmström, P. U., & Micke, P. (2009). Impact of thawing on RNA integrity and gene expression analysis in fresh frozen tissue. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 18(1), 44–52. <https://doi.org/10.1097/PDM.0B013E3181857E92>
- Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., Gardeniers, H., Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA

Quantification Methods. *Analytica* 2022, Vol. 3, Pages 371-384, 3(3), 371–384. <https://doi.org/10.3390/ANALYTICA3030025>

Buljević, N., Preiner, D., Šikuten, I., & Tomaz, I. (2025). Comparison of Different DNA Isolation Methods from Grapevine (*Vitis vinifera*) Leaves. *Separations*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS12110316/S1>

Byrne, R. L., Cocker, D., Alyayyoussi, G., Mphasa, M., Charles, M., Mandula, T., Williams, C. T., Rigby, J., Hearn, J., Feasey, N., Adams, E. R., & Edwards, T. (2022). A novel, magnetic bead-based extraction method for the isolation of antimicrobial resistance genes with a case study in river water in Malawi. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5), 3191. <https://doi.org/10.1111/JAM.15755>

Caruccio, L., & Banerjee, R. (1999). An efficient method for simultaneous isolation of biologically active transcription factors and DNA. *Journal of Immunological Methods*, 230(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00100-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00100-3)

Chakkingal Bhaskaran, B., Meyermans, R., Gorssen, W., Maes, G. E., Janssens, S., & Buys, N. (2023). A Comparative Study on the Effect of Euthanasia Methods and Sample Storage Conditions on RNA Yield and Quality in Porcine Tissues. *Animals*, 13(4), 698. <https://doi.org/10.3390/ANI13040698/S1>

Cheah, U. E., Weigand, W. A., & Stark, B. C. (1987). Effects of recombinant plasmid size on cellular processes in *Escherichia coli*. *Plasmid*, 18(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(87\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0147-619X(87)90040-0)

- Chheda, U., Pradeepan, S., Esposito, E., Strezsak, S., Fernandez-Delgado, O., & Kranz, J. (2024). Factors Affecting Stability of RNA – Temperature, Length, Concentration, pH, and Buffering Species. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113(2), 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.11.023>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.83>
- Consortium, T. exRNAQC. (2025). Blood collection tube and RNA purification method recommendations for extracellular RNA transcriptome profiling. *Nature Communications*, 16(1), 4513. <https://doi.org/10.1038/S41467-025-58607-7>
- Cruz-León, S., Vanderlinden, W., Müller, P., Forster, T., Staudt, G., Lin, Y. Y., Lipfert, J., & Schwierz, N. (2022). Twisting DNA by salt. *Nucleic Acids Research*, 50(10), 5726. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC445>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 45, 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Dominguez, K., & Ward, W. S. (2009). A Novel Nuclease Activity that is Activated by Ca²⁺ Chelated to EGTA. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 55(5–6), 193. <https://doi.org/10.3109/19396360903234052>
- Duale, N., Brunborg, G., Ronningen, K. S., Briesse, T., Aarem, J., Aas, K. K., Magnus, P., Stoltenberg, C., Susser, E., & Lipkin, I. W. (2012). Human

blood RNA stabilization in samples collected and transported for a large biobank. *BMC Research Notes*, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-510>

El-Ashram, S., Al Nasr, I., & Suo, X. (2016). Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnology Reports*, 12, 33. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2016.10.001>

Feliciello, I., & Chinali, G. (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 212(2), 394–401. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1346>

Frazão, C., McVey, C. E., Amblar, M., Barbas, A., Vonnrhein, C., Arraiano, C. M., & Carrondo, M. A. (2006). Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. *Nature*, 443(7107), 110–114. <https://doi.org/10.1038/NATURE05080>

Gangadoo, S., Pathirannahalage, P. R., Cheeseman, S., Dang, Y. T. H., Elbourne, A., Cozzolino, D., Latham, K., Truong, V. K., Chapman, J., Gangadoo, S., Pathirannahalage, P. R., Cheeseman, S., Dang, Y. T. H., Elbourne, A., Cozzolino, D., Latham, K., Truong, V. K., & Chapman, J. (2021). The Multiomics Analyses of Fecal Matrix and Its Significance to Coeliac Disease Gut Profiling. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, 22(4), 1–34. <https://doi.org/10.3390/IJMS22041965>

García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Corella-Madueño, M. A. G., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-García, H.

- (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 8896738. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>
- George, T., & Brady, M. F. (2023). Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA). *The 100 Most Important Chemical Compounds*, 124–126. <https://doi.org/10.5040/9798400605284.ch-039>
- Ghatak, S., Muthukumaran, R. B., & Nachimuthu, S. K. (2013). A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 24(4), 224. <https://doi.org/10.7171/JBT.13-2404-001>
- Goldberg, S. (2008). Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 424, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_1
- Gong, R., & Li, S. (2014). Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 3781–3789. <https://doi.org/10.2147/IJN.S59545>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(12), 1116–1120. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT093377>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2017). Precipitation of DNA with Isopropanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(8), 673–674. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT093385>

- Gullberg, E., Albrecht, L. M., Karlsson, C., Sandegren, L., & Andersson, D. I. (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *MBio*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01918-14>
- Hauer, M. H., Seeber, A., Singh, V., Thierry, R., Sack, R., Amitai, A., Kryzhanovska, M., Eglinger, J., Holcman, D., Owen-Hughes, T., & Gasser, S. M. (2017). Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(2), 99–107. <https://doi.org/10.1038/NSMB.3347>
- Heindorff, K., Aurich, O., Michaelis, A., & Rieger, R. (1983). Genetic toxicology of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). *Mutation Research*, 115(2), 149–173. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90001-5)
- Heumann, D., & Roger, T. (2002). Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*, 323(1–2), 59–72. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00180-8)
- Islam, M. S., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/MI8030083>
- Jafari, M., Mehrnejad, F., Rahimi, F., & Asghari, S. M. (2018). The Molecular Basis of the Sodium Dodecyl Sulfate Effect on Human Ubiquitin Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study.

Scientific Reports, 8(1), 2150. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-20669-7>

Jahn, C. E., Charkowski, A. O., & Willis, D. K. (2008). Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.004>

Kachkin, D. V., Khorolskaya, J. I., Ivanova, J. S., & Rubel, A. A. (2020). An Efficient Method for Isolation of Plasmid DNA for Transfection of Mammalian Cell Cultures. *Methods and Protocols*, 3(4), 69. <https://doi.org/10.3390/MPS3040069>

Karu, N., Deng, L., Slae, M., Guo, A. C., Sajed, T., Huynh, H., Wine, E., & Wishart, D. S. (2018). A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Analytica Chimica Acta*, 1030, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.031>

Kornienko, I. V., Aramova, O. Y., Tishchenko, A. A., Rudoy, D. V., & Chikindas, M. L. (2024). RNA Stability: A Review of the Role of Structural Features and Environmental Conditions. *Molecules* 2024, Vol. 29, 29(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29245978>

Kornienko, I. V., Aramova, O. Yu., Tishchenko, A. A., Rudoy, D. V., Chikindas, M. L., Kornienko, I. V., Aramova, O. Yu., Tishchenko, A. A., Rudoy, D. V., & Chikindas, M. L. (2024). RNA Stability: A Review of the Role of Structural Features and Environmental Conditions.

- Lai, T. Y., Cao, J., Ou-Yang, P., Tsai, C. Y., Lin, C. W., Chen, C. C., Tsai, M. K., & Lee, C. Y. (2022). Different methods of detaching adherent cells and their effects on the cell surface expression of Fas receptor and Fas ligand. *Scientific Reports*, 12(1), 5713. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-09605-Y>
- Li, H., Bhaduri, S., & Magee, W. E. (1998). Maximizing Plasmid Stability and Production of Released Proteins in *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1812. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1812-1815.1998>
- Li, H., Lee, T., Dziubla, T., Pi, F., Guo, S., Xu, J., Li, C., Haque, F., Liang, X. J., & Guo, P. (2015). RNA as a stable polymer to build controllable and defined nanostructures for material and biomedical applications. *Nano Today*, 10(5), 631. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2015.09.003>
- Lim, N. Y. N., Roco, C. A., & Frostegård, Å. (2016). Transparent DNA/RNA Co-extraction Workflow Protocol Suitable for Inhibitor-Rich Environmental Samples That Focuses on Complete DNA Removal for Transcriptomic Analyses. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1588. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01588>
- Liu, A. W., Villar-Briones, A., Luscombe, N. M., & Plessy, C. (2022). Automated phenol-chloroform extraction of high molecular weight genomic DNA for use in long-read single-molecule sequencing.

F1000Research, 11, 240.
<https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.109251.1>

Liu, J., & Lilley, D. M. J. (2007). The role of specific 2'-hydroxyl groups in the stabilization of the folded conformation of kink-turn RNA. *RNA*, 13(2), 200. <https://doi.org/10.1261/RNA.285707>

Maki, K., Sagara, J., & Kawai, A. (1991). A cationic detergent, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), selectively dissociates the intermediate filament of the fibroblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3), 768–774.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91632-M](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91632-M)

Malentacchi, F., Ciniselli, C. M., Pazzagli, M., Verderio, P., Barraud, L., Hartmann, C. C., Pizzamiglio, S., Weisbuch, S., Wyrich, R., & Gelmini, S. (2015). Influence of pre-analytical procedures on genomic DNA integrity in blood samples: The SPIDIA experience. *Clinica Chimica Acta*, 440, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.004>

Marques-Garcia, F. (2020). Methods for Hemolysis Interference Study in Laboratory Medicine – A Critical Review. *EJIFCC*, 31(1), 85.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7109502/>

Michel, B. Y., Dziuba, D., Benhida, R., Demchenko, A. P., & Burger, A. (2020). Probing of Nucleic Acid Structures, Dynamics, and Interactions With Environment-Sensitive Fluorescent Labels. *Frontiers in Chemistry*, 8, 511052.
<https://doi.org/10.3389/FCHEM.2020.00112/FULL>

- Mikhail, B., Dmitrijs, M., & Ivan, M. (2022). A new device-mediated miniprep method. *AMB Express*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13568-022-01360-7>
- Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N., & Esumi, M. (2016). Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS ONE*, 11(3), e0150528. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0150528>
- Nguyen, L. T., Pollock, C. A., & Saad, S. (2024). Extraction of high quality and high yield RNA from frozen EDTA blood. *Scientific Reports*, 14(1), 8628. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-58576-9>
- Nkuna, R., Ijoma, G. N., & Matambo, T. S. (2022). Applying EDTA in Chelating Excess Metal Ions to Improve Downstream DNA Recovery from Mine Tailings for Long-Read Amplicon Sequencing of Acidophilic Fungi Communities. *Journal of Fungi*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/JOF8050419/S1>
- Obara, P., Wolski, P., & Pańczyk, T. (2024). Insights into the Molecular Structure, Stability, and Biological Significance of Non-Canonical DNA Forms, with a Focus on G-Quadruplexes and i-Motifs. *Molecules*, 29(19), 4683. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29194683>
- O’Kennedy, R. D., Baldwin, C., & Keshavarz-Moore, E. (2000). Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *Journal of Biotechnology*, 76(2–3), 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00187-X)

- Ova, A. Ö., Joffre, E., Zandi Shafagh, R., Assunção, M. F. G., Sidorov, R. Y., Santos, L. M. A., Lauschke, V. M., & Römmling, U. (2025). Improved Isolation of Ultra-High-Molecular-Weight Genomic DNA Suitable for Third-Generation Sequencing. *Microorganisms*, 13(3), 534. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS13030534>
- Oyama, M., & Kubota, K. (1991). Inhibition by EDTA and enhancement by divalent cations or polyamines of the dithiothreitol-induced activation of adenylate cyclase in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1092(1), 85–88. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(91\)90180-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(91)90180-6)
- P, C., & N, S. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1987.9999>
- Paladino, A., & Zangi, R. (2013). Ribose 2'-Hydroxyl Groups Stabilize RNA Hairpin Structures Containing GCUAA Pentaloop. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(2), 1214–1221. <https://doi.org/10.1021/CT3006216>
- Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2012). Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, 06(SUPPL.70), 10.1002/0471140864.ps0603s70. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0603S70>

- Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., Borilova, G., Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., & Borilova, G. (2019). The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures. *Molecules* 2019, Vol. 24, 24(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24061188>
- Plouffe, B. D., Murthy, S. K., & Lewis, L. H. (2014). Fundamentals and Application of Magnetic Particles in Cell Isolation and Enrichment. *Reports on Progress in Physics. Physical Society (Great Britain)*, 78(1), 016601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/1/016601>
- Primo, E. D., Otero, L. H., Ruiz, F., Klinke, S., & Giordano, W. (2018). The disruptive effect of lysozyme on the bacterial cell wall explored by an in-silico structural outlook. *Biochemistry and Molecular Biology Education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 46(1), 83–90. <https://doi.org/10.1002/BMB.21092>
- Rana, A. K. (2025). Challenging biological samples and strategies for DNA extraction. *Journal of Investigative Medicine : The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 73(6), 443–459. <https://doi.org/10.1177/10815589251327503>
- Research, O., Ghaheri, M., Kahrizi, D., Yari, K., Babaie, A., Suthar, R. S., & Kazemi, E. (2016). A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cellular and Molecular Biology*, 62(3), 120–124. <https://doi.org/10.14715/CMB/23>

- Rosenberg, H. F. (2008). RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(5), 1079–1087. <https://doi.org/10.1189/JLB.1107725>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protocols*, 2006(1), pdb.prot4455. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT4455>
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 63, 3064. <https://doi.org/10.3791/3064>
- Santos, K. K. dos, Daniel, I. W., Delabio, L. C., Costa, M. A. da, Dutra, J. de P., Ruginsk, B. E., Nardin, J. M., Campos, L. P., Rego, F. G. de M., Picheth, G., Valdameri, G., Moure, V. R., Santos, K. K. dos, Daniel, I. W., Delabio, L. C., Costa, M. A. da, Dutra, J. de P., Ruginsk, B. E., Nardin, J. M., ... Moure, V. R. (2025). Effective Mixed-Type Tissue Crusher and Simultaneous Isolation of RNA, DNA, and Protein from Solid Tissues Using a TRIzol-Based Method. *J 2025, Vol. 8*, 8(1), 3. <https://doi.org/10.3390/J8010003>
- Schmitz, T. C., Dede Eren, A., Spierings, J., de Boer, J., Ito, K., & Foolen, J. (2020). Solid-phase silica-based extraction leads to underestimation of residual DNA in decellularized tissues. *Xenotransplantation*, 28(1), e12643. <https://doi.org/10.1111/XEN.12643>
- Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Dröge, W., & Krammer, P. H. (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *The*

Journal of Cell Biology, 127(1), 15.
<https://doi.org/10.1083/JCB.127.1.15>

Section 1 - Isolation of Nucleic Acids. (2004). *Molecular Microbial Ecology Manual*, 1–212. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2177-0_1

Sharma, N., Jain, S. K., & Rastogi, R. C. (2007). Effect of CTAB and SDS micelles on the excited state equilibria of some indole probes. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 68(3), 927–941.
<https://doi.org/10.1016/J.SAA.2007.01.014>

Shimoguchi, H., Imashiro, C., & Takemura, K. (2024). Detaching cells in culture medium using forced vibration for removing a centrifugation from culture process. *Frontiers in Acoustics*, 2, 1502136.
<https://doi.org/10.3389/FACOU.2024.1502136>

Singh, A. K., Wen, C., Cheng, S., & Vinh, N. Q. (2021). Long-range DNA-water interactions. *Biophysical Journal*, 120(22), 4966.
<https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2021.10.016>

Sissi, C., & Palumbo, M. (2009). Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*, 37(3), 702. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP024>

Skowron, P. M., Krefft, D., Brodzik, R., Kasperkiewicz, P., Drag, M., & Koller, K. P. (2020). An alternative for proteinase K-heat-sensitive protease from fungus *Onygena corvina* for biotechnology: cloning, engineering, expression, characterization and special application for

- protein sequencing. *Microbial Cell Factories*, 19(1).
<https://doi.org/10.1186/S12934-020-01392-3>
- Spitale, R. C., Flynn, R. A., Torre, E. A., Kool, E. T., & Chang, H. Y. (2014). RNA structural analysis by evolving SHAPE chemistry. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 5(6), 867–881.
<https://doi.org/10.1002/WRNA.1253>
- Stadler, J., Lemmens, R., & Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *The Journal of Gene Medicine*, 6 Suppl 1(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1002/JGM.512>
- Stead, M. B., Agrawal, A., Bowden, K. E., Nasir, R., Mohanty, B. K., Meagher, R. B., & Kushner, S. R. (2012). RNAsnap™: a rapid, quantitative and inexpensive, method for isolating total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Research*, 40(20), e156.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKS680>
- Stetsenko, A., Guskov, A., Stetsenko, A., & Guskov, A. (2017). An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. *Crystals 2017, Vol. 7*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/CRYST7070197>
- Tan, Z. J., & Chen, S. J. (2005). Nucleic Acid Helix Stability: Effects of Salt Concentration, Cation Valence and Size, and Chain Length. *Biophysical Journal*, 90(4), 1175. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.105.070904>
- Treweek, J. B., Chan, K. Y., Flytzanis, N. C., Yang, B., Deverman, B. E., Greenbaum, A., Lignell, A., Xiao, C., Cai, L., Ladinsky, M. S., Bjorkman, P. J., Fowlkes, C. C., & Gradinaru, V. (2015). Whole-body tissue stabilization and selective extractions via tissue-hydrogel hybrids

for high-resolution intact circuit mapping and phenotyping. *Nature Protocols*, 10(11), 1860. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2015.122>

Tsang, J. (2017). Bacterial plasmid addiction systems and their implications for antibiotic drug development. *Postdoc Journal: A Journal of Postdoctoral Research and Postdoctoral Affairs*, 5(5), 3. <https://doi.org/10.14304/surya.jpr.v5n5.2>

Vandeventer, P. E., Lin, J. S., Zwang, T. J., Nadim, A., Johal, M. S., & Niemz, A. (2012). Multiphasic DNA Adsorption to Silica Surfaces under Varying Buffer, pH, and Ionic Strength Conditions. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 116(19), 5661. <https://doi.org/10.1021/JP3017776>

Vandeventer, P. E., Mejia, J., Nadim, A., Johal, M. S., & Niemz, A. (2013). DNA Adsorption to and Elution from Silica Surfaces: Influence of Amino Acid Buffers. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 117(37), 10742. <https://doi.org/10.1021/JP405753M>

Versmessen, N., Van Simaey, L., Negash, A. A., Vandekerckhove, M., Hulpiau, P., Vaneechoutte, M., & Cools, P. (2024). Comparison of DeNovix, NanoDrop and Qubit for DNA quantification and impurity detection of bacterial DNA extracts. *PloS One*, 19(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0305650>

Videnska, P., Smerkova, K., Zwinsova, B., Popovici, V., Micenkova, L., Sedlar, K., & Budinska, E. (2019). Stool sampling and DNA isolation kits affect DNA quality and bacterial composition following 16S rRNA

- gene sequencing using MiSeq Illumina platform. *Scientific Reports*, 9(1), 13837. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-49520-3>
- Wang, M., Ji, X., Wang, B., Li, Q., & Zhou, J. (2018). Simultaneous Evaluation of the Preservative Effect of RNAlater on Different Tissues by Biomolecular and Histological Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 16(6), 426–433. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0055>
- Wang, Y., Hayatsu, M., & Fujii, T. (2012). Extraction of Bacterial RNA from Soil: Challenges and Solutions. *Microbes and Environments*, 27(2), 111. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME11304>
- Weiskirchen, S., Schröder, S. K., Buhl, E. M., & Weiskirchen, R. (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*, 12(5), 682. <https://doi.org/10.3390/CELLS12050682>
- Wilfinger, W. W., Eghbalnia, H. R., Mackey, K., Miller, R., & Chomczynski, P. (2023). Whole blood RNA extraction efficiency contributes to variability in RNA sequencing data sets. *PLOS ONE*, 18(11), e0291209. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0291209>
- Xie, T., Zhu, H., Wang, X., Li, F., Wang, A., Zhang, Y., Zhang, S., Guo, D., Xie, T., Zhu, H., Wang, X., Li, F., Wang, A., Zhang, Y., Zhang, S., & Guo, D. (2025). The Interference of RNA Preservative and Post-Collection Interval on RNA Integrity from Different Mice Tissues. *Genes* 2025, Vol. 16, 16(12). <https://doi.org/10.3390/GENES16121421>
- Xu, J., Jiang, N., Zhu, S., Alini, M., Grad, S., Geurts, J., & Li, Z. (2025). Decellularized extracellular matrix-based hydrogels for cartilage repair

and regeneration. *Advanced Orthopaedics*, 1, 83–97.
<https://doi.org/10.1016/J.ADVOP.2024.12.002>

Xu, L., Sun, L., Guan, G., Huang, Q., Lv, J., Yan, L., Ling, L., & Zhang, Y. (2019). The effects of pH and salts on nucleic acid partitioning during phenol extraction. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 38(4), 305–320. <https://doi.org/10.1080/15257770.2018.1533138>

Yilmaz, H., Gultekin Subasi, B., Celebioglu, H. U., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2022). Chemistry of Protein-Phenolic Interactions Toward the Microbiota and Microbial Infections. *Frontiers in Nutrition*, 9, 914118. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.914118>

Yu, A. M., Choi, Y. H., & Tu, M. J. (2020). RNA Drugs and RNA Targets for Small Molecules: Principles, Progress, and Challenges. *Pharmacological Reviews*, 72(4), 862–898. <https://doi.org/10.1124/PR.120.019554>

Yusufaly, T. I., Li, Y., Singh, G., & Olson, W. K. (2014). Arginine-phosphate salt bridges between histones and DNA: Intermolecular actuators that control nucleosome architecture. *The Journal of Chemical Physics*, 141(16), 165102. <https://doi.org/10.1063/1.4897978>

Zhang, C., Thakkar, P. V., Powell, S. E., Sharma, P., Vennelaganti, S., Betel, D., & Shah, M. A. (2019). A comparison of homogenization vs. enzymatic lysis for microbiome profiling in clinical endoscopic biopsy tissue samples. *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), 3246. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.03246/FULL>

- Zhao, F., Wang, Z., Huang, H., Zhao, F., Wang, Z., & Huang, H. (2024). Physical Cell Disruption Technologies for Intracellular Compound Extraction from Microorganisms. *Processes* 2024, Vol. 12, 12(10). <https://doi.org/10.3390/PR12102059>
- Zhu, K., Jin, H., He, Z., Zhu, Q., & Wang, B. (2007). A continuous method for the large-scale extraction of plasmid DNA by modified boiling lysis. *Nature Protocols*, 1(6), 3088. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.452>
- Zhydzetski, A., Głowacka-Grzyb, Z., Bukowski, M., Żądło, T., Bonar, E., Władyka, B., Zhydzetski, A., Głowacka-Grzyb, Z., Bukowski, M., Żądło, T., Bonar, E., & Władyka, B. (2024). Agents Targeting the Bacterial Cell Wall as Tools to Combat Gram-Positive Pathogens. *Molecules* 2024, Vol. 29, 29(17). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29174065>

BÖLÜM 3:

ELEKTROFORETİK TEKNİKLER

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ
Atatürk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Erzurum, Türkiye
E-mail: celebiidil@atauni.edu.tr

Uzman Moleküler Biyolog Betül ARI
Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Erzurum, Türkiye
E-mail: betulari255@hotmail.com

GİRİŞ

Nükleik asitlerin ve proteinlerin boyut, konformasyon ve net yüklerine göre hassas bir şekilde ayrıştırılması, modern mikrobiyolojik araştırmaların ve moleküler tanının temel taşıdır. Analitik bir süreç olan elektroforez; biyomoleküllerin kontrollü bir elektrik alan altında, gözenekli bir matris içerisindeki göç dinamiklerine dayanır (Green & Sambrook, 2012; Westermeier, 2016). Bu teknik, basit bir laboratuvar prosedüründen öte; mikrobiyal genomun bütünlüğünü test etmek, suşlar arasındaki genetik varyasyonları haritalamak ve patojenlerin moleküler parmak izlerini çıkarmak için kullanılan vazgeçilmez bir araştırma disiplini.

Mikrobiyolojik perspektifte elektroforez, mikroorganizmaların kimliğini ve işlevini anlamada stratejik bir role sahiptir. Örneğin; bakteriyel bir genomun belirli bölgesinden kesim yapan restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan makro-fragmanların PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) ile analizi suş tiplemesinde "altın standart" sunarken, karmaşık bir mikrobiyal topluluktaki tür çeşitliliğinin DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ile belirlenmesi mikrobiyal ekolojinin sınırlarını genişletmektedir (Muyzer & Smalla, 1998a; Schwartz & Cantor, 1984). Bu bölümde, temel agaroz sistemlerinden yüksek çözünürlüklü poliakrilamid jel elektroforezine (PAGE) kadar kullanılan farklı metodolojilerin fiziksel prensipleri, RNA bütünlük analizleri ve virülans proteinlerinin karakterizasyonu gibi mikrobiyal tanıdaki kritik pratik uygulamalar ele alınmaktadır.

3.1. Agaroz Jel Elektroforezi: DNA/RNA Fragman Analizi ve Jel Görüntüleme Sistemleri

Agaroz jel elektroforezi, özellikle mikrobiyal DNA izolasyonu sonrası kalite kontrol ve PCR ile çoğaltılan gen ürünlerinin analizi için laboratuvarlarda en yaygın kullanılan yöntemdir.

3.1.1. Agaroz Matris Yapısı ve Göç Dinamikleri

Agaroz, deniz yosunlarından elde edilen lineer bir polimerdir. Jel matrisi içerisindeki gözenek boyutu, polimer konsantrasyonu ile ters orantılıdır. DNA molekülleri, negatif yüklü fosfat grupları sayesinde anoda doğru hareket ederken matris içerisinde "reptasyon" modeli olarak tanımlanan bir sürtünme kuvvetine maruz kalır (Hall, 2019).

3.1.2. Tampon Sistemleri ve Voltaj Optimizasyonu

Mikrobiyolojik çalışmalarda TAE (Tris-Asetat-EDTA) ve TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponları tercih edilir. TBE, yüksek voltajlarda termal stabilite sunarak keskin bant oluşumunu sağlarken; TAE, mikrobiyal genlerin klonlanması amacıyla yapılacak jelden geri kazanım (gel extraction) işlemleri için daha elverişlidir (Green & Sambrook, 2012).

3.1.3. Jel Görüntüleme ve Floresan İşaretleyiciler

Nükleik asitlerin görselleştirilmesi, DNA baz çiftleri arasına girerek bağlanma özelliği gösteren interkalasyon ajanları aracılığıyla gerçekleştirilir. Geleneksel olarak kullanılan Etidyum Bromür (EtBr), çift iplikli DNA'nın istiflenmiş bazları arasına yerleşen ve ultraviyole (UV) ışık altında uyarıldığında turuncu-kırmızı floresan ışımaya veren aromatik bir moleküldür (Westermeier, 2016). Ancak, bu interkalasyon mekanizmasının DNA replikasyonu ve transkripsiyonu sırasında hatalara yol açan yüksek mutajenik riski nedeniyle, modern mikrobiyoloji laboratuvarlarında SYBR Safe veya GelRed gibi daha güvenli ve çevre dostu alternatifler tercih edilmektedir. Dijital görüntüleme sistemleri, bu boyaların emisyon sinyallerini hassasiyetle yakalayıp nükleik asit miktarının yarı-kantitatif analizine olanak tanır (Hall, 2019).

3.2. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE): Mikrobiyal Karakterizasyon ve Küçük Fragman Ayrımı

Poliakrilamid jeller, agaroz sistemlerine göre çok daha küçük gözenek yapısına sahiptir ve tek bir nükleotidlik farkları bile ayırt edebilecek yüksek çözünürlük sunar.

3.2.1. Akrilamid ve Bis-akrilamid Polimerizasyonu

PAGE, akrilamid monomerlerinin N, N'-metilen-bis-akrilamid ile çapraz bağlanması sonucu oluşur. Süreç, APS (Amonyum Persülfat) ve TEMED katalizörlüğünde gerçekleşen bir serbest radikal polimerizasyondur. Gözenek boyutu, mikrobiyal protein veya nükleik asit boyutuna göre %T ve %C oranlarıyla hassas bir şekilde ayarlanabilir (Chrambach & Rodbard, 1971).

3.2.2. Dikey Elektrofrez ve Mikrobiyal Genetik Analiz

Küçük DNA fragmanları (5-500 baz çifti) ve protein komplekslerinin analizi için dikey sistemler kullanılır. Özellikle bakteriyel suşlar arasındaki genetik varyasyonu belirleyen mikrosatellit analizi ve transkripsiyonel regülasyonu anlamamızı sağlayan DNA ayak izi (footprinting) çalışmalarında PAGE vazgeçilmezdir. Bu sistemlerin ayırıştırma kapasitesi, akrilamid konsantrasyonu ve polimerizasyon kinetiği ile doğrudan ilişkilidir (Gelfi & Righetti, 1981).

3.2.3. Sekanslama Jelleri ve Geleneksel Tanı Yaklaşımları

Modern kapiler sistemler öncesinde, bakteriyel genom dizileme reaksiyonları üre içeren denatüre edici PAGE sistemlerinde yürütülmekteydi. Bu sistemler, nükleik asitlerin ikincil yapılarını

bozarak fragmanların sadece uzunluklarına göre ayrılmasını garanti eder (Swerdlow & Gesteland, 1990).

3.2.4. Mikrobiyolojide Spesifik PAGE Uygulamaları

- **SDS-PAGE (Mikrobiyal Proteomik):** Bakteriyel dış membran proteinlerinin (OMP) profilini çıkarmak ve patojenlerin ürettiği ekzotoksinleri (örn. *S. aureus* enterotoksinleri) moleküler ağırlıklarına göre tanımlamak için kullanılır (Laemli, 1970).
- **Native-PAGE Temelli EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay):** Denatüran içermeyen bu sistemde proteinlerin doğal konformasyonlarını koruyarak DNA'ya bağlanma yeteneklerinin analiz edilmesine olanak tanır. Bakteriyel virülans genlerini düzenleyen proteinlerin (transkripsiyon faktörleri) hedef DNA'ya bağlanma yeteneklerini ölçmek için yaygın olarak kullanılır (Hellman & Fried, 2007).
- **DGGE (Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroforezi):** Aynı boydaki DNA parçalarını dizilim farklarına göre ayırır. Karmaşık mikrobiyal topluluklardaki (örn. gut mikrobiyotası) tür çeşitliliğini kültür yapmadan izlemek için kullanılan en güçlü tekniklerden biridir (Muyzer & Smalla, 1998b).

3.3. Pulse-Field Jel Elektroforezi (PFGE): Çok Büyük DNA Moleküllerinin Analizi

Standart elektroforezde 50 kb üzerindeki DNA molekülleri jel içerisinde aynı hızda hareket ederek tek bir bant oluşturur. PFGE, bu sınırı aşmak için geliştirilmiş özel bir tekniktir. Bu teknikte 50 kb üzerindeki DNA fragmanlarını ayırarak bakteriyel genomların suş

düzeyinde karakterizasyonu için kullanılan ileri bir teknolojidir (Schwartz & Cantor, 1984; Tenover et al., 1995).

3.3.1. Değişken Elektrik Alan Mekanizması ve Fiziksel Prensibi

PFGE, elektrik alanının yönünü periyodik olarak değiştiren özel bir sistem kullanır. Büyük DNA moleküllerinin her yön değişiminde kendilerini yeniden hizalama süresi (reorientation time) boyutuyla orantılıdır; bu durum megabaz (Mb) düzeyindeki fragmanların hassas ayırımına olanak tanır (Schwartz & Cantor, 1984).

3.3.2. Mikrobiyal Epidemiyoloji ve "Altın Standart" Tipleme

PFGE, bakteriyel genomun restriksiyon enzimleri (örn. *SmaI*, *XbaI*) ile kesilmesi sonucu oluşan büyük parçaların analizinde kullanılır. Hastane enfeksiyonlarının takibi ve gıda kaynaklı salgınlara kaynağını belirlemede mikrobiyolojik epidemiyolojinin uzun yıllar altın standardı olarak kalmıştır (Neoh et al., 2019).

3.3.3. İntakt DNA Hazırlama Protokolü (Plug Hazırlama)

PFGE'nin başarısı, genomik DNA'nın mekanik olarak kırılmadan izole edilmesine bağlıdır. Bakteri hücreleri düşük erime dereceli agaroz bloklar (plugs) içerisine hapsedilir ve lizis bu bloklar içinde gerçekleştirilir (Birren & Lai, 1993).

3.4. Denatüre Edici Jeller: RNA Bütünlüğü ve Transkript Analizi

RNA, yapısı gereği hızla ikincil yapılar oluşturma eğilimindedir. Bu durum, RNA parçalarının gerçek boyutlarına göre ayrılmasını zorlaştırır. Mikrobiyal transkriptom analizlerinde RNA parçalarının gerçek boyutlarına göre ayrılması için denatürasyon şarttır.

3.4.1. Denatürasyon Ajanları ve Kimyasal Etkileşimler

RNA'nın tek iplikli yapısını korumak için jelin içine veya numune yükleme tamponuna formaldehit veya formamid gibi denatüranlar kullanılır. Bu ajanlar hidrojen bağlarını kopararak RNA'nın rastgele sarmal yapıda kalmasını sağlar (Rio, 2011).

3.4.2. Ribozomal Bant Analizi ve RNA Kalitesi

Başarılı bir elektroforez sonrası, bakteriyel RNA örneklerinde 23S ve 16S ribozomal RNA bantlarının netliği ve birbirine oranı (idealde yaklaşık 2:1) gözlemlenmelidir (Ökaryotik sistemlerde bu değerler 28S ve 18S olarak karşılık bulur). Bantların jel üzerinde yayılması (smearing) veya düşük moleküler ağırlıklı bölgelere doğru kayması, RNA degradasyonunun ve RNase kontaminasyonunun en güçlü göstergesidir (Aranda et al., 2012; Rio, 2011).

3.5. Kapiler Elektroforez (CE): Otomatize Fragman Analizi

Manuel jellerin aksine, nükleik asitlerin çok ince kapiler tüpler içerisinde ayrıştırılması prensibine dayanır. Lazer destekli deteksiyon sistemleri sayesinde tek bir nükleotidlik farklar dijital kromatogramlar olarak raporlanır. Mikrobiyolojide özellikle MLVA gibi yüksek çözünürlüklü tipleme yöntemlerinde ve modern Sanger dizileme cihazlarında temel ayırım mekanizmasıdır (Swerdlow & Gesteland, 1990).

3.6. İki Boyutlu (2D) Elektroforez

Bakteriyel proteinlerin karakterizasyonunda kullanılan en ileri elektroforetik yöntemdir. İlk boyutta proteinler izoelektrik odaklama (IEF) ile yüklerine göre, ikinci boyutta ise SDS-PAGE ile kütlelerine

göre ayrıştırılır. Bu teknik, patojenlerin virölans faktörlerinin ve stres yanıt proteinlerinin global olarak haritalanmasına olanak tanır (Görg et al., 2004).

SONUÇ

Elektroforetik teknikler, nükleik asitlerin ve proteinlerin analitik ayrımında mikrobiyoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez temel taşları olmaya devam etmektedir. Geleneksel agaroz jel sistemleri, nükleik asit izolasyonlarının ve PCR amplifikasyonlarının doğrulanması gibi rutin süreçlerde pratik çözümler sunarken; PAGE ve PFGE gibi ileri yöntemler, mikroorganizmaların genetik yapısındaki en küçük değişimlerin bile saptanmasına olanak tanıyarak moleküler epidemiyolojiye derinlik kazandırmıştır. Elektroforez sadece bir ayrıştırma yöntemi değil; mikrobiyal dünyanın genetik ve proteomik sırlarını aydınlatmada kullanılan en güvenilir analitik köprülerden biridir.

Özellikle RNA bütünlük analizlerinde kullanılan denatüre edici sistemler, transkriptomik çalışmaların veri kalitesini doğrudan etkileyen kritik bir eşik olma özelliğini korumaktadır. Günümüzde bu teknikler, kapiler elektroforez gibi otomatize sistemlere evrilerek daha yüksek hız ve hassasiyet kazansa da elektroforezin temel fiziksel prensiplerini kavramak, deneysel hataların yorumlanması ve metodolojik optimizasyon için elzemdir.

KAYNAKÇA

- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *ELECTROPHORESIS*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Birren, B. W. ., & Lai, E. H. Cheong. (1993). *Pulsed field gel electrophoresis : a practical guide*. Academic Press.
- Chrambach, A., & Rodbard, D. (1971). Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science*, 172(3982), 440–451. <https://doi.org/10.1126/science.172.3982.440>
- Gelfi, C., & Righetti, P. G. (1981). Polymerization kinetics of polyacrylamide gels I. Effect of different cross-linkers. *ELECTROPHORESIS*, 2(4), 213–219. <https://doi.org/10.1002/elps.1150020404>
- Görg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS*, 4(12), 3665–3685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401031>
- Green, M. R. ., & Sambrook, Joseph. (2012). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hall, A. C. (2019). *A comparison of DNA stains and staining methods for Agarose Gel Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1101/568253>
- Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2(8), 1849–1861. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>

Laemli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 228, 726–734. <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>

Muyzer, G., & Smalla, K. (1998a). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127–141. <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>

Muyzer, G., & Smalla, K. (1998b). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127–141. <https://doi.org/10.1023/A:1000669317571>

Neoh, H., Tan, X.-E., Sapri, H. F., & Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>

Rio, D. Charles. (2011). *RNA : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90301-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90301-5)

Swerdlow, H., & Gesteland, R. (1990). Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 18(6), 1415–1419. <https://doi.org/10.1093/nar/18.6.1415>

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V, Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. In *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (Vol. 33, Issue 9). <https://journals.asm.org/journal/jcm>

Westermeier, Reiner. (2016). *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Wiley-VCH.

BÖLÜM 4:

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi

Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: ozgur.celebi@atauni.edu.tr

Moleküler Biyolog Sıla EKTAŞ KALAYCI

Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: sila.ektas14@erzurum.edu.tr

GİRİŞ

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), in vitro koşullar altında belirli DNA dizilerinin üstel çoğaltılmasını sağlayan temel moleküler biyoloji tekniğidir. 1983 yılında geliştirilen bu yöntem, denatürasyon, primer bağlanması ve enzimatik polimerizasyonun tekrarlanan döngüleri yoluyla hücresel DNA replikasyon mekanizmasını taklit ederek çalışır. Günümüzde PCR, enfeksiyon etkenlerinin teşhisinden genotiplendirmeye, mutasyon analizine ve adli bilimlere kadar yüksek hassasiyet ve özgüllük gerektiren analizler için altın standartı oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bir PCR analizinin başarısı, yalnızca

termal döngüleyicinin çalışmasına değil, reaksiyon kinetiğinin hassas yönetimine bağlıdır.

Bu bölüm, primerlerin termodinamik tasarım kriterlerinden reaksiyon bileşenlerinin (Mg^{2+} , dNTP'ler, Polimeraz) optimizasyonuna, Gerçek Zamanlı PCR (qPCR) yoluyla kantitatif veri analizine ve Dijital PCR'nin (dPCR) mutlak kantifikasyon prensiplerine kadar teknik bir çerçeve içinde çoğaltma iş akışını incelemektedir. Amaç, araştırmacıya bilgisayar ortamında tasarımdan veri yorumlamaya kadar tüm süreci kontrol edebilecek teknik yeterliliği kazandırmaktır.

4.1. Deney Öncesi Stratejik Planlama: Primer Tasarımı ve Enzim Seçimi

PCR deneyinin sonucu büyük ölçüde laboratuvar çalışmalarına başlamadan önce, hesaplama ve kavramsal planlama aşamasında belirlenir. Primer tasarımındaki hatalar veya uygun olmayan enzim seçimi, sonraki optimizasyon aşamalarında düzeltilemez ve genellikle başarısız veya yanıltıcı amplifikasyona yol açar (Marmiroli & Maestri, 2025).

Stratejik planlama, biyolojik soruyu tanımlamayı, doğru hedef bölgeyi seçmeyi, uygun termodinamik özelliklere sahip primerler tasarlamayı ve deneysel hedefle uyumlu bir DNA polimeraz seçmeyi içerir. Bu kararların her biri amplifikasyon özgüllüğünü, verimliliğini ve doğruluğunu etkiler. İyi tasarlanmış bir deney, spesifik olmayan ürünleri, primer-dimer oluşumunu ve amplifikasyon sapmasını en aza indirerek sonuçların tekrarlanabilirliğini ve yorumlanabilirliğini artırır (Robertson & Walsh-Weller, 1998).

4.1.1. Primer Tasarım Kriterleri

Primerler, PCR amplifikasyon reaksiyonunun başlangıç ve bitiş noktalarını tanımlayan kısa, tek zincirli tipik olarak 18-25 nükleotid uzunluğunda DNA oligonükleotidleridir. DNA polimerazın DNA sentezini başlatması için gerekli olan temel 3'-hidroksil (3'-OH) grubunu sağlarlar (Schmalenberger et al., 2001).

Etkili primer tasarımı, dizi özgüllüğü, bağlanma kararlılığı ve yapısal basitlik arasında denge kurmayı gerektirir. Primerler, döngü koşulları altında hedef şablona verimli bir şekilde hibritleşmeli ve kendileriyle, birbirleriyle veya hedef olmayan dizilerle istenmeyen etkileşimlerden kaçınılmalıdır. Optimal primer parametrelerinden küçük sapmalar bile verimin azalmasına, spesifik olmayan amplifikasyona veya reaksiyonun tamamen başarısız olmasına yol açabilir (Marmioli & Maestri, 2025).

4.1.1.1. Hedef Bölge Seçimi ve Özgünlük

Primer tasarımındaki ilk ve en kritik adım, genom içindeki uygun hedef bölgenin seçimidir. Primerler, spesifik amplifikasyonu sağlamak için yalnızca hedeflenen DNA dizisine bağlanmalıdır. Hedef dışı bölgelere istenmeyen herhangi bir tamamlayıcılık (komplementerlik), hedef dışı ürünlere ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (Demiralay & Can, 2025).

Hedef diziler, biyolojik öneme, dizi korunumuna (tespit testleri için) veya değişkenliğe (genotipleme ve ayırım için) göre seçilmelidir. Aday primer dizileri tasarlandıktan sonra, in silico özgüllük analizi esastır. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool- Temel Yerel

Hizalama Arama Aracı) gibi araçlar, primer dizilerinin konak genomlarına veya yakından ilişkili hedef dışı organizmalara bağlanmadığını doğrulamak için referans veritabanlarına karşı taranması için kullanılır (Uelze et al., 2020).

Yüksek özgüllük, özellikle karmaşık arka planların ve karışık DNA popülasyonlarının yaygın olduğu tanısal PCR ve mikrobiyolojik uygulamalarda çok önemlidir. Tahmin edilen bağlanma koşulları altında hedef bölgeye benzersiz ve istikrarlı bağlanma gösteren primer dizileri, güvenilir bir PCR analizinin temelini oluşturur (Sachse, 2004).

4.1.1.2. Erime Sıcaklığı (T_m) Dengesi

Bir primerin erime sıcaklığı (T_m), primer-şablon çiftinin %50'sinin tek zincirlere ayrıştığı sıcaklık olarak tanımlanır. T_m, PCR sırasında primer bağlanma davranışını belirleyen ve amplifikasyon verimliliğini ve özgüllüğünü doğrudan etkileyen kritik bir termodinamik parametredir.

Etkili bir PCR için, ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerin T_m değerleri birbirine çok yakın olmalı, ideal olarak 1-2 °C'den fazla farklılık göstermemelidir. T_m farkı büyükse, bir primer verimli bir şekilde bağlanırken diğeri bağlanamayabilir, bu da asimetric amplifikasyona veya verim düşüşüne yol açabilir. Dengeli primer T_m değerleri, her döngüde senkronize bağlanmayı sağlar (Naqib et al., 2019).

T_m, öncelikle primer uzunluğu, GC içeriği ve nükleotid bileşiminden etkilenir. GC baz çiftleri, üç hidrojen bağı nedeniyle çift

zincir stabilitesine daha güçlü katkıda bulunurken, AT baz çiftleri daha az stabiliteye katkıda bulunur. Primer tasarımı sırasında doğru Tm tahmini, uygun bir bağlanma sıcaklığının seçilmesine ve spesifik olmayan bağlanmanın en aza indirilmesine olanak tanır (Kayama et al., 2021).

4.1.1.3. Yapısal Tuzaklar

Yapısal tuzaklar, primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasını ve polimeraz uzamasını engelleyen istenmeyen ikincil yapılardır. Bu yapılar amplifikasyon verimliliğini azaltır ve spesifik olmayan ürünler oluşturabilir (Fan et al., 2019).

Primer-dimer oluşumu, primerlerin özellikle 3' uçlarında kendilerine (kendiliğinden dimer) veya birbirlerine (çapraz dimer) bağlanmasıyla meydana gelir (S. Bustin & Huggett, 2017).

Saç tokası benzeri yapılar, bir primerin iç sekans tamamlayıcılığı nedeniyle kendi üzerine katlanmasıyla oluşur. Bu, primerin 3' ucunun hedef DNA'ya bağlanmasını engeller ve polimeraz başlatılmasını bloke eder (Bikard et al., 2010).

3'-uç stabilitesi (GC kelepçesi), bir hata değil, kasıtlı bir tasarım özelliğidir. 3' ucunda bir veya iki G veya C bazının bulunması, bağlanma gücünü artırır ve kararlı polimeraz tutunmasını sağlar. Bununla birlikte, 3' ucunda aşırı GC içeriğinden kaçınılmalıdır, çünkü bu spesifik olmayan amplifikasyonu teşvik edebilir (Onodera, 2007).

4.1.1.4. GC İçeriği Optimizasyonu

Bir primerin GC içeriği, bağlanma kararlılığını ve erime davranışını doğrudan etkiler. %40-60'lık optimal bir GC içeriği, erime sıcaklığını aşırı derecede artırmadan kararlı bağlanma için yeterli hidrojen bağı sağlar (Mamedov et al., 2008).

Çok düşük GC içeriğine sahip primerler zayıf bağlanır ve bağlanma aşamasında ayrışarak amplifikasyon verimliliğini düşürebilir. Buna karşılık, aşırı yüksek GC içeriği, dupleks kararlılığını artırır ve ikincil yapı oluşumunu teşvik ederek denatürasyonu zorlaştırır ve spesifik olmayan bağlanmayı artırır (Kumar & Kaur, 2014).

Uzun homopolimerik diziler (örneğin; AAAAA veya GGGGG) ve tekrarlayan motiflerden kaçınılmalıdır, çünkü bunlar polimeraz kaymasına ve yanlış primer bağlanmasına yol açabilir. Primer uzunluğu boyunca dengeli baz bileşimi, düzgün bağlanmayı ve güvenilir amplifikasyonu sağlar (Brown & Turner, 2021; Ruiz-Villalba et al., 2017).

4.1.2. DNA Polimeraz Seçim Rehberi

DNA polimerazlar biyokimyasal özellikleri bakımından önemli ölçüde farklılık gösterir ve uygun enzimin seçilmesi, güvenilir amplifikasyon, doğru dizi bilgisi ve sonraki uygulamalarla uyumluluk için çok önemlidir. Polimeraz seçimini etkileyen temel parametreler arasında doğruluk, işlem hızı, hız, sıcaklık stabilitesi ve inhibitörlere karşı direnç yer alır (Ishino & Ishino, 2014).

4.1.2.1. Rutin PCR (Taq Polimeraz)

Taq polimeraz, termofilik bakteri *Thermus aquaticus*'tan izole edilir ve DNA denatürasyonu için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda stabil kalır. Yüksek işlem hızına sahiptir ve hızlı DNA sentezi gerçekleştirir, bu da onu rutin tanı ve tarama testleri için ideal kılar. Bununla birlikte, Taq'ın 3'→5' eksonükleaz düzeltme aktivitesi yoktur, bu da yaklaşık olarak 10^4 – 10^5 nükleotit başına 1 hata oranına neden olur. Ek olarak, Taq, PCR ürünlerinin 3' uçlarına tek bir adenozin kalıntısı ekleyen terminal transferaz aktivitesine sahiptir. Bu özellik TA klonlamayı kolaylaştırırken, künt uçlu ürünler veya yüksek dizi doğruluğu gerektiren uygulamalar için uygun değildir (Ishino & Ishino, 2014).

4.1.2.2. Klonlama ve Sekanslama (High-Fidelity Enzimler)

Pfu, Phusion veya Q5 gibi yüksek doğruluklu polimerazlar, arkeal organizmalardan köken alır ve doğal 3'→5' eksonükleaz aktivitesi içerir. Bu düzeltme işlevi, enzimin uzama sırasında yanlış eşleşmiş nükleotidleri çıkarmasına olanak tanıyarak, Taq'a kıyasla hata oranlarını 50-100 kat azaltır. Bu enzimler künt uçlu ürünler üretir ve bu nedenle klonlama, mutasyon ve sekanslama uygulamaları için tercih edilir. Daha yüksek doğrulukları, daha yavaş uzama hızları ve reaksiyon koşullarına karşı artan hassasiyet pahasına gelir; bu da tampon bileşiminin ve annealing sıcaklıklarının dikkatli bir şekilde optimize edilmesini gerektirir (Dorawa & Kaczorowski, 2024; Russell et al., 2009).

4.1.2.3. Hot-Start Teknolojisi

Yüksek sıcaklıkta aktive olan polimerazlar, antikor bağlanması veya aktif bölgenin kimyasal modifikasyonu yoluyla düşük sıcaklıklarda inaktif kalacak şekilde tasarlanmıştır. Enzim aktivasyonu, yalnızca ilk yüksek sıcaklıkta inkübasyon adımından sonra gerçekleşir. Bu, reaksiyon kurulumu sırasında spesifik olmayan primer bağlanmasını ve uzamasını önleyerek, primer-dimer oluşumunu ve arka plan amplifikasyonunu önemli ölçüde azaltır. Yüksek sıcaklıkta aktive olan enzimler, özellikle düşük kopya sayısına sahip hedefler, multipleks PCR ve karmaşık şablonlarla yapılan reaksiyonlar için avantajlıdır (Xue et al., 2021).

4.2. PCR Reaksiyonunun Kurulması

Deneyisel tasarım aşaması tamamlandıktan sonra, PCR iş akışı, genellikle ana karışım olarak adlandırılan reaksiyon karışımının hazırlanmasına geçer. Bu aşama, enzimatik aktiviteyi desteklerken özgüllüğü korumak için reaksiyon bileşenlerinin dikkatlice optimize edilmesi gereken biyokimyasal bir denge eylemini temsil eder. PCR, iyonik kuvvete, kofaktör bulunabilirliğine ve şablon kalitesine son derece duyarlı olduğundan, bu aşamada uygunsuz denge, amplifikasyon başarısızlığının sık görülen bir nedenidir (Kalle et al., 2014).

4.2.1. Master Mix Hazırlığı

Master Mix (Ana karışım), kalıp DNA hariç, DNA amplifikasyonu için gerekli tüm reaktifleri içerir. Tek ve homojen bir ana karışım hazırlamak, pipetleme hatalarını en aza indirir ve

reaksiyonlar arasında tekrarlanabilirliği artırır. Her bir bileşen, tanımlanmış bir biyokimyasal rol aracılığıyla amplifikasyon verimliliğine katkıda bulunur (Heininger et al., 2003).

4.2.1.1. Magnezyum Klorür ($MgCl_2$) Titrasyonu

Magnezyum iyonları (Mg^{2+}), DNA polimeraz aktivitesi için gerekli kofaktörlerdir. Enzim-dNTP kompleksinin oluşumunu kolaylaştırır ve primerler ile kalıp DNA arasındaki etkileşimleri stabilize ederler (Takezawa et al., 2016).

Düşük Mg^{2+} konsantrasyonlarında, polimeraz aktivitesi azalır ve bu da zayıf amplifikasyona veya ürünün tamamen yokluğuna neden olur. Yüksek Mg^{2+} konsantrasyonlarında, DNA çift sarmalının stabilitesi artar ve uyumsuz baz eşleşmesinin devam etmesine izin verir. Bu azalmış sıkılık, spesifik olmayan amplifikasyonu, primer yanlış bağlanmasını ve agaroz jellerde sahte bantların veya lekelerin ortaya çıkmasını teşvik eder. Bu nedenle, $MgCl_2$ konsantrasyonu her primer-kalıp sistemi için deneysel olarak optimize edilmelidir (Bermek et al., 2010).

4.2.1.2. dNTP Dengesi

Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dTTP, dGTP ve dCTP), yeni sentezlenen DNA zincirlerine dahil edilen substratlardır. dNTP'ler temel olmakla birlikte, ikincil bir kimyasal etkiye de sahiptirler: reaksiyon karışımındaki serbest Mg^{2+} iyonlarını şelat ederler (Burke & Lupták, 2018).

Aşırı dNTP konsantrasyonları, serbest Mg^{2+} 'nin bulunabilirliğini azaltarak dolaylı olarak polimeraz aktivitesini inhibe eder. Tersine, yetersiz dNTP seviyeleri DNA sentezini sınırlar ve verimi düşürür. Bu nedenle, optimum enzim performansını korumak için dNTP konsantrasyonu, $MgCl_2$ seviyeleriyle koordineli olarak dengelenmelidir (Pai & Kearsey, 2017; Stillman, 2013).

4.2.1.3. Tampon (Buffer) Sistemi

PCR tamponu, kararlı bir pH'ı korur ve enzim aktivitesi ve primer bağlanması için gerekli iyonik ortamı sağlar.

Potasyum klorür (KCl), iyonik güce katkıda bulunarak primer-şablon hibritleşmesini artırır ve özgüllüğü iyileştirir. Yüksek GC içeriğine sahip şablonlarda, ikincil yapılar iplik ayrımını engelleyebilir. Bu gibi durumlarda, hidrojen bağlarını destabilize etmek, denatürasyonu kolaylaştırmak ve amplifikasyon verimliliğini artırmak için DMSO veya betain gibi katkı maddeleri kullanılır (Mamedov et al., 2008).

4.2.1.4. Kalıp DNA (Template) Miktarı

PCR oldukça hassas olmasına rağmen, tanımlanmış çalışma sınırları vardır. Yetersiz kalıp DNA (genomik DNA için tipik olarak 1 ng'nin altında) stokastik varyasyonu artırarak tutarsız veya tekrarlanamayan amplifikasyona yol açar. Aşırı kalıp DNA (yaklaşık 500 ng'nin üzerinde) ise ekstraksiyondan taşınan tuzlar, proteinler veya organik bileşikler gibi inhibitörleri ortaya çıkararak reaksiyon inhibisyonuna veya bulanık elektroforetik desenlere neden olabilir (Golenberg et al., 1996).

4.3. Termal Döngü Protokolü

Termal döngü protokolü, polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) temel operasyonel çerçevesini oluşturur ve hassas bir şekilde kontrol edilen sıcaklık değişimleri yoluyla tanımlanmış bir DNA dizisinin seçici ve üstel amplifikasyonunu sağlar. Döngüdeki her sıcaklık adımı, polimeraz aktivitesi ve reaksiyon özgüllüğü için optimum koşulları korurken, belirli bir moleküler olayı (iplik ayrılması, primer hibritleşmesi veya enzimatik DNA sentezi) yönlendirmek üzere tasarlanmıştır. PCR'ın başarısı, yalnızca reaksiyon karışımının kimyasal bileşimine değil, aynı zamanda döngü süreci boyunca sıcaklık ve zamanlama parametrelerinin dikkatli bir şekilde optimize edilmesine de bağlıdır (Ding et al., 2026; Marmiroli & Maestri, 2025).

Protokol, tipik olarak 94°C ila 98°C arasında değişen sıcaklıklarda 2 ila 5 dakika süreyle gerçekleştirilen ilk denatürasyon adımıyla başlar. Bu adım, tamamlayıcı bazlar arasındaki hidrojen bağlarını bozarak çift sarmallı DNA'nın tek sarmallara tamamen ayrılmasını sağlar. Tam denatürasyon, özellikle karmaşık genomik şablonlarla, yüksek moleküler ağırlıklı DNA'larla veya yüksek GC içeriğine sahip bölgelerle çalışırken önemlidir. Ek olarak, bu adım, reaksiyon kurulumu sırasında spesifik olmayan amplifikasyonu ve primer-dimer oluşumunu önlemek için düşük sıcaklıklarda kasıtlı olarak inaktif tutulan Hot-Start DNA polimerazlarını aktive eder. Yetersiz başlangıç denatürasyonu, eksik zincir ayrılmasına yol açarak sonraki döngülerde düşük amplifikasyon verimliliğine neden olabilir (Lorenz, 2012; Marmiroli & Maestri, 2025).

Başlangıç denatürasyonunu takiben, reaksiyon bir dizi döngüsel sıcaklık değişimine girer; her döngü denatürasyon, annealing ve uzatma aşamalarından oluşur. Döngüsel denatürasyon adımı genellikle 94-98°C'de 20-30 saniye süreyle gerçekleştirilir. Rolü, her döngünün başında yeni sentezlenen DNA zincirlerini yeniden ayırmak ve primerlerin bir sonraki annealing aşamasında tekrar bağlanmasına izin vermektir. GC açısından zengin bölgeler veya güçlü ikincil yapılar içeren şablonlar için daha yüksek sıcaklıklar veya daha uzun denatürasyon süreleri gerekebilir; ancak, yüksek sıcaklıklara aşırı maruz kalma, polimeraz aktivitesini azaltabilir ve birden fazla döngü boyunca enzim stabilitesini tehlikeye atabilir (Delidow et al., 1993; Lorenz, 2012).

Annealing aşaması, primer bağlanmasının özgüllüğünü doğrudan belirlediği için PCR döngüsünün en kritik ve hassas aşamasıdır. Annealing sırasında, primerlerin tek sarmallı şablon DNA üzerindeki tamamlayıcı dizilerine hibritleşmesine izin vermek için sıcaklık düşürülür. Tipik olarak, annealing sıcaklığı, primerlerin erime sıcaklığının yaklaşık 3-5°C altında ayarlanır, ancak bu değer primer uzunluğuna, GC içeriğine ve tampon bileşimine bağlı olarak değişebilir. Annealing sıcaklığı çok düşükse, primerler kısmen tamamlayıcı dizilere spesifik olmayan bir şekilde bağlanabilir ve bu da hedef dışı amplifikasyona neden olabilir. Tersine, sıcaklık çok yüksekse, primer bağlanma verimliliği azalır ve bu da verimin azalmasına veya reaksiyonun tamamen başarısız olmasına yol açar (Hwang et al., 2003).

Optimal annealing sıcaklığı bilinmediğinde, optimizasyon stratejisi olarak genellikle gradyan PCR kullanılır. Gradyan PCR'da, bir termal döngü bloğunun farklı sütunları veya satırları boyunca eş zamanlı olarak bir dizi annealing sıcaklığı (örneğin, 55°C ila 65°C) test edilir. Bu yaklaşım, en spesifik ve yoğun amplifikasyon ürününü minimum düzeyde spesifik olmayan bantlarla üreten sıcaklığın hızlı bir şekilde belirlenmesini sağlayarak tekrarlanabilirliği ve testin sağlamlığını artırır(Hwang et al., 2003).

Uzatma adımı, annealing işleminden sonra gelir ve tipik olarak Taq polimeraz gibi termostabil DNA polimerazlar için optimum çalışma sıcaklığı olan 72°C'de gerçekleştirilir. Bu aşamada, polimeraz, şablon ipliğine 5' ila 3' yönünde tamamlayıcı deoksiribonükleotidler ekleyerek annealed primerleri uzatır. Uzatma adımının süresi, öncelikle hedef ampikonun uzunluğuna ve polimerazın işlem hızına bağlıdır. Genel bir kural olarak, standart Taq polimeraz için hedef DNA'nın kilobazı başına yaklaşık 30-60 saniyelik bir uzatma süresi yeterlidir, ancak yüksek doğruluklu veya hızlı polimerazlar daha kısa uzatma süreleri gerektirebilir(Van Pelt-Verkuil et al., 2008).

Bu üç adım—denatürasyon, annealing ve uzatma—25-40 döngü boyunca tekrarlanır ve hedef dizinin üstel amplifikasyonuna yol açar. Döngü sayısı dikkatlice dengelenmelidir: çok az döngü yetersiz ürün verimine yol açarken, çok fazla döngü spesifik olmayan amplifikasyon, reaktif tükenmesi ve polimeraz hatalarının birikmesi riskini artırır(Delidow et al., 1993; Marmiroli & Maestri, 2025).

4.4. PCR Sonrası Gelişmiş Analiz: Real-Time PCR (qPCR) Teknolojileri

Gerçek zamanlı PCR (kantitatif PCR, qPCR), reaksiyon ilerledikçe amplifikasyonun sürekli olarak izlenmesine olanak tanıyarak geleneksel PCR'ın prensiplerini genişletir. Ürünlerin yalnızca termal döngünün tamamlanmasından sonra tespit edildiği uç nokta PCR'ın aksine, qPCR, her döngü sırasında floresans tabanlı tespit yoluyla amplifiye edilmiş DNA'nın birikimini ölçer. Bu gerçek zamanlı izleme, PCR'ı tamamen kalitatif bir teknikten kantitatif bir analitik yöntemeye dönüştürerek, başlangıçtaki şablon bolluğunun hassas bir şekilde ölçülmesini sağlar (Marmioli & Maestri, 2025).

qPCR'ın temel avantajı, reaksiyon verimliliğinin en yüksek olduğu ve ürün birikiminin başlangıç şablon konsantrasyonuyla doğrudan orantılı olduğu üstel fazda amplifikasyonu analiz edebilmesinde yatmaktadır.

Mekanistik açıdan bakıldığında, qPCR, PCR'ın temel biyokimyasal adımlarını değiştirmez; denatürasyon, annealing ve uzatma değişmeden kalır. Bunun yerine, DNA sentezini floresan sinyal üretimine bağlayan optik bir tespit sistemi entegre eder. Bu bağlantı, yalnızca amplifikasyon gerçekleştiğinde floresans üreten ve sinyal yoğunluğunun spesifik olmayan arka plan yerine ürün oluşumunu doğru bir şekilde yansıtmasını sağlayan dikkatlice tasarlanmış kimyasallar gerektirir. qPCR son derece hassas olduğundan, deneysel tasarım ve reaksiyon kurulumu geleneksel PCR'ye göre daha da kritiktir (Millington et al., 2019). Primer verimliliğindeki, reaksiyon

bileşimindeki veya termal döngü koşullarındaki küçük varyasyonlar, kantifikasyon doğruluğunu önemli ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle, qPCR sadece patojen tespiti ve gen ekspresyon analizi için değil, aynı zamanda viral yük belirleme, kopya sayısı varyasyon analizi ve yüksek verimli dizileme verilerinin doğrulanması gibi yüksek hassasiyet gerektiren uygulamalarda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Kralik & Ricchi, 2017; Park et al., 2021).

4.4.1. Tespit Kimyaları

Gerçek zamanlı PCR, DNA amplifikasyonunu ölçülebilir bir floresan sinyale dönüştüren özel algılama kimyalarına dayanır. Bu kimyalar, floresansın amplifiye edilmiş ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmasını sağlamak üzere tasarlanmıştır ve böylece reaksiyonun nicel yorumlanmasına olanak tanır (Mackay et al., 2004).

4.4.1.1. İnterkalasyon Boyaları (SYBR Green)

Yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım, SYBR Green gibi DNA'ya bağlanan floresan boyalara dayanmaktadır. Bu boyalar çözeltide minimum floresans yayar, ancak çift sarmallı DNA'ya bağlandıklarında yüksek oranda floresan hale gelirler. PCR ilerledikçe ve daha fazla çift sarmallı ampikon üretildikçe, floresans yoğunluğu da buna göre artar. Bu sistemin basitliği, hedef spesifik bir prob gerektirmediği için maliyet etkinliğini ve uygulanmasını kolaylaştırır. Bununla birlikte, bağlanan boyalar tüm çift sarmallı DNA'ya ayırım gözetmeksizin bağlandığı için, istenen ampikon ile primer dimerleri gibi spesifik olmayan ürünler arasında ayırım yapamazlar. Sonuç olarak, tespit edilen sinyalin tek ve spesifik bir üründen kaynaklandığını

doğrulamak için dikkatli primer tasarımı ve amplifikasyon sonrası erime eğrisi analizi şarttır (Gudnason et al., 2007).

4.4.1.2. Hidroliz Problemleri (TaqMan) ve FRET

Alternatif ve daha spesifik bir strateji, özellikle TaqMan problemleri gibi hidroliz problemleri olmak üzere, prob tabanlı algılama sistemlerini kullanır. Bu yaklaşımda, diziye özgü bir oligonükleotid probu, ileri ve geri primerler arasındaki hedef bölgeye hibritleşir. Probun bir ucunda floresan bir raporlayıcı, diğer ucunda ise bir söndürücü bulunur ve prob sağlamken floresansı engeller. Uzatma aşamasında, DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi, şablona bağlı probu keser, raporlayıcıyı söndürücüden fiziksel olarak ayırır ve floresansın yayılmasına izin verir. Floresans yalnızca prob tam hedef dizisine hibritleştiğinde üretildiğinden, prob tabanlı kimyalar üstün özgüllük sağlar ve özellikle çoklu testlerde veya tanı uygulamalarında avantajlıdır (Mackay et al., 2004).

Daha gelişmiş algılama sistemleri, sinyal üretiminin iki floroforun yakınlığına bağlı olduğu floresans rezonans enerji transferini (FRET) veya çift prob tasarımlarını kullanır. Bu sistemler, hedef diziye birden fazla probun eş zamanlı bağlanmasını gerektirerek özgüllüğü daha da artırır. Teknik olarak daha karmaşık ve maliyetli olsa da bu yaklaşımlar arka plan gürültüsünü azaltır ve tek nükleotid polimorfizmleri gibi yakından ilişkili diziler arasında ayrımı iyileştirir (Verma et al., 2023).

4.4.2. qPCR Veri Analizi ve Matematiksel Modeller

Gerçek zamanlı PCR'ın analitik gücü sadece floresans tespitinde değil, amplifikasyon verilerinin matematiksel yorumlanmasında da yatmaktadır. qPCR, ardışık döngüler boyunca DNA sentezinin kinetiğini yansıtan karakteristik bir amplifikasyon eğrisi oluşturur. Doğru kantifikasyon, uç nokta ölçümlerine güvenmek yerine, bu eğrinin uygun amplifikasyon fazı içinde analiz edilmesine bağlıdır (Kreitmman et al., 2023).

Tipik bir qPCR amplifikasyon eğrisi dört fazdan oluşur: temel faz, üstel (logaritmik doğrusal) faz, doğrusal faz ve plato fazı. Temel faz sırasında, floresans tespit seviyesinin altında kalır ve arka plan gürültüsü baskındır. Amplifikasyon ilerledikçe, reaksiyon üstel faza girer; bu fazda ürün miktarı teorik olarak her döngüde iki katına çıkar ve floresans, başlangıçtaki şablon konsantrasyonuna orantılı olarak artar. Bu faz, reaksiyon verimliliğinin en yüksek olduğu ve reaktif tükenmesi veya ürün inhibisyonundan en az etkilendiği için kantifikasyon açısından kritiktir. Sonraki döngülerde, reaktifler sınırlayıcı hale geldikçe amplifikasyon verimliliği azalır ve bu da doğru kantifikasyon için uygun olmayan doğrusal ve plato fazlarına yol açar (Hsu et al., 2020; Zhang et al., 2021).

qPCR'deki matematiksel modeller, amplifikasyonun üstel fazından kantitatif bilgi çıkarmak için tasarlanmıştır. Bu faz içinde tutarlı bir floresans eşiği tanımlayarak, qPCR yazılımı her numunenin tespit edilebilir sinyale ulaştığı döngü sayısını belirler. Bu döngü değeri, mutlak ve göreceli kantifikasyon dahil olmak üzere sonraki kantitatif

analizler için temel oluşturur. Bu modellerin güvenilirliği, tutarlı reaksiyon verimliliğine, uygun temel çizgi düzeltmesine ve uygun eşik yerleşimine bağlıdır; bunların tümü deneysel kurulum ve veri analizi sırasında dikkatlice kontrol edilmelidir (Karlen et al., 2007).

4.4.2.1. Temel Metrikler

Kantitatif PCR verilerinin yorumlanması, bir floresans eşiği tanımlamaya ve her reaksiyonun bu eşiği geçtiği döngü sayısını belirlemeye dayanır. Eşik, arka plan gürültüsünün üzerinde ancak amplifikasyonun üstel fazı içinde yer alan, keyfi olarak seçilmiş bir floresans seviyesidir. Amacı, farklı reaksiyonlar arasında anlamlı karşılaştırmaya olanak tanıyan sabit bir referans noktası sağlamaktır. Önemli olan, eşiğin numunenin kendisi tarafından belirlenmemesi, analist veya yazılım tarafından ayarlanması ve aynı deney içindeki tüm numunelerde sabit kalmasıdır.

Eşik döngüsü, genellikle Ct (veya Cq) olarak adlandırılır ve belirli bir reaksiyonun floresans sinyalinin bu önceden tanımlanmış eşiği ilk kez aştığı döngü sayısıdır. Amplifikasyon, erken PCR döngülerinde üstel olduğundan, Ct değeri hedef nükleik asidin başlangıç miktarıyla ters orantılıdır. Daha yüksek başlangıç kopya sayısına sahip numuneler eşiğe daha erken ulaşır ve bu nedenle daha düşük Ct değerlerine sahip olurken, düşük hedef bolluğuna sahip numuneler eşiği geçmek için daha fazla amplifikasyon döngüsüne ihtiyaç duyar.

Eşiğin doğru yerleştirilmesi, kantitatif doğruluk için kritik öneme sahiptir. Eşik değeri çok düşük ayarlanırsa, gerçek

amplifikasyon yerine arka plan dalgalanmalarıyla kesişebilir ve yapay olarak düşük Ct değerlerine yol açabilir. Tersine, eşik değeri çok yüksek ayarlanırsa, reaksiyon verimliliğinin zaten azaldığı ve Ct değerlerinin artık başlangıç şablon miktarını doğru bir şekilde yansıtmadığı amplifikasyonun doğrusal fazına düşebilir. Bu nedenle, eşik değeri her zaman amplifikasyon verimliliğinin maksimum ve en tutarlı olduğu amplifikasyon eğrisinin log-doğrusal (üstel) fazında konumlandırılır.

Eşik değerinin yerleştirilmesine ek olarak, amplifikasyon verimliliği Ct değerlerinin yorumlanmasında merkezi bir rol oynar. İdeal PCR verimliliği, her döngüde ürünün ikiye katlanmasına karşılık gelir, ancak %90 ile %110 arasındaki verimlilikler genellikle kabul edilebilir. Verimlilikteki varyasyonlar, başlangıç şablon konsantrasyonundan bağımsız olarak Ct değerlerini değiştirebilir ve bu da optimize edilmiş reaksiyon koşullarının ve uygun kontrollerin önemini vurgular. Eşik tanımı, Ct belirlemesi ve amplifikasyon verimliliği birlikte, tüm kantitatif qPCR analizlerinin temelini oluşturan ölçütleri oluşturur (Ruiz-Villalba et al., 2021).

4.4.2.2. Mutlak Kantitasyon

qPCR'da mutlak kantifikasyon, bilinmeyen bir örnekte bulunan hedef nükleik asidin tam kopya sayısını belirlemeyi amaçlar. Bu yaklaşım, bilinmeyen örneğin Ct değerinin, bilinen konsantrasyonlara sahip bir dizi standarttan oluşturulan bir standart eğriyle karşılaştırılmasına dayanır. Bu standartlar tipik olarak, uygun bir dinamik aralığı kapsayan seri seyreltmeler halinde hazırlanan, saflaştırılmış PCR ürünleri, plazmid DNA veya hedef diziyi içeren

sentetik oligonükleotidlerden oluşur (Brankatschk et al., 2012; McNair et al., 2025).

Standart eğriyi oluşturmak için, standartlardan elde edilen Ct değerleri, bilinen kopya sayılarının veya konsantrasyonlarının logaritmasına karşı çizilir. Optimal koşullar altında, bu ilişki doğrusaldır ve seyreltme serisi boyunca tutarlı amplifikasyon verimliliğini yansıtır. Standart eğrinin eğimi, amplifikasyon verimliliği hakkında bilgi sağlarken, y eksenini kesimi test duyarlılığını yansıtır. Eğri oluşturulduktan sonra, bilinmeyen bir örneğin Ct değeri, mutlak hedef miktarını hesaplamak için enterpolasyon edilebilir (S. Bustin & Huggett, 2017).

Mutlak kantifikasyonun doğruluğu, çeşitli kritik faktörlere bağlıdır. Standartların doğru bir şekilde nicelendirilmesi ve seyreltilmesi gerekir, çünkü bu aşamada ortaya çıkan herhangi bir hata doğrudan hesaplanan kopya sayılarına yansımaya sebep olacaktır. Ek olarak, standartların ve bilinmeyen örneklerin amplifikasyon verimliliği karşılaştırılabilir olmalıdır; reaksiyon verimliliğindeki farklılıklar standart eğri modelinin geçerliliğini zayıflatır. Bu nedenle, standartlar ve bilinmeyenler genellikle aynı reaksiyon koşulları kullanılarak aynı çalıştırmada amplifiye edilir. Mutlak nicelendirme, viral yük belirleme, mikrobiyal nicelendirme ve kopya sayısı varyasyon analizi gibi hassas hedef sayıların gerekli olduğu uygulamalarda özellikle değerlidir (Brankatschk et al., 2012).

4.4.2.3. Rölatif Kantitasyon ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ Yöntemi)

Göreceli kantifikasyon, gen ekspresyon çalışmalarında en yaygın kullanılan qPCR analiz stratejisidir;       mutlak kopya sayılarını belirlemek yerine, deneysel koşullar arasındaki hedef gen ekspresyonundaki değişiklikleri karşılaştırır. Bu yöntem, hedef genin C_t değerini    meye ve bunu, ekspresyonunun örnekler arasında sabit kaldığı varsayılan, genellikle "housekeeping gen" olarak adlandırılan dahili bir referans gene göre normalleştirmeye dayanır (Livak & Schmittgen, 2001).

Göreceli kantifikasyonun ilk adımı, aynı örnek içindeki hedef genin C_t değeri ile referans genin C_t değeri arasındaki farkı temsil eden ΔC_t değerinin hesaplanmasıdır. Bu normalleştirme, başlangıç materyalindeki, RNA kalitesindeki ve ters transkripsiyon verimliliğindeki varyasyonları düzeltir. Bir sonraki adım, deneysel bir  rneğin ΔC_t değerini bir kontrol veya kalibratör örneğinin ΔC_t değeriyle karşılaştırarak $\Delta\Delta C_t$ değerini elde etmeyi içerir. Gen ekspresyonundaki göreceli değişim daha sonra $2^{-\Delta\Delta C_t}$ olarak hesaplanır; bu, hedef genin ekspresyonundaki katlanma değişimini kontrol koşuluna göre yansıtır (Hampton et al., 2025).

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ yönteminin matematiksel mantığı, hem hedef hem de referans genlerin amplifikasyon verimliliklerinin yaklaşık olarak eşit ve %100'e yakın olduğunu varsayar. Bu varsayım ihlal edilirse, hesaplanan kat değişimleri yanlış olabilir. Bu nedenle, primer verimliliğinin doğrulanması, güvenilir göreceli nicelleştirme için temel bir ön koşuldur. Ek olarak, uygun bir referans genin dikkatli seçimini kritik

öneme sahiptir, çünkü referans gen ekspresyonundaki değişkenlik, normalleştirme doğruluğunu doğrudan tehlikeye atar (Rao et al., 2013).

Göreceli nicelleştirme, basitliği, verimliliği ve harici standartlara ihtiyaç duymaması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle gen ekspresyon profillemesi, tedaviye yanıt analizi ve fonksiyonel genomik deneyler gibi karşılaştırmalı çalışmalar için uygundur (Hampton et al., 2025; Livak & Schmittgen, 2001; Rao et al., 2013).

4.4.3. qPCR'da Standardizasyon ve Tekrarlanabilirlik: MIQE Çerçevesi

Kantitatif gerçek zamanlı PCR'ın yüksek hassasiyetine ve analitik gücüne rağmen, bilimsel literatürde qPCR verilerinin en büyük sınırlamalarından biri, laboratuvarlar arası düşük tekrarlanabilirlik olmuştur. Deney tasarımı, örnek işleme, reaksiyon koşulları ve veri analiz stratejilerindeki farklılıklar nedeniyle, aynı deneyler genellikle tutarsız sonuçlar vermektedir. Bu sorunu ele almak için, Bustin ve meslektaşları tarafından 2009 yılında Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Deneylerinin Yayınlanması İçin Minimum Bilgi (MIQE) kılavuzları tanıtılmıştır. MIQE'nin birincil amacı, teknik kısıtlamalar getirmek değil, qPCR deneylerinin diğer araştırmacılar tarafından bağımsız olarak değerlendirilmesine, tekrarlanmasına ve doğrulanmasına olanak tanıyan şeffaflık standartları oluşturmaktır.

MIQE kılavuzları, güvenilir qPCR verilerinin, uygun kontrol grupları ve yeterli biyolojik ve teknik tekrarlar da dahil olmak üzere, açıkça tanımlanmış deneysel tasarımla başladığını vurgulamaktadır.

Özellikle gen ekspresyon çalışmalarında, RNA bütünlüğünün bozulmadan kaynaklanan artefaktları önlemek için doğrulanması gerektiği durumlarda, örnek kalitesi doğruluğun kritik bir belirleyicisi olarak kabul edilir. Bu bağlamda, jel elektroforezi veya RNA bütünlük numarası (RIN) değerleri gibi RNA kalite değerlendirme yöntemlerinin belgelendirilmesi esastır. Benzer şekilde, nükleik asit izolasyon prosedürleri, ekstraksiyon kitleri, protokol değişiklikleri veya genomik DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için kullanılan DNaz tedavisi nedeniyle ortaya çıkan değişkenliği hesaba katacak şekilde yeterli ayrıntıda açıklanmalıdır.

Primer ve prob özelliklerinin doğru bir şekilde raporlanması, MIQE çerçevesinin bir diğer merkezi bileşenidir. Ticari olmayan testler kullanıldığında, primer dizileri, ampikon uzunluğu ve hedef özgüllüğüne dair kanıtlar (genellikle in silico analizle gösterilir) sağlanmalıdır. Bu gereklilik, primer tasarımının amplifikasyon verimliliği ve özgüllüğü üzerindeki güçlü etkisini yansıtır ve bu da nicel sonuçları doğrudan etkiler. Buna paralel olarak, reaksiyon hacimleri, enzim sistemleri, döngü parametreleri ve tespit kimyası dahil olmak üzere qPCR reaksiyon koşullarının tam olarak açıklanması, deneysel koşulların doğru bir şekilde tekrarlanabilmesini sağlar.

Son olarak, MIQE kılavuzları, anlamlı nicelleştirme için gerekli olan veri normalizasyonu ve amplifikasyon verimliliğine özel önem vermektedir. PCR verimliliğinin deneysel olarak, genellikle standart eğri analizi yoluyla doğrulanması ve döngüler boyunca orantılı amplifikasyonu sağlamak için kabul edilebilir bir aralıkta olması

gerekir. Benzer şekilde, referans genlerin kullanımı deneysel olarak gerekçelendirilmelidir, çünkü kararsız normalizasyon hedefleri göreceli ifade ölçümlerini bozabilir. Birlikte ele alındığında, bu raporlama standartları qPCR'ı kapalı kutu tekniğinden şeffaf bir analitik yöntemle doğru kaydırır (S. A. Bustin et al., 2009; Van Heuverswyn et al., 2016).

4.5. Özelleşmiş PCR Teknikleri

Geleneksel PCR ve qPCR birçok deneysel ihtiyacı karşılarsa da bazı uygulamalar belirli biyolojik veya analitik zorlukların üstesinden gelmek için değiştirilmiş yaklaşımlar gerektirir. Özel PCR teknikleri, hassasiyeti, özgüllüğü veya farklı nükleik asit şablon türleriyle uyumluluğu iyileştirmek için temel PCR çerçevesini uyarlar (Kaltenboeck & Wang, 2006).

Bu yöntemler, hedeflerin düşük miktarda bulunduğu, birden fazla dizinin aynı anda analiz edilmesi gerektiği veya başlangıç materyalinin DNA yerine RNA olduğu durumlarda özellikle kullanışlıdır. Reaksiyon tasarımı, döngü stratejisini veya tespit mantığını ayarlayarak, özel PCR teknikleri, PCR'ın kapsamını basit DNA amplifikasyonunun ötesine genişletir (Marmiroli & Maestri, 2025).

4.5.1. Reverse Transcription PCR (RT-PCR): RNA Analizi

PCR, doğası gereği DNA tabanlı bir tekniktir ve bu nedenle RNA moleküllerini doğrudan çoğaltamaz. Ters Transkripsiyon PCR (RT-PCR), RNA'nın önce tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) ters transkripsiyonunu sağlayan enzimatik bir dönüşüm adımı ekleyerek bu sınırlamayı aşar. Bu cDNA daha sonra sonraki PCR veya qPCR

analizleri için kararlı ve çoğaltılabilir bir şablon görevi görür (Mo et al., 2012).

RT-PCR, mRNA bolluğunu tespit edilebilir DNA çoğaltmasıyla ilişkilendirerek gen ekspresyonunun incelenmesini sağlar. RNA seviyeleri aktif transkripsiyonu yansıttığı için, RT-PCR gen regülasyonunu, hücresel yanıtları ve dokuya özgü ekspresyon modellerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, RNA kimyasal olarak DNA'dan daha az kararlıdır ve RNazlar tarafından parçalanmaya karşı oldukça hassastır; bu nedenle güvenilir sonuçlar için dikkatli numune işleme ve yüksek kaliteli RNA izolasyonu şarttır (Taylor et al., 2019).

4.5.1.1. cDNA Sentez Stratejileri

RNA'dan cDNA sentezi, RT-PCR'da belirleyici bir adımdır ve sonraki sonuçların doğruluğunu ve yorumlanabilirliğini belirlemede merkezi bir rol oynar. cDNA sentezi, RNA'yı şablon olarak kullanarak tamamlayıcı bir DNA zinciri oluşturan ters transkriptaz enzimleri tarafından katalize edilir. Ters transkripsiyon tüm RNA türlerinde tekdüze bir süreç olmadığından, bu reaksiyonu başlatmak için kullanılan strateji, nihai cDNA havuzunda hangi RNA moleküllerinin temsil edileceğini büyük ölçüde etkiler (Mo et al., 2012).

Yaygın olarak üç ana başlatma stratejisi kullanılır.

- Oligo(dT) primerleri, ökaryotik mRNA'nın poli(A) kuyruğuna bağlanarak, ribozomal ve transfer RNA'ları dışlarken olgun mRNA transkriptlerinin seçici dönüşümünü sağlar. Bu yaklaşım

gen ekspresyon çalışmaları için uygundur, ancak bozulmuş veya kısa poli(A) kuyruklarına sahip transkriptleri eksik temsil edebilir.

- Tipik olarak kısa hegzamerler olan rastgele primerler, RNA molekülleri boyunca birden fazla pozisyona bağlanarak, kısmen bozulmuş RNA dahil olmak üzere tüm RNA türlerinden geniş ve nispeten tekdüze cDNA sentezini mümkün kılar. Bu strateji, kapsama alanını artırır ancak mRNA için özgüllüğü azaltır.
- Gene özgü primerler, tanımlanmış bir RNA dizisini hedefler ve yalnızca ilgilenilen transkript için cDNA üretir; bu da yüksek özgüllük sağlar ancak cDNA'nın daha sonraki aşamalarda yeniden kullanımını sınırlar (Rio et al., 2010).

4.5.2. Küçük RNA (miRNA, siRNA, piRNA) Amplifikasyon Stratejileri

MikroRNA (miRNA), küçük müdahale edici (small-interfering) RNA (siRNA) ve Piwi etkileşimli RNA (piRNA) gibi küçük RNA molekülleri, kısa uzunlukları, dizi benzerlikleri ve sık kimyasal modifikasyonları nedeniyle PCR tabanlı iş akışlarında ayrı bir analitik zorluk oluşturmaktadır. Haberci RNA'nın aksine, bu moleküller geleneksel ters transkripsiyon ve amplifikasyon stratejilerinin altında yatan varsayımlara uymamaktadır. Sonuç olarak, bunların doğru tespiti ve nicelendirilmesi, biyofiziksel ve termodinamik kısıtlamalarını açıkça ele alan özel yaklaşımlar gerektirmektedir. Bu bölümde açıklanan yöntemler, güvenilir PCR amplifikasyonunu sağlamak için ters transkripsiyon veya primer bağlanma adımlarını değiştirerek bu

sınırlamaların üstesinden gelmek üzere tasarlanmıştır (Grimson et al., 2008; Xiong & Zhang, 2023).

4.5.2.1. Biyofiziksel Zorluk ve Uzatma (Elongation) Prensibi

Küçük RNA'ların çoğaltılmasındaki temel engel, tipik olarak 18 ila 30 nükleotit arasında değişen son derece kısa uzunluklarından kaynaklanmaktadır. Standart PCR çoğaltması, hedef dizinin farklı bölgelerine bağlanacak iki primer (ileri ve geri) gerektirir. Bununla birlikte, küçük RNA'larda, mevcut dizi alanı, her iki primeri de örtüşme olmadan barındırmak için yetersizdir, bu da geleneksel primer tasarımını fiziksel olarak imkansız hale getirir. Bu sınırlama sadece teknik değil, temel olarak biyofizikselidir, çünkü kısa RNA molekülleri ayrıca düşük erime sıcaklıkları ve kararsız primer-şablon etkileşimleri sergiler (Kalle et al., 2014; Ro et al., 2006).

Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için, küçük RNA çoğaltma stratejileri, ters transkripsiyon adımı sırasında hedef molekülün etkin uzunluğunu yapay olarak uzatmaya dayanır. RNA'nın bir veya her iki ucuna tanımlanmış diziler ekleyerek, bu yaklaşımlar, geleneksel PCR primer bağlanmasını destekleyecek kadar uzun bir tamamlayıcı DNA (cDNA) şablonu oluşturur. Bu uzantıyı elde etmek için kullanılan spesifik mekanizma (yapısal ön hazırlık, enzimatik kuyruk ekleme veya adaptör bağlanması yoluyla olsun), yöntemin farklı küçük RNA sınıfları için duyarlılığını, özgüllüğünü ve uygunluğunu belirler (Antoszewski et al., 2026; Xiang et al., 2003).

4.5.2.2. Stem-Loop (Sap-Halka) RT-PCR Yöntemi

Stem loop RT-PCR, olgun mikroRNA'ların yüksek özgüllükte kantifikasyonu için altın standart olarak kabul edilir. Bu yaklaşımda, ters transkripsiyon, miRNA'nın 3' ucundaki son altı ila sekiz nükleotide tamamlayıcı olan özel olarak tasarlanmış bir stem loop primeri kullanılarak başlatılır. Primer, kararlı bir saç tokası yapısı oluşturmak için kendi üzerine katlanır ve çift sarmallı bir kök ve tek sarmallı bir halka oluşturur. Bu benzersiz mimari, cDNA sentezi sırasında hem yapısal hem de işlevsel amaçlara hizmet eder (Kramer, 2011).

Mekanistik açıdan, stem loop konfigürasyonu katı bağlanma özgüllüğü sağlar. Primer, yalnızca olgun miRNA moleküllerine verimli bir şekilde bağlanabilirken, daha uzun öncü formlar (pre-miRNA) veya genomik DNA, kararlı etkileşim için gerekli olan kesin 3' ucuna sahip değildir. Termodinamik olarak, saç tokası yapısı, kısa hedef uzunluğuna rağmen primer erime sıcaklığını ve bağlanma kararlılığını artırarak, spesifik olmayan primer bağlanmasını en aza indirir. Ters transkripsiyon tamamlandıktan sonra, elde edilen cDNA, TaqMan hidroliz problemleri veya SYBR Green tespiti gibi standart qPCR kimyasalları kullanılarak yüksek hassasiyet ve özgüllükle çoğaltılmaya olanak sağlayacak kadar uzamış olur (Kramer, 2011).

4.5.2.3. Poly(A) Kuyruklama Yöntemi

Poli(A) kuyruklandırma, özellikle büyük geçiş tarama veya ekspresyon panelleri gibi anında fazla küçük RNA'nın aynı anda profillenmesi kullanılan esnek bir amplifikasyon stratejisidir. Her bir miRNA için benzersiz bir ters transkripsiyon primeri içeren stem loop

RT-PCR'ın aksine, bu yöntem örnekte tüm küçük RNA'lara tek tip bir değişiklik uygular. Anahtar adım, *Escherichia coli* poli(A) polimerazı ile RNA moleküllerinin 3' ucuna bir dizi adenozin birikiminin enzimatik olarak eklenmesini içerir (Botero et al., 2005).

Bu yapay poliadenilasyon, küçük RNA'nın uzunluğunu etkili bir şekilde uzatarak, bir oligo(dT) primeri ile cDNA sentezini içeren bir adaptör dizisi mümkün. Sonraki qPCR adımında, hedefe özgü bir ileri primer ve adaptör tamamlayıcı evrensel bir ters primer ile amplifikasyon devam ediyor. Bu yöntem, yüksek verimlilik ve sağlıklı basitlik sunarken, tüm küçük RNA'lar -olgunluk veya işlevlerden bağımsız olarak eşit şekilde kuyruklandırıldığı için özgünlüğü stem loop RT-PCR'dan doğal olarak daha düşüktür. Sonuç olarak, poli(A) kuyruklandırma, bireysel miRNA türlerinin hassas bir şekilde güzelleştirilmesinden tek tek, işlemlersel çalışmalar ve geniş kapsamlı ifade profillemesi için daha uygundur (Botero et al., 2005; Kang et al., 2012).

4.5.2.4. Adaptör Ligasyon (Bağlama) Yöntemi (siRNA ve piRNA İçin)

Özellikle piRNA'lar ve bazı siRNA'lar gibi belirli küçük RNA sınıfları için, 3' ucundaki kimyasal modifikasyonlar nedeniyle poli(A) kuyuklama stratejileri optimal değildir. Bu modifikasyonlar, poli(A) polimeraz aktivitesini etkileyerek verimsiz veya yanlış kuyuklamaya yol açar. Bu gibi durumlarda, adaptör ligasyonuna dayalı yaklaşımlar daha sağlam ve modifikasyona toleranslı bir alternatif sunar (Perumal & Reddy, 2018).

Bu yöntemde, bilinen dizilere sahip sentetik RNA adaptörleri, en yaygın olarak T4 RNA Ligaz 2 olmak üzere RNA ligazları kullanılarak hedef küçük RNA'nın 3' ve daha sonra 5' uçlarına enzimatik olarak bağlanır. Bağlanan adaptörler, tanımlanmış primer bağlama bölgeleri olarak işlev görerek kısa RNA'yı daha uzun, PCR uyumlu bir şablona dönüştürür. Molekülün her iki ucu da dizi tanımlı olduğundan, bu strateji tam uzunlukta analiz sağlar ve izomiR'ler ve terminal modifikasyonlar dahil olmak üzere dizi varyasyonunu korur. Adaptör bağlanmasının ardından, adaptöre özgü bir primer kullanılarak ters transkripsiyon gerçekleştirilir ve elde edilen cDNA, qPCR ile çoğaltılır veya sonraki sekanslama uygulamaları için hazırlanır (Zhuang et al., 2012).

4.5.2.5. LNA (Locked Nucleic Acid) Teknolojisi

Küçük RNA tespitinde temel bir zorluk, kısa nükleik asit çiftlerinin doğası gereği düşük erime sıcaklığıdır, bu da primer ve prob bağlanma özgülüğünü tehlikeye atar. Kilitli Nükleik Asit (LNA) teknolojisi, oligonükleotidlerin kimyasal modifikasyonu yoluyla bu sınırlamayı giderir. LNA bazlarında, riboz şekeri, 2' oksijen ve 4' karbon arasında bir metilen köprüsü ile konformasyonel olarak kısıtlanır ve şekeri, kararlı baz eşleşmesini destekleyen sert bir yapıya "kilitler" (Levin et al., 2006).

Bu yapısal kısıtlama, baz istifleme etkileşimlerini artırır ve LNA-RNA veya LNA-DNA çiftlerinin termal kararlılığını önemli ölçüde artırır. Sonuç olarak, LNA kalıntıları içeren primerler veya proplar, yüksek tavlama sıcaklıklarında bile çok kısa hedeflere yüksek

afiniteli bağlanma sağlayabilir. Bu, yalnızca tek bir nükleotid ile farklılık gösteren yakından ilişkili diziler arasında daha iyi ayırım yapılmasına olanak tanır. Bu nedenle LNA teknolojisi, geleneksel DNA tabanlı oligonükleotidlerin yeterli özgüllüğe sahip olmadığı, kısa siRNA'ların, miRNA ailesi üyelerinin veya tek nükleotid varyantlarının hassas bir şekilde tespit edilmesini gerektiren uygulamalarda özellikle değerlidir (Owczarzy et al., 2011).

4.5.3. Multiplex PCR

Multiplex PCR, iki veya daha fazla farklı hedef dizinin, birden fazla primer çifti kullanılarak tek bir reaksiyon tüpü içinde eş zamanlı olarak çoğaltıldığı geleneksel PCR'ın bir uzantısıdır. Bu yaklaşımın temel avantajı verimliliklidir: örnek materyalini korur, reaktif tüketimini azaltır ve aynı reaksiyon koşulları altında birkaç genin veya patojenin paralel olarak tespit edilmesini sağlar (Markoulatos et al., 2002).

Multiplex PCR'ın temel zorluğu reaksiyon dengesinde yatmaktadır. Tüm primer çiftleri, özellikle erime sıcaklığı ve bağlanma davranışı açısından, aynı termal döngü koşulları altında çalışacak şekilde dikkatlice tasarlanmalıdır. Farklılıklarlılığındeki önemli farklılıklar, diğerlerinin pahasına bir hedefin tercihli olarak çoğaltılmasına yol açarak, yanlış veya yanıltıcı sonuçlara neden olabilir (Yang et al., 2005).

Ortak reaktifler (DNA polimeraz, dNTP'ler ve magnezyum iyonları) için rekabet, multiplex reaksiyonlarını daha da karmaşık hale getirir. Hedef sayısı arttıkça, primer-dimer oluşumu ve spesifik olmayan çoğaltma olasılığı da artar. Bu nedenle, multiplex PCR

genellikle bireysel primer konsantrasyonlarının ayarlanması, dikkatli magnezyum titrasyonu ve artırılmış özgülüğe sahip sıcak başlangıçlı polimerazların kullanımı da dahil olmak üzere kapsamlı optimizasyon gerektirir (Broude et al., 2001; Yang et al., 2005).

4.5.4. Nested (İç İçe) PCR

İç içe PCR, özellikle çok düşük hedef kopya sayıları veya yüksek düzeyde arka plan DNA'sı içeren örneklerde DNA tespiti için hem duyarlılığını hem de özgülüğünü artırmak için tasarlanmış iki aşamalı bir amplifikasyon stratejisidir. Yöntem, iki ardışık PCR reaksiyonu gerçekleştirmeyi içerir. İlk turda, dış bir primer çifti, hedef diziyi içeren nispeten büyük bir DNA bölgesini yükseltir. Bu ilk tur ürününün küçük bir kısmı daha sonra, ilk amplikonun içine bağlanan yeni bir primer seti (iç içe primerler olarak adlandırılır) kullanan ikinci bir PCR için şablon görevi görür (Green & Sambrook, 2019).

İç içe PCR'ın temel mantığı olasılık ve özgülüğe dayanmaktadır. İlk amplifikasyon sırasında üretilen spesifik olmayan ürünlerin, ikinci, daha spesifik primer çifti için bağlanma bölgeleri içermesi son derece düşük bir olasılıktır. Sonuç olarak, bu istenmeyen ürünler ikinci turda yükseltilmezken, doğru hedef dizi seçici olarak zenginleştirilir. Bu ardışık filtreleme etkisi, arka plan gürültüsünü önemli ölçüde azaltır ve hedef tanımlamasına olan güveni artırır (Brun et al., 2020).

İç içe PCR, özellikle hedef DNA'nın az veya bozulmuş olabileceği klinik örneklerde patojen tespiti, antik DNA analizi ve çevre mikrobiyolojisi gibi uygulamalarda oldukça değerlidir. Bununla

birlikte, reaksiyon tüplerinin birinci ve ikinci turlar arasında açılması gerektiğinden, bu teknik kontaminasyon riskini artırır. Yanlış pozitif sonuçları önlemek için, PCR öncesi ve sonrası alanların fiziksel olarak ayrılması, aerosol dirençli uçların kullanılması ve negatif kontrollerin dahil edilmesi gibi sıkı laboratuvar uygulamaları şarttır (Green & Sambrook, 2019).

4.5.5. Dijital PCR (dPCR)

Dijital PCR, standart eğrilere veya amplifikasyon verimliliği varsayımlarına dayanmadan nükleik asitlerin mutlak kantifikasyonunu sağlayarak geleneksel ve gerçek zamanlı PCR yöntemlerinden kavramsal bir geçişi temsil eder. dPCR'nin belirleyici özelliği örnek bölümlendirmesidir: tek bir PCR reaksiyonu, tipik olarak damlacıklar, kuyucuklar veya mikro odacıklar şeklinde binlerce ila milyonlarca bireysel mikro reaksiyona bölünür. Her bölüm, hedef DNA molekülünün sıfır, bir veya birkaç kopyasını içerir.

Amplifikasyondan sonra, bölümler pozitif (floresans tespit edildi) veya negatif (floresans yok) olarak puanlanır. Her bölüm bağımsız bir ikili reaksiyon gibi davrandığı için, orijinal örnekteki hedef molekül sayısı, birden fazla hedef molekülün aynı bölüme girmiş olma olasılığını hesaba katan Poisson istatistikleri kullanılarak doğrudan hesaplanabilir. Bu istatistiksel çerçeve, çok düşük hedef konsantrasyonlarında bile son derece hassas ve tekrarlanabilir kantifikasyona olanak tanır (Munjaković et al., 2025; Quan et al., 2018).

Mekanistik olarak, bölümlendirme, hedef ve hedef olmayan diziler arasındaki rekabeti azaltır ve PCR inhibitörlerinin etkisini en aza

indirir. Sonuç olarak, dPCR, karmaşık örnek matrislerine karşı üstün tolerans ve nadir varyantların tespiti için olağanüstü hassasiyet sergiler. Bu özellikler, dPCR'ı özellikle onkolojide sıvı biyopsi analizi, düşük frekanslı mutasyonların tespiti, viral yük ölçümü ve kopya sayısı varyasyon analizi gibi uygulamalar için değerli kılar (Quan et al., 2018).

Avantajlarına rağmen, dPCR'ın qPCR'ın yerini alması amaçlanmamıştır. Teknik, özel ekipman gerektirir, büyük ölçekli tarama için daha düşük verimliliğe sahiptir ve genellikle daha maliyetlidir. Bunun yerine, mutlak nicelleştirme veya nadir hedef tespiti gerektiğinde benzersiz doğruluk sunarak tamamlayıcı bir rol üstlenir.

SONUÇ

Bu bölüm boyunca incelendiği gibi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), basit bir amplifikasyon adımından çok daha fazlasıdır; modern moleküler tanı ve genomik araştırmaların temel taşıdır. Primer tasarımının in silico termodinamiğinden, magnezyum ve polimeraz doğruluğunun ıslak laboratuvar optimizasyonuna kadar kritik yolculuğu ele aldık ve başarılı bir PCR'ın, reaksiyon tüpü termal döngüleyiciye girmeden çok önce tasarlandığını gösterdik.

Teknoloji, basit uç nokta analizinden Gerçek Zamanlı PCR'ın (qPCR) kantitatif hassasiyetine ve Dijital PCR'ın (dPCR) mutlak kantifikasyonuna kadar evrim geçirmiş olsa da altta yatan biyokimyasal prensipler sabit kalmıştır. Hibritleşme dinamiklerini, enzim işleme yeteneğinin inceliklerini ve inhibisyon risklerini anlamak, güvenilir veri üretmek için çok önemlidir.

Bugün, Yeni Nesil Dizileme (NGS) ve izotermal amplifikasyon teknolojileri önem kazanırken bile, PCR, kütüphane hazırlama ve hedefli analizi yönlendiren vazgeçilmez motor olmaya devam etmektedir. Bu bölümde ayrıntılı olarak açıklanan stratejiler ve sorun giderme çerçeveleri, yalnızca bu analizleri gerçekleştirmek için değil, aynı zamanda moleküler mikrobiyolojinin hızla genişleyen alanında uyum sağlamak ve yenilik yapmak için gerekli temel becerileri de sağlamaktadır.

KAYNAKÇA

- Antoszewski, K., Chmielewska, K., Jagiello, K., & Puzyn, T. (2026). Designing RNA sequencing experiments: A practical guide to reproducible gene expression analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 31, 101–119. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2025.12.015>
- Bermek, O., Grindley, N. D. F., & Joyce, C. M. (2010). Distinct Roles of the Active-site Mg²⁺ Ligands, Asp882 and Asp705, of DNA Polymerase I (Klenow Fragment) during the Prechemistry Conformational Transitions. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3755. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.167593>
- Bikard, D., Loot, C., Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2010). Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(4), 570. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-10>

- Botero, L. M., D'Imperio, S., Burr, M., McDermott, T. R., Young, M., & Hassett, D. J. (2005). Poly(A) Polymerase Modification and Reverse Transcriptase PCR Amplification of Environmental RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1267. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1267-1275.2005>
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Burgmann, H. (2012). Simple Absolute Quantification Method Correcting for Quantitative PCR Efficiency Variations for Microbial Community Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4481. <https://doi.org/10.1128/AEM.07878-11>
- Broude, N. E., Zhang, L., Woodward, K., Englert, D., & Cantor, C. R. (2001). Multiplex allele-specific target amplification based on PCR suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), 206. <https://doi.org/10.1073/PNAS.98.1.206>
- Brown, D. C., & Turner, R. J. (2021). Creation of Universal Primers Targeting Nonconserved, Horizontally Mobile Genes: Lessons and Considerations. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(4), e02181-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02181-20>
- Brun, A., Rangé, H., Prouvost, B., Mazighi, M., Kapila, Y., Bouchard, P., & Michel, J. B. (2020). Innovative application of nested PCR for detection of *Porphyromonas gingivalis* in human highly calcified atherothrombotic plaques. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1742523. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1742523>

- Burke, C. R., & Lupták, A. (2018). DNA synthesis from diphosphate substrates by DNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(5), 980–985. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1712193115/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Helleman, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.112797>
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 19. <https://doi.org/10.1016/J.BDQ.2017.11.001>
- Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., & White, B. A. (1993). Polymerase chain reaction : basic protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 15, 1–30. <https://doi.org/10.1385/0-89603-244-2:1>
- Demiralay, B., & Can, T. (2025). Effective primer design for genotype and subtype detection of highly divergent viruses in large scale genome datasets. *BMC Bioinformatics* 2025 26:1, 26(1), 223-. <https://doi.org/10.1186/S12859-025-06251-9>
- Ding, R., Zhang, J., & Chen, C. (2026). The thermal cycling methods for rapid PCR. *Critical Reviews in Biotechnology*, 46(1). <https://doi.org/10.1080/07388551.2025.2540368>

- Dorawa, S., & Kaczorowski, T. (2024). Precise and Accurate DNA-3'/5- Ends Polishing with *Thermus thermophilus* Phage ν b_Tt72 DNA Polymerase. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, 25(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS252413544>
- Fan, H., Wang, J., Komiyama, M., & Liang, X. (2019). Effects of secondary structures of DNA templates on the quantification of qPCR. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 37(11), 2867–2874. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1498804>
- Golenberg, E. M., Bickel, A., & Weihs, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(24), 5026–5033. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.24.5026>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2). <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT095182>
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., Degnan, B. M., Rokhsar, D. S., & Bartel, D. P. (2008). The early origins of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, 455(7217), 10.1038/nature07415. <https://doi.org/10.1038/NATURE07415>
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*, 35(19), e127. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM671>

- Hampton, T. H., Taub, L., Ferreria-Fukutani, K., Stanton, B. A., & MacKenzie, T. A. (2025). Analyzing qPCR data: Better practices to facilitate rigor and reproducibility. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 44, 102356. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2025.102356>
- Heininger, A., Binder, M., Ellinger, A., Botzenhart, K., Unertl, K., & Döring, G. (2003). DNase Pretreatment of Master Mix Reagents Improves the Validity of Universal 16S rRNA Gene PCR Results. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1763. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1763-1765.2003>
- Hsu, B., Sherina, V., & McCall, M. N. (2020). Autoregressive modeling and diagnostics for qPCR amplification. *Bioinformatics*, 36(22–23), 5386. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAA1000>
- Hwang, I. T., Kim, Y. J., Kim, S. H., Kwak, C. Il, Gu, Y. Y., & Chun, J. Y. (2003). Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques*, 35(6), 1180–1184. <https://doi.org/10.2144/03356ST03>
- Ishino, S., & Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology – the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG), 465. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00465>
- Kalle, E., Kubista, M., & Rensing, C. (2014). Multi-template polymerase chain reaction. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2(C), 11–29. <https://doi.org/10.1016/J.BDQ.2014.11.002>

- Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2006). Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*, 40, 219. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(05\)40006-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(05)40006-2)
- Kang, K., Zhang, X., Liu, H., Wang, Z., Zhong, J., Huang, Z., Peng, X., Zeng, Y., Wang, Y., Yang, Y., Luo, J., & Gou, D. (2012). A Novel Real-Time PCR Assay of microRNAs Using S-Poly(T), a Specific Oligo(dT) Reverse Transcription Primer with Excellent Sensitivity and Specificity. *PLOS ONE*, 7(11), e48536. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048536>
- Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermod, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-131>
- Kayama, K., Kanno, M., Chisaki, N., Tanaka, M., Yao, R., Hanazono, K., Camer, G. A., & Endoh, D. (2021). Prediction of PCR amplification from primer and template sequences using recurrent neural network. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 7493-. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86357-1>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 108. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00108>
- Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 15(SUPPL. 95). <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB1510S95>

- Kreitmann, L., Miglietta, L., Xu, K., Malpartida-Cardenas, K., D'Souza, G., Kaforou, M., Brengel-Pesce, K., Drazek, L., Holmes, A., & Rodriguez-Manzano, J. (2023). Next-generation molecular diagnostics: Leveraging digital technologies to enhance multiplexing in real-time PCR. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 160, 116963. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2023.116963>
- Kumar, A., & Kaur, J. (2014). Primer Based Approach for PCR Amplification of High GC Content Gene: Mycobacterium Gene as a Model. *Molecular Biology International*, 2014, 937308. <https://doi.org/10.1155/2014/937308>
- Levin, J. D., Fiala, D., Samala, M. F., Kahn, J. D., & Peterson, R. J. (2006). Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Research*, 34(20), e142. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL756>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 63, 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2004). Real-time Fluorescent PCR Techniques to Study Microbial–Host Interactions. *Methods in*

Microbiology, 34, 255. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(04\)34010-9](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(04)34010-9)

Mamedov, T. G., Pienaar, E., Whitney, S. E., TerMaat, J. R., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A., & Viljoen, H. J. (2008). A Fundamental Study of the PCR Amplification of GC-Rich DNA Templates. *Computational Biology and Chemistry*, 32(6), 452. <https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2008.07.021>

Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51. <https://doi.org/10.1002/JCLA.2058>

Marmiroli, N., & Maestri, E. (2025). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments*, 147–187. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50007-9>

McNair, J. N., Frobish, D., Rediske, R. R., Hart, J. J., Jamison, M. N., Szlag, D. C., McNair, J. N., Frobish, D., Rediske, R. R., Hart, J. J., Jamison, M. N., & Szlag, D. C. (2025). The Theoretical Basis of qPCR and ddPCR Copy Number Estimates: A Critical Review and Exposition. *Water* 2025, Vol. 17, 17(3). <https://doi.org/10.3390/W17030381>

Millington, A. L., Houskeeper, J. A., Quackenbush, J. F., Trauba, J. M., & Wittwer, C. T. (2019). The kinetic requirements of extreme qPCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17, 100081. <https://doi.org/10.1016/J.BDQ.2019.100081>

Mo, Y., Wan, R., & Zhang, Q. (2012). Application of Reverse Transcription-PCR and Real-Time PCR in Nanotoxicity Research. *Methods in*

Molecular Biology (Clifton, N.J.), 926, 99. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_7

Munjaković, H., Povšič, K., Poljak, M., Seme, K., Gašpersič, R., & Skubic, L. (2025). Digital PCR outperforms quantitative real-time PCR for the detection and quantification of major periodontal pathobionts. *Journal of Oral Microbiology*, 17(1), 2537439. <https://doi.org/10.1080/20002297.2025.2537439>

Naqib, A., Jeon, T., Kunstman, K., Wang, W., Shen, Y., Sweeney, D., Hyde, M., & Green, S. J. (2019). PCR effects of melting temperature adjustment of individual primers in degenerate primer pools. *PeerJ*, 2019(3), e6570. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.6570/SUPP-9>

Onodera, K. (2007). Selection for 3'-End Triplets for Polymerase Chain Reaction Primers. *PCR Primer Design*, 402, 61. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_3

Owczarzy, R., You, Y., Groth, C. L., & Tataurov, A. V. (2011). Stability and Mismatch Discrimination of Locked Nucleic Acid–DNA Duplexes. *Biochemistry*, 50(43), 9352. <https://doi.org/10.1021/BI200904E>

Pai, C. C., & Kearsey, S. E. (2017). A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes* 2017, Vol. 8, 8(2). <https://doi.org/10.3390/GENES8020057>

Park, S., Rana, A., Sung, W., & Munir, M. (2021). Competitiveness of Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) Technologies, with a Particular Focus on Detection of Antibiotic Resistance Genes (ARGs). *Applied*

- Microbiology*, 1(3), 426–444.
<https://doi.org/10.3390/APPLMICROBIOL1030028/S1>
- Perumal, K., & Reddy, R. (2018). The 3' End Formation in Small RNAs. *Gene Expression*, 10(1–2), 59.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5977532/>
- Quan, P. L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(4), 1271.
<https://doi.org/10.3390/S18041271>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4280562/>
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Enrichment of poly(A)⁺ mRNA using immobilized oligo(dT). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(7). <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT5454>
- Ro, S., Park, C., Jin, J., Sanders, K. M., & Yan, W. (2006). A PCR-based Method for Detection and Quantification of Small RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), 756.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.10.105>
- Robertson, J. M., & Walsh-Weller, J. (1998). An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 98, 121–154.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-443-7:121>

- Ruiz-Villalba, A., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life*, 11(6), 496. <https://doi.org/10.3390/LIFE11060496>
- Ruiz-Villalba, A., van Pelt-Verkuil, E., Gunst, Q. D., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. (2017). Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 14, 7. <https://doi.org/10.1016/J.BDQ.2017.10.001>
- Russell, H. J., Richardson, T. T., Emptage, K., & Connolly, B. A. (2009). The 3'–5' proofreading exonuclease of archaeal family-B DNA polymerase hinders the copying of template strand deaminated bases. *Nucleic Acids Research*, 37(22), 7603. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP800>
- Sachse, K. (2004). Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular Biotechnology*, 26(1), 61–79. <https://doi.org/10.1385/MB:26:1:61>
- Schmalenberger, A., Schwieger, F., & Tebbe, C. C. (2001). Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3557. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3557-3563.2001>
- Stillman, B. (2013). Deoxynucleoside triphosphate (dNTP) synthesis and destruction regulate the replication of both cell and virus genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

of America, 110(35), 14120.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1312901110>

Takezawa, Y., Kobayashi, T., Shionoya, M., Takezawa, Y., Kobayashi, T., & Shionoya, M. (2016). The Effects of Magnesium Ions on the Enzymatic Synthesis of Ligand-Bearing Artificial DNA by Template-Independent Polymerase. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol. 17, 17(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS17060906>

Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2018.12.002>

Uelze, L., Grützke, J., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Juraschek, K., Deneke, C., Tausch, S. H., & Malorny, B. (2020). Typing methods based on whole genome sequencing data. *One Health Outlook* 2020 2:1, 2(1), 3-. <https://doi.org/10.1186/S42522-020-0010-1>

Van Heuverswyn, F., Karczmarczyk, M., Schimmel, H., Trapmann, S., & Emons, H. (2016). Influence of primer & probe chemistry and amplification target on reverse transcription digital PCR quantification of viral RNA. *Biomolecular Detection and Quantification*, 9, 20–28. <https://doi.org/10.1016/J.BDQ.2016.08.003>

Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, 1–325. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4/COVER>

- Verma, A. K., Noumani, A., Yadav, A. K., & Solanki, P. R. (2023). FRET Based Biosensor: Principle Applications Recent Advances and Challenges. *Diagnostics* 2023, Vol. 13, 13(8). <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS13081375>
- Xiang, C. C., Chen, M., Ma, L., Phan, Q. N., Inman, J. M., Kozhich, O. A., & Brownstein, M. J. (2003). A new strategy to amplify degraded RNA from small tissue samples for microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 31(9), e53. <https://doi.org/10.1093/NAR/GNG053>
- Xiong, Q., & Zhang, Y. (2023). Small RNA modifications: regulatory molecules and potential applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 16(1), 64. <https://doi.org/10.1186/S13045-023-01466-W>
- Xue, Y., Braslavsky, I., & Quake, S. R. (2021). Temperature effect on polymerase fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(5), 101270. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.101270>
- Yang, I., Kim, Y. H., Byun, J. Y., & Park, S. R. (2005). Use of multiplex polymerase chain reactions to indicate the accuracy of the annealing temperature of thermal cycling. *Analytical Biochemistry*, 338(2), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.035>
- Zhang, Y., Li, H., Shang, S., Meng, S., Lin, T., Zhang, Y., & Liu, H. (2021). Evaluation validation of a qPCR curve analysis method and conventional approaches. *BMC Genomics*, 22(Suppl 5), 680. <https://doi.org/10.1186/S12864-021-07986-4>

Zhuang, F., Fuchs, R. T., Sun, Z., Zheng, Y., & Robb, G. B. (2012). Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation. *Nucleic Acids Research*, 40(7), e54. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR1263>

BÖLÜM 5:

GENETİK MÜHENDİSLİĞİ VE KLONLAMA TEKNOLOJİLERİ

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: ozgur.celebi@atauni.edu.tr

Uzman Moleküler Biyolog Zeynep YAMAN

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: zeynep.eskentepe21@ogr.atauni.edu.tr

GİRİŞ

Moleküler biyolojinin deneysel altyapısı, genetik bilginin yalnızca tanımlanmasına değil, aynı zamanda bu bilginin kontrollü, öngörülebilir ve tekrar edilebilir biçimde işlenmesine olanak tanıyan araçların geliştirilmesiyle şekillenmiştir. Genetik materyalin yapısının anlaşılması, biyolojik işlevlerin çözümlenmesi açısından temel bir gereklilik olmakla birlikte, bu bilginin deneysel olarak yönlendirilebilmesi ve yeniden düzenlenebilmesi, moleküler biyolojide yeni metodolojik yaklaşımların ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır.

Bu doğrultuda geliştirilen rekombinant DNA teknolojileri, genetik bilginin pasif biçimde incelenen bir unsur olmaktan çıkarılarak, belirli hedefler doğrultusunda tasarlanabilir ve manipüle edilebilir bir sistem hâline gelmesini mümkün kılmıştır.

Bu dönüşümün merkezinde, DNA'nın özgül bölgelerinden kesilmesini ve elde edilen genetik fragmanların yeniden fonksiyonel bütünlük kazanacak şekilde birleştirilmesini sağlayan moleküler mekanizmalar yer almaktadır. Restriksiyon enzimleri ve DNA ligasyonu, bu mekanizmaların en temel ve en yaygın kullanılan bileşenleri olarak, modern moleküler biyoloji uygulamalarının kavramsal omurgasını oluşturmaktadır. Bu süreçler, genetik materyalin rastgele değil, önceden tanımlanmış dizisel özellikler temelinde işlenmesini mümkün kılarak deneysel müdahalelere yüksek düzeyde kontrol kazandırmaktadır. Bu yönüyle restriksiyon ve ligasyon basamakları, yalnızca teknik işlemler değil; genetik manipülasyonun mantığını belirleyen tamamlayıcı ve bütüncül süreçler olarak ele alınmalıdır.

Genetik bilginin işlenebilir hâle gelmesi, yalnızca DNA'nın kesilmesi ve yeniden birleştirilmesiyle sınırlı değildir. Oluşturulan genetik yapıların hücresel sistemler içinde taşınması, korunması ve fonksiyonel olarak ifade edilmesi, rekombinant DNA çalışmalarının ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır. Bu bağlamda vektör sistemlerinin seçimi, genetik materyalin hücrelere aktarılması ve hücresel bariyerlerin aşılmasına yönelik yaklaşımlar, deneysel başarının belirleyici unsurları arasında yer almaktadır. Kullanılan

vektörün yapısal özellikleri, konak hücre ile uyumu ve gen ifadesi üzerindeki kontrol düzeyi, elde edilen sonuçların doğruluğunu ve yorumlanabilirliğini doğrudan etkilemektedir. Benzer biçimde, genetik materyalin hücre içine aktarılmasında tercih edilen transformasyon ve transfeksiyon yöntemleri, yalnızca teknik kolaylık açısından değil, biyolojik çıktıların güvenilirliği açısından da stratejik karar noktaları olarak değerlendirilmelidir.

Bu bölümde ele alınan yaklaşımlar, rekombinant DNA teknolojilerinin birbirinden bağımsız teknik adımların toplamı olmadığını; aksine, deneysel tasarımın bütüncül bir bakış açısıyla kurgulanmasını gerektiren tutarlı bir sistem oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Restriksiyon enzimlerinin dizi özgüllüğüne dayalı etkileri, ligasyon basamağının moleküler dinamikleri, vektör sistemlerinin yapısal ve işlevsel özellikleri ile genetik materyalin hücre ortamına aktarılmasına yönelik stratejiler, deneysel sürecin farklı aşamalarında birbirini tamamlayan unsurlar olarak değerlendirilmelidir. Bu çerçevede moleküler klonlama, rastlantısal sonuçlara dayanan bir uygulama alanı olmaktan ziyade; biyolojik özgüllük, yapısal uyum ve deneysel kontrol ilkeleri üzerine inşa edilmiş, öngörülebilir ve yönlendirilebilir bir yaklaşım olarak ele alınmaktadır.

5.1. Restriksiyon Enzimlerinin Biyolojik Kökeni ve Savunma Mantiğı

Restriksiyon enzimlerinin moleküler biyolojide vazgeçilmez araçlar hâline gelmesi, bu enzimlerin biyolojik kökeninin ve işlevsel mantığının anlaşılmasıyla doğrudan ilişkilidir. Prokaryotik

organizmalar, özellikle bakteriyofaj kaynaklı DNA'nın hücre içine girişi sırasında genom bütünlüğünü tehdit eden unsurlara karşı seçici savunma stratejileri geliştirmiştir. Bu stratejiler, hücrenin kendi genetik materyali ile yabancı DNA arasında ayırım yapabilmesini sağlayan moleküler tanıma mekanizmalarına dayanmaktadır. Bu savunma yaklaşımı, yalnızca yabancı DNA'nın parçalanmasını değil, aynı zamanda konak genomunun bu süreçten korunmasını da kapsayan dengeli bir sistem olarak işlev görür. Restriksiyon–modifikasyon mekanizması olarak adlandırılan bu yapı, restriksiyon endonükleazlar ve DNA metilasyonu gibi koruyucu modifikasyon süreçlerinin eşgüdümlü çalışmasına dayanır. Bu bütüncül yapı sayesinde hücre, genom bütünlüğünü korurken genetik istilalara karşı etkili bir savunma geliştirebilmektedir (Lodish et al., 2007).

Bu biyolojik mekanizmanın deneysel ortama uyarlanması, restriksiyon enzimlerinin kontrollü DNA manipülasyonunda neden bu denli güvenilir araçlar sunduğunu açıklamaktadır. Doğal bağlamda savunma amacıyla evrimleşmiş olan bu enzimatik sistem, laboratuvar ortamında hedefe yönelik kesim yapılabilmesini mümkün kılarak rekombinant DNA teknolojilerinin temelini oluşturmuştur. Bu durum, restriksiyon enzimlerinin yalnızca biyolojik savunma unsurları değil, aynı zamanda deneysel tasarımın yönlendirici bileşenleri olarak değerlendirilmesini gerektirir (Lodish et al., 2007).

Bu perspektif, restriksiyon enzimlerinin moleküler biyolojide rastlantısal araçlar değil, öngörülebilir ve planlanabilir genetik

müdahalelerin temelini oluşturan sistemler olduğunu ortaya koymaktadır.

5.1.1. Restriksiyon Enzimlerinin Sınıflandırılması ve Deneysel İşlevsellik

Restriksiyon endonükleazların sınıflandırılması, yalnızca biyokimyasal özelliklerin tanımlanmasına yönelik bir ayrım değildir; aynı zamanda bu enzimlerin deneysel uygulamalarda sunduğu kontrol düzeyinin anlaşılması açısından da kritik öneme sahiptir. Farklı restriksiyon enzim sınıfları, DNA'yı tanıma ve kesme biçimleri bakımından belirgin farklılıklar gösterir ve bu farklılıklar, klonlama stratejilerinin tasarımını doğrudan etkiler (Brown, 2016; Watson et al., 2013).

Tip I ve Tip III restriksiyon enzimleri, tanıma dizilerine bağlandıktan sonra kesimi bu dizilerden belirli bir mesafede gerçekleştirmeleriyle karakterizedir. Bu enzimlerin ATP gibi ek kofaktörlere ihtiyaç duyması ve kesim noktalarının öngörülemez olması, deneysel uygulamalarda yüksek düzeyde kontrol sağlamalarını güçleştirir. Bu nedenle söz konusu enzim sınıfları, moleküler klonlama çalışmalarında sınırlı kullanım alanına sahiptir (Brown, 2016). Buna karşılık Tip II restriksiyon enzimleri, tanıdıkları DNA dizilerinin üzerinde veya hemen yakınında kesim yapmalarıyla yüksek derecede öngörülebilir bir davranış sergiler. Kesim noktalarının bu şekilde net biçimde tanımlanabilir olması, elde edilecek DNA fragmanlarının boyut ve uç özelliklerinin deney öncesinde planlanabilmesini mümkün

kılar. Bu özellik, klonlama deneylerinde hem hata olasılığını azaltmakta hem de deneysel tekrar edilebilirliği artırmaktadır (Watson et al., 2013).

Tip II restriksiyon enzimlerinin yaygın tercih edilmesinin bir diğer nedeni, çoğunlukla ek enerji kaynaklarına gereksinim duymadan çalışabilmeleridir. Basit tampon sistemleri içinde yüksek özgüllikle işlev gösterebilmeleri, bu enzimleri standart laboratuvar protokolleriyle uyumlu hâle getirir. Bu durum, Tip II restriksiyon enzimlerini deneysel güvenilirlik ve pratik uygulanabilirlik açısından rekombinant DNA teknolojilerinin merkezine yerleştirmektedir (Brown, 2016). Bu sınıflandırma, restriksiyon enzimi seçiminin yalnızca tanıma dizisine göre değil, deneysel kontrol ihtiyacı ve downstream uygulamalar dikkate alınarak yapılması gerektiğini göstermektedir.

5.1.2. Tanıma Dizileri, Palindromik Yapılar ve Moleküler Özgülük

Restriksiyon enzimlerinin DNA üzerindeki seçici etkisi, tanıma dizileri ile enzim yapısı arasındaki yüksek derecede uyuma dayanmaktadır. Bu özgülük, genom üzerinde rastlantısal kesimlerin önlenmesini sağlayarak genetik materyalin kontrollü biçimde işlenmesine olanak tanır. Özellikle Tip II restriksiyon enzimlerinde gözlenen bu hassasiyet, kısa ve tanımlı DNA dizilerinin tanınmasına dayanmakta olup, deneysel güvenilirliğin temel belirleyicilerinden biri olarak kabul edilmektedir (Watson et al., 2013).

Tanıma dizilerinin önemli bir bölümü palindromik özellik taşımaktadır. Palindromik diziler, çift iplikli DNA'nın her iki ipliğinde de 5'ten 3'e doğru okunduğunda aynı dizisel düzenin korunmasıyla karakterizedir. Bu simetrik yapı, restriksiyon enzimlerinin çoğunlukla

dimerik ya da multimerik organizasyon göstermesiyle doğrudan ilişkilidir. Enzim alt birimlerinin DNA'ya eş zamanlı ve dengeli biçimde bağlanabilmesi, palindromik diziler sayesinde moleküler düzeyde optimize edilmiş bir etkileşim yüzeyi oluşturur (Watson et al., 2013).

Bu yapısal uyum, restriksiyon enzimlerinin yalnızca tanıma dizisine bağlanmasını değil, aynı zamanda kesim noktasının hassas biçimde konumlandırılmasını da mümkün kılar. Tanıma dizisinin uzunluğu ve nükleotid bileşimi, enzimin bağlanma kinetiğini ve kesim verimliliğini etkileyen parametreler arasında yer alır. Daha uzun ve daha özgül dizilerin tanınması, genom üzerinde yanlış hedefleme olasılığını azaltarak deneysel doğruluğu artırır (Brown, 2016). Bu özellik, restriksiyon enzimlerinin deneysel tasarımda neden “öngörülebilirlik” kavramıyla birlikte ele alındığını açıklamaktadır. Tanıma dizisinin yapısal özellikleri, yalnızca kesim aşamasını değil, downstream klonlama ve doğrulama basamaklarının güvenilirliğini de doğrudan etkilemektedir. Palindromik tanıma dizilerinin sağladığı bir diğer avantaj, DNA fragmanlarının uç yapılarının önceden tahmin edilebilir olmasıdır. Kesim sonrası oluşan uçların özellikleri, ligasyon ve klonlama stratejilerinin planlanmasında doğrudan kullanılır. Bu durum, restriksiyon enzimlerinin yalnızca kesim araçları değil, aynı zamanda deneysel akışı yönlendiren tasarım unsurları olarak değerlendirilmesini gerekli kılar.

Bu çerçevede tanıma dizileri ve palindromik yapıların moleküler düzeyde anlaşılması, restriksiyon enzimlerinin sunduğu

özgüllüğün neden bu denli yüksek olduğunu açıklamaktadır. Bu özgüllük, genetik materyalin hedefe yönelik biçimde düzenlenebilmesini mümkün kılarak modern moleküler biyoloji uygulamalarının temel dayanaklarından biri hâline gelmiştir (Brown, 2016; Watson et al., 2013).

5.1.3. DNA Kesim Tipleri: Yapışkan ve Küt Uçların Yapısal ve Deneysel Sonuçları

Restriksiyon enzimleri tarafından gerçekleştirilen DNA kesimleri sonucunda ortaya çıkan uç yapıları, ligasyon basamağının verimliliğini ve yönünü belirleyen temel yapısal unsurlar arasında yer almaktadır. Bu bağlamda restriksiyon sindirimi ürünleri, tek iplikli çıkıntılar içeren yapışkan (kohezif) uçlar ve herhangi bir çıkıntı içermeyen küt (blunt) uçlar olmak üzere iki ana grupta değerlendirilir. Bu ayrım, yalnızca yapısal bir sınıflandırma değil; klonlama stratejisinin deneysel başarısını doğrudan etkileyen işlevsel bir parametre olarak ele alınmalıdır (Brown, 2016; Watson et al., 2013).

Yapışkan uçlar, DNA'nın asimetrik olarak kesilmesi sonucu kısa tek iplikli çıkıntıların oluşmasıyla meydana gelir. Bu çıkıntılar, tamamlayıcı baz eşleşmelerine izin vererek ligasyon öncesinde DNA fragmanları arasında geçici ancak özgül etkileşimlerin kurulmasını sağlar. Bu ön hizalanma durumu, ligaz enziminin substratları daha etkin biçimde bir araya getirmesine olanak tanır ve ligasyon reaksiyonlarının kinetik açıdan avantajlı ilerlemesini destekler (Green & Sambrook, 2012). Bu ön hizalanma özelliği, yapışkan uçların neden düşük DNA konsantrasyonlarında dahi yüksek ligasyon verimi sağlayabildiğini

açıklamaktadır. Dolayısıyla yapışkan uçlar, özellikle hassas klonlama deneylerinde deneysel hataları azaltan stratejik bir avantaj sunar.

Küt uçlar ise DNA'nın her iki ipliğinin aynı nükleotid pozisyonundan kesilmesiyle oluşur ve tek iplikli çıkıntı içermez. Bu yapısal özellik, DNA fragmanları arasında baz eşleşmesine dayalı bir ön etkileşimin gerçekleşmesini engeller. Sonuç olarak küt uç ligasyonları, yapışkan uçlara kıyasla daha düşük bağlanma olasılığına sahiptir ve reaksiyon koşullarının daha dikkatli optimize edilmesini gerektirir (Primrose et al., 2001). Bununla birlikte küt uçların sunduğu deneysel esneklik göz ardı edilmemelidir. Farklı restriksiyon enzimleriyle elde edilmiş DNA fragmanlarının birbiriyle uyumlu biçimde ligatlanabilmesi, belirli klonlama senaryolarında küt uçları vazgeçilmez hâle getirebilir. Bu durum, küt uçların düşük verim dezavantajına rağmen, stratejik kullanım alanlarına sahip olduğunu göstermektedir (Brown, 2016).

Bu bağlamda uç tipi seçimi, yalnızca ligasyon verimine değil, deneyin genel tasarım hedeflerine göre değerlendirilmelidir. Yüksek verim gerektiren uygulamalar ile esneklik gerektiren deneyler arasında yapılan bu tercih, klonlama stratejisinin rasyonel biçimde planlanmasını sağlar. Uç tipleri arasındaki yapısal farklılıklar, klonlama stratejisinin yönlülüğünü de doğrudan etkiler. Yapışkan uçlar, tamamlayıcı dizilerin seçici eşleşmesi sayesinde yönlendirilmiş ligasyon yaklaşımlarında avantaj sağlarken; küt uçlar, daha geniş kombinasyonlara izin vererek alternatif genetik yapıların oluşturulmasına olanak tanır. Bu nedenle uç tipi seçimi, downstream

uygulamalar ve doğrulama stratejileri dikkate alınarak bilinçli biçimde yapılmalıdır.

Bu bağlamda DNA kesim tipleri, restriksiyon enzimlerinin moleküler etkilerinin ligasyon ve klonlama süreçlerine nasıl yansıdığını ortaya koymaktadır. Yapışkan ve küt uçların yapısal özelliklerinin ve deneysel sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi, rekombinant DNA çalışmalarında yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik elde edilmesinin temel koşullarından biri olarak değerlendirilmektedir (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012).

5.1.4. DNA Ligasyonu: Ligaz Enzimlerinin Mekanizması ve Reaksiyon Dinamikleri

DNA ligasyonu, restriksiyon sindirimi sonrasında oluşan kopuk DNA uçlarının yeniden birleştirilmesini sağlayan ve rekombinant DNA teknolojilerinin işlevsel bütünlüğünü tamamlayan çok basamaklı bir enzimatik süreçtir. Bu süreçte DNA ligaz enzimleri, DNA fragmanları arasında yeni fosfodiester bağlarının kurulmasını katalizleyerek genetik materyalin sürekliliğini yeniden tesis eder. Ligasyonun başarısı, yalnızca DNA uçlarının fiziksel olarak bir araya gelmesine değil, ligaz enziminin katalitik çevriminin uygun koşullarda gerçekleşmesine de bağlıdır (Brown, 2016; Lehman, 1974).

ATP bağımlı DNA ligazların katalitik mekanizması, ardışık ve düzenlenmiş reaksiyon basamakları üzerinden ilerler. İlk aşamada ligaz enzimi, ATP kullanarak kendi üzerinde geçici bir adenilasyon oluşturur. Bunu takiben adenil grubunun DNA'nın 5' fosfat ucuna aktarılması gerçekleşir ve son basamakta 3' hidroksil grubunun nükleofilik saldırısı

ile fosfodiester bağıının oluşumu tamamlanır. Bu çok aşamalı mekanizma, ligasyon reaksiyonlarının uç tipi ve reaksiyon koşullarına duyarlı olmasının temel biyokimyasal nedenini oluşturur (Lehman, 1974). Bu katalitik çevrim, ligasyon veriminin yalnızca enzim varlığıyla değil, reaksiyon ortamının kinetik ve yapısal uygunluğuyla belirlendiğini göstermektedir. Dolayısıyla ligasyon, pasif bir “birleştirme” adımı değil, hassas biçimde optimize edilmesi gereken aktif bir kontrol noktasıdır.

Ligasyon verimliliği üzerinde DNA uçlarının yapısal özellikleri belirleyici bir rol oynar. Yapışkan uçlara sahip DNA fragmanları, tamamlayıcı baz eşleşmeleri sayesinde geçici ancak stabil kompleksler oluşturur. Bu ön hizalanma, ligaz enziminin substratlara erişimini kolaylaştırarak reaksiyonun daha düşük enerji bariyerleriyle ilerlemesini sağlar. Buna karşılık küt uç ligasyonlarında bu tür bir moleküler ön hizalanma bulunmadığından, reaksiyon kinetiği daha sınırlı olup daha yüksek enzim konsantrasyonları ve optimize edilmiş koşullar gerektirir (Brown, 2016).

Ligasyon sürecinin başarısı yalnızca enzimatik mekanizmaya indirgenemez; deneysel tasarımın bütününe entegre edilen parametrelerin uyumu da kritik öneme sahiptir. DNA fragmanlarının molar oranları, ligaz miktarı, inkübasyon süresi ve tampon bileşimi, reaksiyonun yönünü ve verimini doğrudan etkileyen faktörler arasında yer alır. Bu parametrelerin rasyonel biçimde ayarlanması, yanlış ligasyon ürünlerinin ve düşük verimli reaksiyonların önüne geçilmesini sağlar (Green & Sambrook, 2012). Bu çok parametreliliği, ligasyon

basamağının klonlama sürecinde neden sık karşılaşılan bir “darboğaz” olduğunu açıklamaktadır. Ligasyon veriminin düşüklüğü, çoğu zaman restriksiyon sindiriminden değil, bu aşamadaki deneysel dengesizliklerden kaynaklanmaktadır.

Bu değerlendirme, DNA ligasyonunun restriksiyon enzimleriyle başlatılan genetik manipülasyonun tamamlanmasını sağlayan merkezi bir basamak olduğunu ortaya koymaktadır. Ligaz enzimlerinin moleküler mekanizmasının ve reaksiyon dinamiklerinin ayrıntılı biçimde anlaşılması, klonlama stratejilerinin bilinçli biçimde planlanmasına ve deneysel sonuçların güvenilirliğinin artırılmasına doğrudan katkı sağlamaktadır.

5.1.5. Klonlama ve Yönlendirilmiş Ligasyon Stratejileri

Moleküler klonlama uygulamalarında ligasyon basamağı, yalnızca DNA fragmanlarının fiziksel olarak birleştirilmesini değil, aynı zamanda hedef genin vektör içerisinde doğru konumlanmasını ve fonksiyonel olarak ifade edilebilir hâle gelmesini de belirler. Bu nedenle ligasyon stratejileri, teknik bir ayrıntıdan ziyade deneysel tasarımın yönünü tayin eden kavramsal bir unsur olarak ele alınmalıdır. Klonlama sürecinde kullanılan restriksiyon enzimleri ve oluşturulan uç tipleri, hedef genin vektöre hangi doğrulukta ve hangi yönelimle entegre edileceğini doğrudan etkiler (Green & Sambrook, 2012).

Tek bir restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirilen klonlama yaklaşımlarında, insert DNA’nın vektöre her iki yönde ligatlanabilme olasılığı bulunmaktadır. Bu durum, özellikle gen ekspresyonu gerektiren çalışmalarda fonksiyonel belirsizliklere yol

açabilir. Yanlış yönelimle entegre edilen genetik diziler, promotör ve düzenleyici elementlerle uyumsuz hâle gelerek hedef genin ekspresyonunu engelleyebilir. Bu nedenle tek enzimli klonlama stratejileri, ek doğrulama basamaklarını zorunlu kılan yaklaşımlar arasında yer alır (Green & Sambrook, 2012). Bu çok parametrelili yapı, ligasyon basamağının klonlama sürecinde neden sık karşılaşılan bir “darboğaz” olduğunu açıklamaktadır. Ligasyon veriminin düşüklüğü, çoğu zaman restriksiyon sindiriminden değil, bu aşamadaki deneysel dengesizliklerden kaynaklanmaktadır.

Yönlendirilmiş ligasyon stratejileri, bu sorunu ortadan kaldırmaya yönelik daha kontrollü bir yaklaşım sunar. Bu stratejilerde vektör ve insert DNA, iki farklı restriksiyon enzimi kullanılarak kesilir ve uç yapıları birbirinden ayırt edilebilir hâle getirilir. Böylece hedef DNA’nın vektöre yalnızca tek bir yönde ligatlanması mümkün olur. Bu yaklaşım, klonlama doğruluğunu artırırken vektörün kendi üzerine ligatlanma olasılığını da belirgin biçimde azaltır (Brown, 2016). Yönlendirilmiş ligasyonun sağladığı bir diğer avantaj, downstream analizlerin daha öngörülebilir hâle gelmesidir. Doğru yönelimle elde edilen rekombinant yapılar, ekspresyon analizleri, fonksiyonel çalışmalar ve doğrulama deneyleri için güvenilir bir başlangıç noktası oluşturur. Bu durum, deneysel zaman ve kaynak kullanımının daha verimli planlanmasına katkı sağlar. Bu bağlamda yönlendirilmiş ligasyon, yalnızca teknik bir optimizasyon değil, deneysel belirsizliği azaltan stratejik bir tasarım tercihidir. Özellikle çok basamaklı deneysel

akışlarda bu tercih, zincirleme hata riskini önemli ölçüde düşürmektedir.

Bu çerçevede klonlama ve ligasyon stratejilerinin seçimi, deneysel tasarımın bütüncül başarısını belirleyen kritik bir karar noktası olarak değerlendirilmektedir. Restriksiyon enzimlerinin kombinasyonu, uç tipi seçimi ve ligasyon yaklaşımının bilinçli biçimde planlanması, rekombinant DNA çalışmalarında yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik elde edilmesinin temel koşulları arasında yer almaktadır (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012).

5.1.6. Ligasyon Verimini Etkileyen Faktörler ve Deneysel Sınırlılıklar

Ligasyon reaksiyonlarının başarısı, yalnızca DNA uçlarının yapısal özellikleriyle açıklanamayacak kadar çok boyutlu bir deneysel çerçeveye sahiptir. Restriksiyon sindirimiyle elde edilen DNA fragmanlarının ligaz aracılığıyla yeniden birleştirilmesi, birden fazla fizikokimyasal ve enzimatik parametrenin eş zamanlı olarak uygun koşullarda sağlanmasını gerektirir. Bu nedenle ligasyon verimi, tek bir değişkene bağlı olmayan, deneysel tasarımın bütünsel kalitesini yansıtan bir performans göstergesi olarak değerlendirilmelidir (Brown, 2016).

Ligasyon reaksiyonlarında insert ve vektör DNA'nın molar oranı, verim üzerinde belirleyici bir rol oynar. Uygun olmayan oranlarda hazırlanan reaksiyon karışımları, ya düşük ligasyon etkinliğine ya da istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına yol açabilir. Özellikle insert DNA'nın fazla olduğu koşullarda çoklu ligasyon

ürünleri ortaya çıkabilirken, vektör fazlalığı vektörün kendi üzerine ligatlanma olasılığını artırır. Bu nedenle molar oranların deneysel hedeflere göre rasyonel biçimde ayarlanması gereklidir (Green & Sambrook, 2012). Bu denge, ligasyon basamağının neden çoğu klonlama protokolünde kritik bir optimizasyon noktası olarak ele alındığını açıkça göstermektedir. Molar oranlardaki küçük sapmalar dahi, tüm deneysel akışın verimliliğini zincirleme biçimde etkileyebilmektedir.

Ligaz enziminin konsantrasyonu ve reaksiyon süresi de ligasyon etkinliğini doğrudan belirleyen faktörler arasında yer alır. Yetersiz enzim miktarı, tamamlanmamış ligasyon ürünlerine yol açarken; aşırı ligaz kullanımı özgül olmayan bağlanma olaylarının artmasına neden olabilir. Benzer şekilde inkübasyon süresinin gereğinden uzun tutulması, DNA uçlarının yeniden düzenlenmesine veya istenmeyen yapısal değişikliklerin ortaya çıkmasına zemin hazırlayabilir. Bu parametrelerin dengeli biçimde optimize edilmesi, yüksek verimli ve özgül ligasyon ürünlerinin elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Lehman, 1974; Green & Sambrook, 2012).

Ligasyon verimini sınırlayan bir diğer önemli unsur, restriksiyon enzimlerinin optimal olmayan koşullarda gösterebildiği özgül olmayan kesim davranışlarıdır. Literatürde “star aktivitesi” olarak tanımlanan bu durum, tanıma dizilerinden sapmalarla sonuçlanan kesimlere yol açabilir ve ligasyon basamağında beklenmeyen DNA fragmanlarının oluşmasına neden olabilir. Bu tür artefaktlar, klonlama sürecinin sonraki aşamalarında yanlış pozitif sonuçların elde

edilmesine zemin hazırlayabilir (Brown, 2016; Watson et al., 2013). Bu durum, restriksiyon sindirimi ve ligasyon basamaklarının birbirinden bağımsız optimize edilmemesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Her iki aşamanın da tek bir deneysel bütünlük içinde değerlendirilmesi, hata kaynaklarının erken aşamada kontrol altına alınmasını sağlar.

Bu nedenle ligasyon reaksiyonlarının verimliliği, DNA uçlarının yapısı, molar oranlar, enzim konsantrasyonu ve reaksiyon koşulları arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Bu faktörlerin bilinçli biçimde kontrol edilmesi, rekombinant DNA çalışmalarında güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesini mümkün kılmaktadır.

5.1.7. Genel Değerlendirme ve Kavramsal Bağlantılar

Restriksiyon enzimleri ve DNA ligasyonu, rekombinant DNA teknolojilerinde yalnızca ardışık iki teknik basamak olarak değil, birbirini tamamlayan kavramsal bir sistem olarak değerlendirilmelidir. DNA'nın hedefe yönelik biçimde kesilmesi ve bu fragmanların kontrollü şekilde yeniden birleştirilmesi, genetik materyalin nasıl yönlendirilebilir ve öngörülebilir hâle getirildiğini açık biçimde ortaya koymaktadır. Bu bütünlük, moleküler klonlamanın rastlantısal bir süreç değil, bilinçli ve planlı bir tasarım yaklaşımı olduğunu vurgulamaktadır.

Restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerine dayalı özgüllüğü, genetik materyalin yalnızca istenilen bölgelerden işlenmesini mümkün kılarken; DNA ligazın katalitik etkinliği, bu fragmanların fonksiyonel bir bütün hâline getirilmesini sağlar. Bu iki mekanizmanın uyumu, deneysel başarının temelini oluşturur. Kesim basamağında yapılan stratejik tercihler, ligasyon verimini ve downstream uygulamaların

doğruluğunu doğrudan etkiler. Bu nedenle restriksiyon ve ligasyon süreçleri, bağımsız optimizasyon alanları olarak değil, tek bir deneysel akışın ayrılmaz bileşenleri olarak ele alınmalıdır (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012).

Bu kavramsal bütünlük, klonlama deneylerinde karşılaşılan birçok sorunun tek bir basamakta değil, kesim–ligasyon uyumsuzluğundan kaynaklandığını göstermektedir. Dolayısıyla deneysel başarısızlıkların değerlendirilmesinde süreçlerin birlikte analiz edilmesi kritik önem taşır. Bu yaklaşım, yalnızca klasik klonlama uygulamalarıyla sınırlı değildir. Restriksiyon enzimleriyle geliştirilen özgül kesim mantığı ve ligasyon temelli yeniden birleştirme stratejileri, sentetik biyoloji ve ileri genom düzenleme teknolojilerinin de teorik altyapısını oluşturmaktadır. Genetik parçaların modüler biçimde tasarlanabilmesi ve fonksiyonel yapılar hâlinde bir araya getirilebilmesi, bu temel prensiplerin genişletilmiş uygulamalarına dayanmaktadır.

5.2. Vektör Sistemleri: Ekspresyon Vektörleri, Viral Vektörler ve Kozmidler

Rekombinant DNA teknolojilerinde hedef genetik materyalin konak hücrelere aktarılması ve fonksiyonel olarak ifade edilmesi, kullanılan vektör sistemlerinin yapısal ve işlevsel özellikleriyle doğrudan ilişkilidir. Vektörler, yabancı DNA dizilerinin hücre içine taşınmasını ve bu dizilerin hücresel ortamda stabil biçimde korunmasını sağlayan moleküler araçlar olarak tanımlanır. Ancak bir vektörün deneysel başarısı, yalnızca DNA taşıma kapasitesine değil;

aynı zamanda konak uyumu, ekspresyon kontrolü ve biyogüvenlik gibi çok sayıda parametrenin birlikte değerlendirilmesine bağlıdır (Brown, 2016; Watson et al., 2013; Clark & Pazdernik, 2016; Glick et al., 2010).

Vektör sistemlerinin gelişimi, genetik mühendisliğinde deneysel kontrol ihtiyacının artmasıyla paralel olarak ilerlemiştir. Erken dönem klonlama çalışmalarında temel taşıyıcılar olarak kullanılan plazmid ve kozmidler, zamanla daha karmaşık düzenleyici elementler ve seçici marker sistemleriyle donatılmıştır. Bu evrimsel süreç, vektörlerin yalnızca pasif taşıyıcılar olmaktan çıkarak, gen ekspresyonunu yönlendiren aktif düzenleyici platformlar hâline gelmesini sağlamıştır (Primrose et al., 2001; Old & Primrose, 1994; Lewin, 2008). Bu dönüşüm, vektör seçiminin deneysel tasarımda “yardımcı bir araç” değil, deneyin sonucunu belirleyen stratejik bir karar noktası olduğunu ortaya koymaktadır. Yanlış seçilen bir vektör, doğru tasarlanmış bir genetik yapının dahi fonksiyonel olarak ifade edilememesine yol açabilir (Brown, 2016).

Modern moleküler biyoloji uygulamalarında kullanılan vektör sistemleri, hedef hücre tipi ve deneysel amaçlara göre çeşitlilik göstermektedir. Bakteriyel ekspresyon vektörleri, yüksek verimli protein üretimi için tercih edilirken; viral vektörler, ökaryotik hücrelerde stabil ve etkili gen aktarımı sağlama avantajı sunar. Kozmidler ve türevleri ise daha büyük DNA fragmanlarının taşınmasına olanak tanıyarak genomik kütüphane oluşturma gibi özel uygulamalarda önemli rol oynar (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002; Lodish et al., 2022).

Vektör sistemlerinin sunduğu bu çeşitlilik, deneysel esneklik sağlamakla birlikte, aynı zamanda yöntem seçimini daha karmaşık hâle getirmektedir. Her vektör tipi, taşıma kapasitesi, ekspresyon kontrolü, hücresel toksisite ve güvenlik profili açısından kendine özgü sınırlılıklar barındırır. Bu nedenle vektör seçimi, yalnızca teknik uygunluk temelinde değil; deneysel hedefler, downstream analizler ve uzun vadeli uygulamalar dikkate alınarak bütüncül biçimde değerlendirilmelidir (Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016). Bu bütüncül yaklaşım, vektör sistemlerinin deneysel tasarımda neden “tek başına yeterli” çözümler sunmadığını ve her vektörün belirli bağlamlarda avantaj veya dezavantaj oluşturduğunu açıklamaktadır (Watson et al., 2013).

Bu çerçevede vektör sistemleri, rekombinant DNA teknolojilerinde genetik bilginin hücresel ortama aktarılmasını sağlayan temel araçlar olmanın ötesinde, gen ekspresyonunun kontrolünü ve deneysel sonuçların öngörülebilirliğini belirleyen stratejik bileşenler olarak değerlendirilmektedir. Bu bölümde vektör tiplerinin yapısal özellikleri, kullanım alanları ve deneysel sınırlılıkları, moleküler biyoloji perspektifinden ayrıntılı biçimde ele alınmaktadır (Lewin, 2008; Glick et al., 2010).

5.2.1. Vektör Kavramı ve Temel Yapısal Bileşenler

Vektör kavramı, moleküler biyolojide yabancı DNA dizilerinin konak hücrelere taşınmasını ve bu dizilerin hücresel ortamda çoğaltılmasını mümkün kılan genetik araçları ifade etmektedir. Ancak bir DNA molekülünün vektör olarak işlev görebilmesi, yalnızca taşıyıcı

bir yapı olmasının ötesinde, belirli yapısal ve fonksiyonel bileşenleri bünyesinde barındırmasını gerektirir. Bu bileşenler, vektörün hücre içinde stabil biçimde korunmasını, seçici olarak çoğaltılmasını ve hedef genin kontrollü biçimde ifade edilmesini mümkün kılar (Brown, 2016; Watson et al., 2013; Glick et al., 2010; Ausubel et al., 2002).

Bir vektörün temel yapısal unsurlarından ilki replikasyon başlangıç noktasıdır (origin of replication, ori). Ori dizisi, vektör DNA'sının konak hücre içerisinde bağımsız olarak çoğaltılabilmesini sağlar ve kopya sayısını doğrudan etkiler. Yüksek kopya sayısına sahip vektörler, genellikle yüksek DNA verimi sağlarken; düşük kopya sayılı vektörler, büyük DNA fragmanlarının daha stabil biçimde taşınmasına olanak tanır. Bu özellik, vektör seçiminin deneysel hedeflere göre neden dikkatle yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır (Primrose et al., 2001; Old & Primrose, 1994).

Replikasyon kontrolü, vektörün yalnızca çoğaltılabilirliğini değil, aynı zamanda hücresel yükü ve genetik stabiliteyi de belirler. Bu nedenle ori seçimi, deneysel verim ile hücresel tolerans arasında denge kurulmasını gerektirir (Clark & Pazdernik, 2016). Vektörlerin bir diğer temel bileşeni seçici marker genleridir. Antibiyotik direnç genleri gibi markerlar, yalnızca vektörü taşıyan hücrelerin seçilmesine olanak tanıyarak rekombinant hücre popülasyonlarının tanımlanmasını sağlar. Bu seçici basamak, klonlama sürecinde istenmeyen arka plan hücrelerinin elimine edilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002).

Buna ek olarak çoklu klonlama bölgesi (multiple cloning site, MCS), vektörlerin deneysel esnekliğini belirleyen önemli bir yapısal unsurdur. MCS, birden fazla restriksiyon enzimi için tanıma dizileri içeren kısa bir DNA bölgesi olup, hedef genin farklı stratejilerle vektöre entegre edilmesine olanak tanır. Bu yapı, klonlama tasarımında yönlendirilmiş ligasyon ve alternatif kesim kombinasyonlarının uygulanabilmesini mümkün kılar (Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016).

MCS'nin sunduğu bu esneklik, vektörlerin “tek kullanımlık” araçlar olmaktan çıkıp, farklı deneysel senaryolara uyarlanabilir modüler platformlar hâline gelmesini sağlamaktadır (Lewin, 2008). Ekspresyon amaçlı kullanılan vektörlerde, bu temel bileşenlere ek olarak promotörler, ribozom bağlanma bölgeleri ve terminatör dizileri gibi düzenleyici elementler yer alır. Bu diziler, hedef genin transkripsiyonel ve translasyonel kontrolünü sağlayarak gen ürününün miktarını ve zamanlamasını belirler. Düzenleyici elementlerin seçimi, özellikle protein ekspresyonu ve fonksiyonel analizlerde deneysel başarının kritik belirleyicilerinden biridir (Watson et al., 2013; Lodish et al., 2022).

Bu bağlamda vektör kavramı, yalnızca DNA taşıma işleviyle sınırlı olmayan, çok bileşenli ve fonksiyonel bir sistem olarak ele alınmalıdır. Vektörün yapısal bileşenlerinin bilinçli biçimde seçilmesi ve deneysel hedeflerle uyumlu hâle getirilmesi, rekombinant DNA çalışmalarında güvenilir, tekrarlanabilir ve öngörülebilir sonuçların

elde edilmesini mümkün kılmaktadır (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012; Glick et al., 2010).

5.2.2. Ekspresyon Vektörleri ve Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Ekspresyon vektörleri, hedef genetik dizilerin yalnızca konak hücreye aktarılmasını değil, aynı zamanda bu dizilerin kontrollü ve ölçülebilir biçimde ifade edilmesini sağlayan özel olarak tasarlanmış vektör sistemleridir. Bu vektörler, klasik klonlama vektörlerinden farklı olarak gen ifadesini yönlendiren düzenleyici elementleri bünyesinde barındırır ve bu yönüyle fonksiyonel gen ürünlerinin elde edilmesinde merkezi bir rol üstlenir. Dolayısıyla ekspresyon vektörleri, DNA taşıyıcıları olmaktan ziyade gen regülasyonunun deneysel olarak manipüle edildiği platformlar olarak değerlendirilmelidir (Brown, 2016; Watson et al., 2013; Clark & Pazdernik, 2016; Glick et al., 2010).

Ekspresyon vektörlerinin temel belirleyici unsurlarından biri promotör dizileridir. Promotörler, RNA polimerazın bağlanmasını ve transkripsiyonun başlatılmasını sağlayarak gen ifadesinin zamanlamasını ve şiddetini belirler. Güçlü promotörler yüksek düzeyde gen ekspresyonu sağlarken, indüklenebilir promotör sistemleri gen ifadesinin deneysel koşullara bağlı olarak kontrol edilmesine olanak tanır. Bu özellik, özellikle toksik proteinlerin üretimi veya zamana bağlı ekspresyon analizleri açısından önemli bir avantaj sunar (Primrose et al., 2001; Gossen & Bujard, 1992; Lewin, 2008). Promotör seçimi, gen ifadesinin yalnızca miktarını değil, hücresel stres düzeyini ve protein katlanma verimliliğini de etkileyen kritik bir parametredir. Bu nedenle

yüksek ekspresyon her zaman deneysel olarak en uygun sonuç anlamına gelmemektedir (Brown, 2016).

Ekspresyon vektörlerinde gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan bir diğer önemli unsur ribozom bağlanma bölgeleri (RBS) ve translasyon başlangıç sinyalleridir. Bu diziler, mRNA'nın ribozom tarafından ne kadar etkin tanınacağını belirleyerek protein sentez hızını doğrudan etkiler. Transkripsiyonel kontrol ile translasyonel kontrolün birlikte optimize edilmesi, hedef gen ürününün fonksiyonel ve çözünür biçimde elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Watson et al., 2013; Lodish et al., 2022; Ausubel et al., 2002).

Buna ek olarak terminatör dizileri, transkripsiyonun doğru noktada sonlandırılmasını sağlayarak istenmeyen uzamış transkriptlerin oluşmasını engeller. Terminasyon verimliliği, mRNA stabilitesi ve downstream genlerin etkilenmemesi açısından önem taşır. Bu nedenle ekspresyon vektörlerinin tasarımında terminatör seçimi, promotör ve RBS kadar dikkatle ele alınması gereken bir bileşendir (Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016; Glick et al., 2010). Bu düzenleyici elementlerin birlikte değerlendirilmesi, gen ifadesinin tek bir kontrol noktasına indirgenemeyeceğini göstermektedir. Başarılı bir ekspresyon stratejisi, transkripsiyonel ve translasyonel kontrol mekanizmalarının dengeli biçimde kurgulanmasını gerektirir (Lewin, 2008).

Ekspresyon vektörleri ayrıca konak hücreye özgü düzenleyici elementler içerecek şekilde özelleştirilebilir. Prokaryotik ve ökaryotik sistemler arasında promotör yapıları, translasyon başlangıç

sinyalleri ve düzenleyici protein etkileşimleri bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle ekspresyon vektörlerinin konak hücreyle uyumlu biçimde tasarlanması, gen ifadesinin verimliliği ve doğruluğu açısından belirleyici bir faktördür (Green & Sambrook, 2012; Lodish et al., 2022; Watson et al., 2013).

Bu değerlendirme, ekspresyon vektörlerinin rekombinant DNA çalışmalarında yalnızca genetik bilginin aktarılmasını değil, bu bilginin nasıl, ne zaman ve ne ölçüde ifade edileceğinin deneysel olarak kontrol edilmesini mümkün kıldığını göstermektedir. Düzenleyici elementlerin bilinçli biçimde seçilmesi ve optimize edilmesi, fonksiyonel gen ürünlerinin elde edilmesinde güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların temelini oluşturmaktadır (Brown, 2016; Primrose et al., 2001; Clark & Pazdernik, 2016).

5.2.3. Viral Vektörler ve Gen Aktarımında Kullanımları

Viral vektörler, doğal olarak hücrelere genetik materyal aktarma yeteneğine sahip virüslerin bu özelliklerinden yararlanılarak geliştirilmiş gen aktarım sistemleridir. Moleküler biyolojide viral vektörlerin kullanımı, özellikle ökaryotik hücrelerde yüksek aktarım verimliliği ve stabil gen ekspresyonu sağlama potansiyeli nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Ancak bu sistemler, yalnızca yüksek etkinlikleriyle değil; aynı zamanda biyogüvenlik, kontrol edilebilirlik ve deneysel sınırlılıklarıyla birlikte değerlendirilmesi gereken karmaşık araçlar olarak ele alınmalıdır (Brown, 2016; Watson et al., 2013; Walther & Stein, 2000).

Viral vektörlerin temel avantajı, konak hücre zarlarını aşma ve genetik materyali hücre içine etkin biçimde iletme kapasiteleridir. Retroviral, lentiviral, adenoviral ve adeno-ilişkili viral (AAV) vektörler, bu amaçla en yaygın kullanılan sistemler arasında yer almaktadır. Her bir viral vektör tipi, genom entegrasyonu, ekspresyon süresi ve konak hücre aralığı açısından farklı özellikler sergiler. Bu çeşitlilik, viral vektörlerin farklı deneysel ve terapötik senaryolara uyarlanabilmesini mümkün kılmaktadır (Primrose et al., 2001; Thomas et al., 2003; Kay, 2011). Bu noktada viral vektör seçimi, yalnızca aktarım verimine göre değil; genetik materyalin geçici mi yoksa kalıcı mı ifade edilmesinin hedeflendiği dikkate alınarak yapılmalıdır.

Retroviral ve lentiviral vektörler, genetik materyalin konak genomuna entegre olabilmesi sayesinde uzun süreli ve stabil gen ekspresyonu sağlar. Bu özellik, özellikle hücre soylarının oluşturulması ve uzun vadeli fonksiyonel çalışmalar açısından avantaj sunar. Bununla birlikte genom entegrasyonu, hedef dışı mutasyonlar ve genetik instabilite riskini de beraberinde getirir. Bu nedenle bu vektörlerin kullanımı, deneysel fayda ile potansiyel riskler arasında dikkatli bir denge kurulmasını gerektirir (Brown, 2016; Naldini, 2015).

Adenoviral ve AAV tabanlı vektörler ise genellikle konak genomuna entegre olmadan episomal olarak varlık gösterir. Bu durum, geçici fakat yüksek düzeyli gen ekspresyonu sağlarken, genom entegrasyonuna bağlı risklerin azaltılmasına olanak tanır. Ancak ekspresyon süresinin sınırlı olması ve bağışıklık yanıtlarının tetiklenebilmesi, bu sistemlerin deneysel kullanımında göz önünde

bulundurulması gereken önemli sınırlılıklar arasında yer almaktadır (Watson et al., 2013; Kay, 2011; Green & Sambrook, 2012).

Bu özellikler, viral vektörlerin “tek tip” çözümler sunmadığını; aksine her bir sistemin belirli deneysel bağlamlarda avantaj veya dezavantaj oluşturduğunu göstermektedir. Dolayısıyla viral vektörler, deneysel tasarımın merkezinde yer alan stratejik araçlar olarak değerlendirilmelidir (Clark & Pazdernik, 2016). Viral vektörlerin gen aktarımında kullanımı, yüksek verimlilik sağlamasına karşın biyogüvenlik önlemlerini zorunlu kılar. Replikasyon yeteneğinin ortadan kaldırılması, patojenite riskinin azaltılması ve uygun laboratuvar güvenlik düzeylerinin sağlanması, bu sistemlerin sorumlu kullanımının temel koşulları arasında yer almaktadır (Green & Sambrook, 2012; Walther & Stein, 2000).

Bu çerçevede viral vektörler, gen aktarımında sundukları yüksek etkinlik nedeniyle moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Bununla birlikte bu sistemlerin kullanımı, deneysel hedefler, güvenlik gereklilikleri ve uzun vadeli etkiler dikkate alınarak bütüncül biçimde değerlendirilmelidir. Bu yaklaşım, viral vektörlerin sunduğu avantajların bilimsel olarak güvenilir ve kontrollü biçimde kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Brown, 2016; Primrose et al., 2001; Thomas et al., 2003).

5.2.4. Kozmidler ve Büyük DNA Fragmanlarının Taşınması

Kozmidler, plazmid vektörlerin replikasyon ve seçici marker özellikleri ile bakteriyofaj kökenli cos dizilerinin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuş hibrit vektör sistemleridir. Bu özgün yapı,

klasik plazmid vektörlerin taşıma kapasitesinin ötesine geçilmesini mümkün kılarak daha büyük DNA fragmanlarının konak hücrelere aktarılmasını sağlar. Bu nedenle kozmidler, genomik kütüphane oluşturma ve büyük genetik bölgelerin klonlanması gibi uygulamalarda önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir (Primrose et al., 2001; Old & Primrose, 1994; Brown, 2016).

Kozmidlerin temel avantajı, yaklaşık 35–45 kb büyüklüğündeki DNA fragmanlarını stabil biçimde taşıyabilmeleridir. Bu kapasite, özellikle gen kümeleri, düzenleyici bölgeler ve geniş genomik segmentlerin bütüncül olarak incelenmesi gereken çalışmalarda önemli bir esneklik sunar. Plazmidlere kıyasla daha büyük insertlerin klonlanabilmesi, genetik bilginin parçalanmadan analiz edilmesine olanak tanır ve genom organizasyonunun daha doğru biçimde değerlendirilmesini sağlar (Watson et al., 2013; Lewin, 2008). Bu taşıma kapasitesi, kozmidleri yalnızca “daha büyük plazmidler” olmaktan çıkararak, genomik bağlamın korunmasının kritik olduğu deneysel senaryolar için stratejik vektörler hâline getirmektedir.

Kozmidlerin hücre içine aktarımı genellikle faj paketleme sistemleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Cos dizilerinin varlığı, rekombinant DNA’nın faj kapsidleri içine paketlenmesine izin vererek bakteriyel hücrelere yüksek verimlilikle aktarılmasını sağlar. Bu mekanizma, büyük DNA fragmanlarının hücre içine girişinde karşılaşılan fiziksel sınırlılıkların aşılmasına katkıda bulunur. Ancak bu avantaj, aynı zamanda belirli boyut aralıklarının korunmasını zorunlu

kılar; çok küçük veya çok büyük DNA parçaları etkin biçimde paketlenemez (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002).

Kozmid sistemlerinin önemli sınırlılıklarından biri, ökaryotik ekspresyon için doğrudan uygun olmamalarıdır. Kozmidler, temel olarak prokaryotik konak sistemlerine yönelik tasarlanmış olup, gen ifadesinin düzenlenmesi açısından sınırlı düzenleyici elementler içerir. Bu nedenle kozmidler, fonksiyonel ekspresyon çalışmalarından ziyade taşıma ve klonlama amaçlı vektörler olarak değerlendirilmelidir (Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016). Bu sınırlılık, kozmid kullanımının deneysel amaca göre net biçimde tanımlanması gerektiğini göstermektedir.

Bu doğrultuda kozmidler, büyük DNA fragmanlarının stabil biçimde taşınmasını mümkün kılan özel vektör sistemleri olarak moleküler biyolojide özgün bir kullanım alanı oluşturmaktadır. Taşıma kapasitesi, faj temelli aktarım mekanizması ve genomik bütünlüğü koruma avantajları, kozmidleri özellikle genomik analiz ve kütüphane oluşturma çalışmalarında önemli bir araç hâline getirmektedir. Bununla birlikte bu sistemlerin kullanımında yapısal sınırlılıkların ve deneysel hedeflerin dikkatle değerlendirilmesi, güvenilir ve anlamlı sonuçların elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Primrose et al., 2001; Watson et al., 2013; Glick et al., 2010).

5.2.5. Vektör Sistemlerinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Moleküler biyoloji uygulamalarında kullanılan vektör sistemleri, tek tip çözümler sunmaktan ziyade farklı deneysel gereksinimlere yanıt veren özelleşmiş araçlar olarak

değerlendirilmelidir. Plazmidler, ekspresyon vektörleri, viral vektörler ve kozmidler; taşıma kapasiteleri, gen ifadesi üzerindeki kontrol düzeyleri, konak hücre uyumları ve biyogüvenlik profilleri açısından belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle vektör sistemlerinin karşılaştırmalı olarak ele alınması, deneysel tasarımın rasyonel biçimde yapılandırılması açısından temel bir gereklilik olarak ortaya çıkmaktadır (Brown, 2016; Watson et al., 2013; Clark & Pazdernik, 2016).

Plazmid ve ekspresyon vektörleri, özellikle prokaryotik sistemlerde yüksek kopya sayısı ve kolay manipülasyon avantajları nedeniyle yaygın biçimde tercih edilmektedir. Ekspresyon vektörleri, düzenleyici elementlerle donatılmış yapıları sayesinde gen ifadesinin zamanlaması ve düzeyi üzerinde yüksek kontrol sunar. Ancak bu sistemlerin taşıma kapasitesinin sınırlı olması, büyük genetik bölgelerin veya çoklu gen kümelerinin klonlanmasını güçleştirmektedir (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002).

Buna karşılık viral vektörler, ökaryotik hücrelerde yüksek gen aktarım verimliliği ve bazı sistemlerde stabil gen ekspresyonu sağlayabilmeleri nedeniyle öne çıkmaktadır. Özellikle hücre içi bariyerlerin etkin biçimde aşılabilmesi, viral vektörlerin önemli bir avantajdır. Bununla birlikte genom entegrasyonu, immün yanıtlar ve biyogüvenlik gereklilikleri, bu sistemlerin kullanımında dikkatle değerlendirilmesi gereken sınırlılıklar arasında yer almaktadır (Thomas et al., 2003; Naldini, 2015; Kay, 2011).

Kozmidler ise büyük DNA fragmanlarının taşınmasına olanak tanıyarak, genomik bütünlüğün korunmasının hedeflendiği çalışmalarda önemli bir alternatif sunar. Ancak gen ifadesinin düzenlenmesi açısından sınırlı olmaları, bu vektörleri daha çok klonlama ve taşıma amaçlı uygulamalarla sınırlar. Dolayısıyla kozmidlerin tercih edilmesi, fonksiyonel analizlerden ziyade genomik yapıların korunarak aktarılmasının hedeflendiği deneysel bağlamlarda anlam kazanmaktadır (Primrose et al., 2001; Old & Primrose, 1994; Lewin, 2008).

Bu karşılaştırma, vektör seçiminde “en güçlü sistem” arayışının çoğu zaman yanıltıcı olduğunu göstermektedir. Deneysel başarının anahtarı, vektörün teknik kapasitesinden çok, deneysel amaçlarla olan uyumunda yatmaktadır (Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016). Vektör sistemlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi, yalnızca teknik parametreler üzerinden değil, aynı zamanda downstream analizler, zaman çizelgesi ve güvenlik gereklilikleri göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Bir vektörün sağladığı avantaj, farklı bir deneysel bağlamda ciddi bir dezavantaja dönüşebilir (Watson et al., 2013; Green & Sambrook, 2012).

Bu yaklaşım doğrultusunda vektör sistemleri arasındaki farklılıkların bilinçli biçimde değerlendirilmesi, rekombinant DNA çalışmalarında güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik açısından belirleyici bir rol oynamaktadır. Karşılaştırmalı bir perspektif, deneysel hedeflere en uygun vektörün seçilmesini sağlayarak hem teknik hataların

azaltılmasına hem de deneysel kaynakların daha verimli kullanılmasına katkıda bulunmaktadır (Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016).

5.3. Transformasyon ve Transfeksiyon: Genetik Materyalin Hücrelere Aktarılma Yaklaşımları

Genetik materyalin hücre içine aktarılması, rekombinant DNA teknolojilerinin işlevsel hâle gelmesinde kritik bir basamağı temsil etmektedir. Transformasyon ve transfeksiyon kavramları, hedef DNA'nın farklı hücresel sistemlere kontrollü biçimde taşınmasını ifade eden iki temel yaklaşımı tanımlamaktadır. Bu yöntemler, kullanılan konak hücre tipi, hücresel bariyerler ve gen ifadesine yönelik beklentiler açısından birbirinden ayrılmakta; deneysel tasarımın amacına göre farklı avantaj ve sınırlılıklar sunmaktadır (Brown, 2016; Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Transformasyon terimi, genellikle bakteriyel hücrelerin dış ortamdan çıplak DNA'yı alabilme yeteneğini tanımlamak için kullanılmaktadır. Prokaryotik sistemlerde uygulanan bu yaklaşım, yüksek tekrarlanabilirlik ve teknik sadelik avantajı sunarak klonlama çalışmalarının temelini oluşturur. Buna karşılık transfeksiyon, ökaryotik hücrelerde genetik materyalin hücre içine aktarılmasını ifade eden daha karmaşık bir süreci tanımlar. Hücre zarının yapısal özellikleri ve endositoz mekanizmaları, transfeksiyon yöntemlerinin çeşitlenmesine ve optimize edilmesine neden olmuştur (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002; Freshney, 2016). Bu iki yaklaşım arasındaki temel fark, yalnızca kullanılan hücre tipinden kaynaklanmaz; aynı zamanda DNA'nın hücre içine giriş mekanizmaları

ve hücre içi kaderi açısından da belirleyicidir. Bakteriyel hücrelerde transformasyon çoğunlukla geçici membran geçirgenliğine dayanırken, ökaryotik hücrelerde transfeksiyon DNA'nın endozomal sistemlerden geçmesini ve nükleer bölgeye ulaşmasını gerektirir. Bu durum, transfeksiyon verimliliğinin transformasyona kıyasla daha değişken olmasına yol açmaktadır (Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022).

Deneysel açıdan bakıldığında, transformasyon ve transfeksiyon yöntemleri yalnızca DNA'nın hücre içine sokulmasını değil, aynı zamanda bu DNA'nın hangi süreyle ve hangi düzeyde ifade edileceğini de belirlemektedir. Bu nedenle yöntem seçimi, kısa süreli ekspresyon analizleri, stabil hücre hattı oluşturma ya da fonksiyonel protein üretimi gibi hedeflere göre bilinçli biçimde yapılmalıdır. Yanlış seçilen bir aktarım yöntemi, genetik yapının doğru tasarlanmış olmasına rağmen beklenen biyolojik çıktının elde edilememesine neden olabilir (Primrose et al., 2001; Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016).

Bu çerçevede transformasyon ve transfeksiyon, genetik materyalin hücresel ortama aktarılmasında kullanılan tamamlayıcı fakat bağlamsal olarak farklı yaklaşımlar sunmaktadır. Bu yöntemlerin moleküler temellerinin ve deneysel sınırlılıklarının anlaşılması, rekombinant DNA çalışmalarında güvenilir sonuçlar elde edilmesi açısından temel bir gereklilik olarak değerlendirilmektedir (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012; Glick et al., 2010).

5.3.1. Bakteriyel Transformasyonun Temel Prensipleri

Bakteriyel transformasyon, prokaryotik hücrelerin çevresel ortamda bulunan çıplak DNA'yı hücre içine alabilmesine dayanan bir gen aktarım yöntemidir. Bu süreç, bakteriyel hücre zarının ve hücre duvarının belirli deneysel koşullar altında geçici olarak geçirgen hâle getirilmesiyle mümkün olmaktadır. Moleküler biyolojide transformasyon, teknik sadeliği ve yüksek tekrarlanabilirliği nedeniyle rekombinant DNA çalışmalarının temel basamaklarından biri olarak kabul edilmektedir (Brown, 2016; Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Doğal koşullar altında bakterilerin DNA alım kapasitesi sınırlı olmakla birlikte, laboratuvar ortamında uygulanan kimyasal veya fiziksel işlemler bu yeteneği önemli ölçüde artırmaktadır. Hücre yüzeyindeki yük dağılımının ve membran bütünlüğünün kontrollü biçimde modifiye edilmesi, negatif yüklü DNA moleküllerinin hücre yüzeyiyle etkileşimini kolaylaştırarak hücre içine girişini mümkün kılar. Bu durum, transformasyon verimliliğinin büyük ölçüde hücre bariyerlerin geçici olarak aşılmasına bağlı olduğunu göstermektedir (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002; Glick et al., 2010). Bakteriyel transformasyonun etkinliği, yalnızca hücre zarının geçirgenliği ile sınırlı değildir. Hücre duvarının yapısal bileşimi, ortamın iyonik gücü ve hücre–DNA etkileşimlerini yönlendiren elektrostatik faktörler, transformasyon sürecini doğrudan etkileyen değişkenler arasında yer almaktadır. Bu çok parametreliliği, transformasyon protokollerinin neden farklı bakteri türleri ve deneysel

amaçlar için özel olarak optimize edilmesi gerektiğini açıklamaktadır (Watson et al., 2013; Clark & Pazdernik, 2016).

Deneysel açıdan bakıldığında, bakteriyel transformasyon yalnızca DNA'nın hücre içine alınmasını değil, aynı zamanda bu DNA'nın hücre içinde hangi stabiliteyle korunacağını da belirlemektedir. Hücre içine giren DNA'nın replikasyonu, seçici markerlar aracılığıyla transformant hücrelerin tanımlanması ve rekombinant klonların elde edilmesi, transformasyon basamağının başarısına doğrudan bağlıdır. Bu nedenle transformasyon, klonlama sürecinde teknik bir işlem olmanın ötesinde, downstream deneysel çıktıları şekillendiren belirleyici bir aşama olarak değerlendirilmelidir (Primrose et al., 2001; Brown, 2016).

Bu doğrultuda bakteriyel transformasyonun temel prensiplerinin anlaşılması, genetik materyalin prokaryotik sistemlerde güvenilir ve kontrollü biçimde aktarılmasını mümkün kılmaktadır. Hücresel bariyerlerin geçici olarak modifiye edilmesine dayanan bu yaklaşım, rekombinant DNA teknolojilerinin deneysel altyapısında merkezi bir rol oynamaya devam etmektedir (Green & Sambrook, 2012; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Glick et al., 2010).

5.3.2. Kimyasal Yetkinlik ve Isı Şoku Mekanizması

Kimyasal yetkinlik ve ısı şoku mekanizması, bakteriyel transformasyonun laboratuvar ortamında etkin biçimde gerçekleştirilmesini sağlayan en yaygın ve klasik yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Bu yöntem, bakteriyel hücrelerin hücre zarı ve hücre duvarı özelliklerinin geçici olarak modifiye edilmesine dayanarak, dış

ortamda bulunan DNA'nın hücre içine alınmasını mümkün kılar. Uygulama kolaylığı ve tekrarlanabilirliği nedeniyle kimyasal yetkinlik protokolleri, rekombinant DNA çalışmalarında temel transformasyon stratejisi olarak kabul edilmektedir (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002).

Kimyasal yetkinlik sürecinde bakteriyel hücreler genellikle divalent katyonlar içeren çözeltilerle muamele edilir. Kalsiyum iyonları başta olmak üzere bu katyonlar, negatif yüklü DNA molekülleri ile hücre yüzeyi arasındaki elektrostatik itici kuvvetleri azaltarak DNA'nın hücre zarıyla yakın temas kurmasını sağlar. Bu etkileşim, hücre zarının yapısal bütünlüğü korunurken DNA'nın hücre yüzeyinde tutulmasına olanak tanır ve transformasyon için gerekli ön koşulları oluşturur (Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Isı şoku basamağı, kimyasal yetkinlik kazandırılmış hücrelerde DNA'nın hücre içine girişini tetikleyen kritik aşamayı temsil eder. Kısa süreli ve ani sıcaklık artışı, hücre zarında geçici porların oluşmasına ve membran akışkanlığının artmasına neden olur. Bu fiziksel değişim, hücre yüzeyinde tutulan DNA'nın sitoplazmaya doğru yönlendirilmesini mümkün kılar. Isı şoku süresinin ve sıcaklığının hassas biçimde ayarlanması, transformasyon verimliliğini doğrudan etkileyen temel parametreler arasında yer almaktadır (Green & Sambrook, 2012; Glick et al., 2010).

Kimyasal yetkinlik ve ısı şoku mekanizmasının etkinliği, hücre fizyolojisi ile yakından ilişkilidir. Hücrelerin büyüme fazı,

membran bileşimi ve metabolik durumu, transformasyon sürecine verilen yanıtı belirgin biçimde etkileyebilir. Özellikle logaritmik büyüme fazındaki hücreler, membran dinamiklerinin daha esnek olması nedeniyle bu yönteme daha yüksek duyarlılık göstermektedir. Bu durum, transformasyon protokollerinde hücre hazırlık aşamasının neden kritik olduğunu açıklamaktadır (Primrose et al., 2001; Clark & Pazdernik, 2016).

Deneysel açıdan değerlendirildiğinde, kimyasal yetkinlik ve ısı şoku yöntemi yüksek verim sağlamakla birlikte belirli sınırlılıklar da barındırmaktadır. Büyük DNA moleküllerinin veya düşük kopya sayılı vektörlerin transformasyonu, bu yöntemle daha düşük etkinlik gösterebilir. Bu nedenle kimyasal transformasyon, deneysel hedeflere göre alternatif fiziksel yöntemlerle birlikte değerlendirilmesi gereken bir yaklaşım olarak ele alınmalıdır (Brown, 2016; Watson et al., 2013).

Bu bağlamda kimyasal yetkinlik ve ısı şoku mekanizması, bakteriyel transformasyonun moleküler temellerini yansıtan, güvenilir ve yaygın olarak kullanılan bir gen aktarım yöntemidir. Hücresel bariyerlerin geçici olarak modifiye edilmesine dayanan bu yaklaşım, uygun koşullar altında optimize edildiğinde rekombinant DNA çalışmalarında tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesini mümkün kılmaktadır (Green & Sambrook, 2012; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Ausubel et al., 2002).

5.3.3. Elektroporasyon ve Fiziksel Gen Aktarımı

Elektroporasyon, hücre zarının kısa süreli ve kontrollü elektrik alanlarına maruz bırakılmasıyla geçirgenliğinin artırılmasına

dayanan fiziksel bir gen aktarım yöntemidir. Bu yaklaşım, kimyasal temelli transformasyon ve transfeksiyon yöntemlerinden farklı olarak, hücresel bariyerlerin doğrudan fiziksel kuvvetlerle aşılmasını hedefler. Elektroporasyon, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde uygulanabilmesi ve geniş bir hücre tipi yelpazesinde kullanılabilmesi nedeniyle moleküler biyoloji çalışmalarında önemli bir alternatif yöntem olarak değerlendirilmektedir (Brown, 2016; Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Elektrik alanı uygulandığında hücre zarında geçici porların oluştuğu ve bu porlar aracılığıyla DNA moleküllerinin hücre içine girebildiği kabul edilmektedir. Bu porlar kalıcı hasara yol açmadan kısa süre içinde kapanmakta, böylece hücresel bütünlük büyük ölçüde korunmaktadır. Elektroporasyonun başarısı, uygulanan voltaj, darbe süresi ve darbe sayısı gibi parametrelerin hücre tipine özgü olarak optimize edilmesine bağlıdır. Bu durum, yöntemin yüksek esneklik sunmakla birlikte dikkatli deneysel tasarım gerektirdiğini göstermektedir (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002; Glick et al., 2010).

Elektroporasyonun önemli avantajlarından biri, büyük DNA moleküllerinin ve düşük kopya sayılı vektörlerin hücre içine aktarımında kimyasal yöntemlere kıyasla daha yüksek verim sağlayabilmesidir. Ayrıca hücre duvarı yapısı veya yüzey yükleri gibi faktörlerden daha az etkilenmesi, bu yöntemi transformasyonu zor hücre tipleri için cazip hâle getirmektedir. Bununla birlikte yüksek elektrik alanlarının hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkilere yol

açabilmesi, elektroporasyon parametrelerinin hassas biçimde ayarlanmasını zorunlu kılmaktadır (Primrose et al., 2001; Clark & Pazdernik, 2016).

Fiziksel gen aktarım yöntemleri, elektroporasyonla sınırlı değildir. Mikroenjeksiyon, biyolistik gen aktarımı (gen tabancası) ve lazer temelli yaklaşımlar gibi teknikler, genetik materyalin hücre içine doğrudan fiziksel yollarla taşınmasını amaçlamaktadır. Bu yöntemler, özellikle klasik transformasyon veya transfeksiyon yaklaşımlarının yetersiz kaldığı özel deneysel senaryolarda kullanılmaktadır. Ancak teknik karmaşıklık, düşük verim veya sınırlı hücre sayısıyla çalışılabilmesi gibi faktörler, bu yöntemlerin kullanım alanlarını daraltmaktadır (Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022).

Deneysel açıdan değerlendirildiğinde, elektroporasyon ve diğer fiziksel gen aktarım yöntemleri, yüksek aktarım potansiyeli sunmalarına karşın hücresel stres ve canlılık kaybı riski taşımaktadır. Bu nedenle bu yaklaşımlar, genetik materyalin hücre içine alınmasının zorunlu olduğu durumlarda, elde edilecek biyolojik çıktılar ile hücresel hasar riski arasında dikkatli bir denge kurulmasını gerektirir. Yöntem seçimi, yalnızca aktarım verimine göre değil, hücre tipi ve downstream uygulamalar göz önünde bulundurularak yapılmalıdır (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012).

Bu değerlendirme, elektroporasyon ve fiziksel gen aktarımı yaklaşımlarının hücresel bariyerlerin doğrudan aşılmasına dayanan güçlü ve esnek seçenekler sunduğunu göstermektedir. Bu yöntemlerin moleküler temellerinin ve deneysel sınırlılıklarının anlaşılması,

transformasyon ve transfeksiyon stratejilerinin rasyonel biçimde planlanmasına katkı sağlamaktadır (Green & Sambrook, 2012; Primrose et al., 2001).

5.3.4. Transfeksiyonun Temel İlkeleri ve Hücresel Bariyerler

Transfeksiyon, ökaryotik hücelere genetik materyalin kontrollü biçimde aktarılmasını amaçlayan gen aktarım yöntemlerini tanımlamaktadır. Bakteriyel transformasyondan farklı olarak transfeksiyon, daha karmaşık hücresel yapılara sahip olan ökaryotik hücrelerin çok katmanlı bariyerlerinin aşılmasını gerektirir. Hücre zarı, endozomal sistemler ve nükleer membran gibi yapılar, DNA'nın hücre içine girişi ve fonksiyonel olarak ifade edilebilmesi açısından belirleyici engeller oluşturmaktadır. Bu nedenle transfeksiyon, yalnızca teknik bir aktarım süreci değil, hücresel bariyerlerle etkileşimi de kapsayan çok aşamalı bir mekanizma olarak değerlendirilmelidir (Brown, 2016; Watson et al., 2013; et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Ökaryotik hücrelerde genetik materyalin ilk karşılaştığı bariyer hücre zarıdır. Negatif yüklü ve büyük yapıları DNA moleküllerinin lipit çift tabakadan doğrudan geçişi mümkün olmadığından, transfeksiyon yöntemleri bu bariyeri dolaylı yollarla aşmayı hedefler. Kimyasal taşıyıcılar, fiziksel kuvvetler veya biyolojik vektörler aracılığıyla DNA'nın hücre zarından içeri alınması sağlanır. Ancak bu aşamada gerçekleşen hücre-DNA etkileşimleri, transfeksiyon verimliliğini belirleyen temel faktörler arasında yer almaktadır (Green & Sambrook, 2012; Freshney, 2016; Ausubel et al., 2002). Hücre içine alınan DNA için ikinci önemli engel endozomal

sistemdir. Endositoz yoluyla hücre içine giren genetik materyal, endozomlar içerisinde parçalanma veya lizozomal yıkıma uğrama riski taşır. Bu nedenle başarılı bir transfeksiyon süreci, DNA'nın endozomal yapılardan sitoplazmaya kaçışını sağlayacak mekanizmaların devreye girmesini gerektirir. Endozomal kaçışın sınırlı olduğu durumlarda, hücre içine alınan DNA'nın büyük bir kısmı nükleusa ulaşmadan etkisiz hâle gelebilir (Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022).

Transfeksiyonun bir diğer kritik aşaması, DNA'nın nükleer membranı aşarak çekirdek içine girmesidir. Özellikle bölünmeyen hücrelerde nükleer zarfın bütünlüğü korunmakta olduğundan, DNA'nın nükleusa taşınması önemli bir sınırlılık oluşturmaktadır. Bu durum, transfeksiyon verimliliğinin hücre döngüsüyle ilişkili olmasına ve bazı hücre tiplerinde geçici gen ifadesiyle sınırlı kalmasına yol açabilmektedir. Dolayısıyla transfeksiyonun başarısı, yalnızca hücre içine girişle değil, genetik materyalin hücre içi kaderiyle de yakından ilişkilidir (Primrose et al., 2001; Lodish et al., 2022).

Deneyssel açıdan değerlendirildiğinde, transfeksiyonun temel ilkeleri hücresel bariyerlerin sistematik biçimde aşılmasına dayanmaktadır. Hücre zarı, endozomal sistemler ve nükleer membran arasındaki geçişlerin her biri, transfeksiyon protokollerinin optimize edilmesini zorunlu kılan ayrı kontrol noktaları olarak ele alınmalıdır. Bu çok katmanlı yapı, transfeksiyon yöntemlerinin neden hücre tipine ve deneyssel hedeflere özgü olarak seçilmesi gerektiğini açıklamaktadır (Brown, 2016; Clark & Pazdernik, 2016).

Bu çerçevede transfeksiyon, ökaryotik hücrelerde genetik materyalin fonksiyonel olarak ifade edilebilmesi için aşılması gereken bir dizi hücresel bariyeri içeren karmaşık bir süreç olarak ele alınmalıdır. Bu bariyerlerin moleküler düzeyde anlaşılması, transfeksiyon verimliliğinin artırılmasına ve deneysel sonuçların daha güvenilir biçimde yorumlanmasına doğrudan katkı sağlamaktadır (Green & Sambrook, 2012; Watson et al., 2013).

5.3.5. Lipofeksiyon ve Kimyasal Transfeksiyon Yöntemleri

Lipofeksiyon ve diğer kimyasal transfeksiyon yöntemleri, genetik materyalin ökaryotik hücrelere aktarılmasında en yaygın kullanılan yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Bu yöntemler, DNA veya RNA moleküllerinin hücre zarını doğrudan geçememesi sorununu, kimyasal taşıyıcılar aracılığıyla aşmayı hedefler. Özellikle katyonik lipitler ve polimer temelli sistemler, genetik materyalle kompleks oluşturarak hücre–DNA etkileşimini kolaylaştırmakta ve transfeksiyon verimliliğini artırmaktadır (Brown, 2016; Green & Sambrook, 2012; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Lipofeksiyon, katyonik lipitlerin negatif yüklü nükleik asitlerle elektrostatik etkileşim kurarak lipopleks adı verilen yapılar oluşturmaya dayanır. Bu kompleksler, hücre zarındaki lipit tabaka ile etkileşime girerek endositoz yoluyla hücre içine alınır. Lipofeksiyonun en önemli avantajı, geniş hücre tipi yelpazesinde uygulanabilir olması ve nispeten düşük hücresel toksisite göstermesidir. Bu özellikler, yöntemi kısa süreli gen ifadesi analizleri ve fonksiyonel çalışmalar için

cazip hâle getirmektedir (Felgner et al., 1994; Watson et al., 2013; Freshney, 2016).

Kimyasal transfeksiyon yöntemleri arasında yer alan polimer bazlı sistemler, nükleik asitlerin pozitif yüklü polimerlerle komplekslenmesi prensibine dayanır. Bu kompleksler, hücre yüzeyiyle etkileşime girerek hücre içine alınır ve endozomal kaçış mekanizmaları aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Polimer sistemler, lipit bazlı yöntemlere kıyasla daha yüksek taşıma kapasitesi sunabilmekle birlikte, hücresel toksisite ve hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle polimer temelli transfeksiyon, deneysel koşullara göre dikkatle optimize edilmesi gereken bir yaklaşımdır (Primrose et al., 2001; Clark & Pazdernik, 2016; Glick et al., 2010).

Lipofeksiyon ve kimyasal transfeksiyon yöntemlerinin etkinliği, hücre tipi, hücre yoğunluğu ve kullanılan nükleik asidin özellikleri gibi çok sayıda parametreye bağlıdır. Hücre döngüsü, membran kompozisyonu ve endozomal aktivite düzeyi, transfeksiyon verimliliğini doğrudan etkileyen biyolojik faktörler arasında yer almaktadır. Bu durum, standart protokollerin her hücre tipi için aynı başarıyı göstermemesinin temel nedenlerinden biridir (Brown, 2016; Lodish et al., 2022; (Bruce et al., 2022) et al., 2022).

Deneysel açıdan değerlendirildiğinde, lipofeksiyon ve kimyasal transfeksiyon yöntemleri yüksek esneklik sunmakla birlikte çoğunlukla geçici gen ifadesi ile sınırlıdır. Genetik materyalin konak genomuna entegre olmaması, ekspresyonun zamanla azalmasına yol

açabilir. Bu nedenle bu yöntemler, stabil gen ekspresyonunun hedeflendiği çalışmalardan ziyade, kısa süreli fonksiyonel analizler ve rapor gen çalışmaları için daha uygun kabul edilmektedir (Watson et al., 2013; Green & Sambrook, 2012).

Bu doğrultuda lipofeksiyon ve kimyasal transfeksiyon yöntemleri, ökaryotik hücrelerde genetik materyalin etkin biçimde aktarılmasını sağlayan pratik ve yaygın yaklaşımlar sunmaktadır. Bu yöntemlerin moleküler temellerinin ve sınırlılıklarının anlaşılması, transfeksiyon stratejilerinin deneysel hedeflere uygun biçimde seçilmesine ve optimize edilmesine katkı sağlamaktadır (Primrose et al., 2001; Freshney, 2016).

5.3.6. Transient ve Stabil Gen Aktarımı

Genetik materyalin hücrelere aktarılmasının ardından, bu materyalin hangi süreyle ve hangi düzeyde ifade edileceği, gen aktarım stratejisinin temel belirleyicilerinden biridir. Bu bağlamda gen aktarımı, ifade süresine bağlı olarak transient (geçici) ve stabil (kalıcı) olmak üzere iki ana kategori altında değerlendirilmektedir. Bu iki yaklaşım arasındaki fark, yalnızca gen ifadesinin süresiyle sınırlı olmayıp, deneysel hedefler, hücre hattı seçimi ve downstream analizler açısından da belirleyici sonuçlar doğurmaktadır (Brown, 2016; Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Transient gen aktarımı, hücre içine alınan genetik materyalin konak genomuna entegre olmaksızın episomal olarak varlığını sürdürmesine dayanır. Bu durumda gen ifadesi, genellikle kısa süreli ve geçici nitelik taşır. Transient transfeksiyon, hızlı sonuç elde edilmesi,

protokol kolaylığı ve düşük zaman maliyeti gibi avantajlar sunarak rapor gen analizleri, promotör aktivitesi çalışmaları ve kısa süreli fonksiyonel testlerde yaygın biçimde kullanılmaktadır (Green & Sambrook, 2012; Freshney, 2016; Glick et al., 2010). Buna karşılık stabil gen aktarımı, hedef genin konak genomuna entegre edilmesini ve uzun süreli, kalıcı gen ifadesinin sağlanmasını amaçlar. Bu yaklaşım, seçici markerlar aracılığıyla stabil hücre hatlarının oluşturulmasını gerektirir ve deneysel sürecin daha uzun ve karmaşık olmasına neden olur. Ancak stabil ekspresyon, özellikle gen fonksiyonu analizi, uzun dönem fenotipik çalışmalar ve terapötik modelleme gibi uygulamalarda vazgeçilmez bir avantaj sunmaktadır (Primrose et al., 2001; Clark & Pazdernik, 2016; Naldini, 2015).

Transient ve stabil gen aktarımı arasındaki tercih, deneysel sorunun niteliğiyle doğrudan ilişkilidir. Kısa süreli gen ifadesinin yeterli olduğu durumlarda transient yaklaşımlar zaman ve kaynak açısından avantaj sağlarken, gen ürününün uzun vadeli etkilerinin incelenmesi gereken çalışmalarda stabil sistemler zorunlu hâle gelmektedir. Bu nedenle yöntem seçimi, yalnızca teknik uygulanabilirliğe göre değil, beklenen biyolojik çıktılar doğrultusunda bilinçli biçimde yapılmalıdır (Brown, 2016; Watson et al., 2013).

Deneysel açıdan değerlendirildiğinde, stabil gen aktarımı genellikle düşük entegrasyon verimi ve klonal varyasyon gibi sınırlılıkları beraberinde getirir. Farklı klonlar arasında gen kopya sayısı ve ekspresyon düzeyi değişkenlik gösterebilir. Bu durum, elde edilen sonuçların yorumlanmasında dikkatli bir klonal analiz ve doğrulama

sürecini gerekli kılar. Transient gen aktarımında ise ekspresyon düzeyleri hücreden hücreye değişkenlik gösterebilir ve zamanla azalabilir; bu da deneysel tekrarların önemini artırmaktadır (Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022).

Bu bağlamda transient ve stabil gen aktarımı, farklı deneysel ihtiyaçlara yanıt veren tamamlayıcı yaklaşımlar sunmaktadır. Bu iki yöntemin avantajlarının ve sınırlılıklarının moleküler düzeyde anlaşılması, gen aktarım stratejilerinin rasyonel biçimde planlanmasına ve elde edilen verilerin güvenilir biçimde yorumlanmasına doğrudan katkı sağlamaktadır (Green & Sambrook, 2012; Primrose et al., 2001).

5.3.7. Yöntemlerin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Genetik materyalin hücrelere aktarımında kullanılan transformasyon ve transfeksiyon yöntemleri, tek bir “en iyi” yaklaşım sunmaktan ziyade farklı deneysel gereksinimlere yanıt veren tamamlayıcı stratejiler olarak değerlendirilmelidir. Kimyasal transformasyon, elektroporasyon, lipofeksiyon ve diğer fiziksel veya kimyasal transfeksiyon yöntemleri; aktarım verimliliği, hücresel canlılık, uygulama kolaylığı ve gen ifadesinin süresi açısından belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle yöntemlerin karşılaştırmalı olarak ele alınması, deneysel tasarımın rasyonel biçimde yapılandırılması açısından kritik bir gereklilik olarak ortaya çıkmaktadır (Brown, 2016; Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Bakteriyel sistemlerde uygulanan kimyasal transformasyon yöntemleri, düşük maliyet ve yüksek tekrarlanabilirlik avantajlarıyla

öne çıkmaktadır. Ancak bu yöntemler, büyük DNA fragmanlarının aktarımı veya transformasyonu zor hücre türleri söz konusu olduğunda sınırlı kalabilmektedir. Elektroporasyon ise geniş DNA boyut aralığında ve farklı hücre tiplerinde daha yüksek aktarım potansiyeli sunmakla birlikte, hücresel stres ve canlılık kaybı riski taşımaktadır. Bu durum, elektroporasyonun yüksek verim ile hücresel bütünlük arasında dikkatli bir denge kurulmasını gerektirdiğini göstermektedir (Green & Sambrook, 2012; Ausubel et al., 2002; Clark & Pazdernik, 2016).

Ökaryotik hücrelerde uygulanan transfeksiyon yöntemleri, genetik materyalin hücre içine giriş mekanizmaları ve hücre içi kaderi açısından daha karmaşık bir tablo sunmaktadır. Lipofeksiyon ve diğer kimyasal transfeksiyon yaklaşımları, uygulama kolaylığı ve geniş hücre tipi uyumluluğu nedeniyle yaygın biçimde tercih edilmektedir. Bununla birlikte bu yöntemler çoğunlukla geçici gen ifadesiyle sınırlı kalmakta ve ekspresyon düzeyi hücreden hücreye değişkenlik gösterebilmektedir. Bu özellik, kısa süreli fonksiyonel analizler için avantaj sağlarken, uzun vadeli çalışmalar açısından sınırlılık oluşturmaktadır (Freshney, 2016; Watson et al., 2013; Primrose et al., 2001).

Fiziksel transfeksiyon yöntemleri ve viral vektörler, yüksek aktarım verimliliği ve bazı durumlarda stabil gen ifadesi sağlama potansiyeli sunmaktadır. Ancak bu yaklaşımlar, teknik karmaşıklık, biyogüvenlik gereklilikleri ve hücresel toksisite gibi faktörler nedeniyle daha sıkı deneysel kontrol gerektirir. Bu durum, yöntem seçiminin yalnızca aktarım başarısına göre değil, hücre tipi, deney süresi ve

downstream analizler dikkate alınarak yapılmasının önemini ortaya koymaktadır (Kay, 2011; Naldini, 2015; Thomas et al., 2003; Walther & Stein, 2000). Gen aktarım yöntemlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi, aynı zamanda elde edilecek biyolojik verilerin yorumlanabilirliği açısından da belirleyici bir rol oynamaktadır. Yönteme bağlı olarak gen ifadesinin süresi, düzeyi ve hücre popülasyonu içindeki homojenliği değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle farklı gen aktarım stratejileriyle elde edilen sonuçların doğrudan karşılaştırılması, yöntem kaynaklı farklılıklar göz önünde bulundurulmadan yapıldığında yanıltıcı yorumlara yol açabilir (Brown, 2016; (Bruce et al., 2022) et al., 2022)

Bu çerçevede gen aktarım yöntemleri arasındaki farklılıkların bilinçli biçimde değerlendirilmesi, deneysel hedeflere en uygun yaklaşımın seçilmesini mümkün kılmaktadır. Yöntem seçimi, yalnızca teknik uygulanabilirliğe değil, biyolojik bağlama ve araştırma sorusunun niteliğine göre yapılmalıdır. Bu bütüncül yaklaşım, genetik mühendisliği ve moleküler biyoloji çalışmalarında güvenilir, tekrarlanabilir ve anlamlı sonuçların elde edilmesinin temelini oluşturmaktadır (Green & Sambrook, 2012; Primrose et al., 2001).

5.3.8. Hücresel Bariyerler ve Aktarılan DNA'nın Hücre İçi Kaderi

Genetik materyalin hücre içine aktarılmasından sonra, bu materyalin hücre içindeki yolculuğu ve kaderi, gen ifadesinin başarısını belirleyen temel faktörler arasında yer almaktadır. Hücre zarının aşılması, gen aktarım sürecinin yalnızca ilk basamağını oluşturur; aktarılan DNA'nın fonksiyonel olarak ifade edilebilmesi için

sitoplazmik ve nükleer düzeyde bir dizi ek bariyerin daha aşılması gerekmektedir. Bu çok aşamalı yapı, gen aktarım verimliliğinin neden hücre tipine ve kullanılan yönteme bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini açıklamaktadır (Brown, 2016; Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Ökaryotik hücrelerde DNA'nın hücre içine girişinden sonra karşılaşılan ilk önemli engel, endozomal sistemdir. Endositoz yoluyla hücre içine alınan genetik materyal, endozomlar içerisinde tutulmakta ve yeterli kaçış mekanizmaları devreye girmediği takdirde lizozomal yıkıma uğrama riski taşımaktadır. Bu durum, transfeksiyon verimliliğini sınırlayan başlıca faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Endozomal kaçışın etkin biçimde sağlanamadığı koşullarda, hücre içine alınan DNA'nın büyük bir kısmı nükleer bölgeye ulaşmadan etkisiz hâle gelmektedir (Green & Sambrook, 2012; Watson et al., 2013; Freshney, 2016).

Sitoplazmaya ulaşan DNA için bir sonraki kritik basamak, nükleer membranın aşılmasıdır. Hücre bölünmesi sırasında nükleer zarfın geçici olarak çözünmesi, DNA'nın çekirdek içine girişini kolaylaştırırken; bölünmeyen hücrelerde bu süreç daha sınırlı ve seçici mekanizmalara bağlıdır. Bu nedenle gen aktarımının etkinliği, hücre döngüsüyle yakından ilişkilidir ve bazı hücre tiplerinde gen ifadesinin geçici kalmasına neden olabilmektedir (Lodish et al., 2022; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Watson et al., 2013). Aktarılan DNA'nın hücre içi kaderi, yalnızca fiziksel bariyerlerin aşılmasıyla belirlenmez; aynı zamanda DNA'nın hücre içindeki stabilitesi ve işlenme biçimi de bu

süreci doğrudan etkiler. Sitoplazmada bulunan nükleazlar, yabancı DNA'nın parçalanmasına yol açabilirken, çekirdek içine ulaşan DNA'nın kromatin yapısıyla etkileşimi gen ifadesinin düzeyini belirleyen önemli bir faktördür. Bu bağlamda DNA'nın epigenetik düzenleyicilerle etkileşimi, gen ifadesinin sürekliliği ve homojenliği üzerinde etkili olabilmektedir (Primrose et al., 2001; (Bruce et al., 2022) et al., 2022).

Deneysel açıdan değerlendirildiğinde, aktarılan DNA'nın hücre içi kaderi gen aktarım yönteminin seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Kimyasal ve fiziksel transfeksiyon yöntemleri çoğunlukla episomal DNA varlığıyla sınırlı kalırken, viral vektörler veya genom entegrasyonunu hedefleyen yaklaşımlar daha kalıcı gen ifadesi sağlayabilmektedir. Bu durum, hücresel bariyerlerin aşılma biçiminin gen ifadesinin süresi ve stabilitesi üzerinde belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir (Brown, 2016; Naldini, 2015; Kay, 2011)

Bu değerlendirme, hücresel bariyerler ve aktarılan DNA'nın hücre içi kaderinin gen aktarımının yalnızca teknik bir süreç olmadığını, aynı zamanda hücresel fizyolojiyle bütünleşmiş karmaşık bir biyolojik olay olduğunu ortaya koyduğunu göstermektedir. Bu süreçlerin moleküler düzeyde anlaşılması, gen aktarım stratejilerinin optimize edilmesine ve elde edilen deneysel sonuçların daha doğru biçimde yorumlanmasına katkı sağlamaktadır (Green & Sambrook, 2012; Watson et al., 2013).

5.3.9. Yöntem Seçiminde Deneysel ve Biyolojik Kriterler

Gen aktarım yönteminin seçimi, deneysel başarının belirleyici aşamalarından biri olup, yalnızca teknik uygulanabilirlik üzerinden değil, biyolojik bağlam ve araştırma sorusunun niteliği dikkate alınarak yapılmalıdır. Transformasyon ve transfeksiyon yöntemleri, farklı hücre tipleri ve deneysel hedefler için değişen avantajlar ve sınırlılıklar sunmaktadır. Bu nedenle yöntem seçimi, genetik materyalin hücre içine alınmasının ötesinde, gen ifadesinin süresi, düzeyi ve homojenliği gibi faktörleri de kapsayan bütüncül bir değerlendirme gerektirir (Brown, 2016; Watson et al., 2013; (Bruce et al., 2022) et al., 2022; Lodish et al., 2022).

Deneysel kriterler arasında hedef hücre tipi, aktarılacak DNA'nın boyutu, gen ifadesinin geçici mi yoksa kalıcı mı olmasının istendiği ve elde edilecek çıktının zaman ölçeği yer almaktadır. Bakteriyel sistemlerde hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi hedeflendiğinde kimyasal transformasyon yöntemleri ön plana çıkarken, ökaryotik hücrelerde fonksiyonel gen ifadesi için transfeksiyon veya viral vektör temelli yaklaşımlar tercih edilmektedir. Bu bağlamda yöntem seçimi, deneysel tasarımın erken aşamalarında verilmesi gereken stratejik bir karar olarak değerlendirilmelidir (Green & Sambrook, 2012; Clark & Pazdernik, 2016; Ausubel et al., 2002). Biyolojik kriterler ise hücrelerin fizyolojik durumu, bölünme kapasitesi ve hücresel stres toleransı gibi parametreleri içermektedir. Özellikle hassas veya yavaş bölünen hücre tiplerinde, yüksek verim sağlamak adına uygulanan agresif gen aktarım yöntemleri hücresel canlılığı

olumsuz etkileyebilir. Bu durum, yüksek aktarım veriminin her zaman deneysel açıdan en uygun sonuç anlamına gelmediğini ve hücresel bütünlüğün korunmasının en az verim kadar önemli olduğunu göstermektedir (Freshney, 2016; Primrose et al., 2001).

Gen aktarım yöntemlerinin seçimi, aynı zamanda downstream analizlerin güvenilirliği üzerinde de doğrudan etkilidir. Farklı yöntemlerle elde edilen gen ifadesi profilleri, hücre popülasyonu içinde heterojenlik gösterebilir ve bu durum deneysel sonuçların yorumlanmasını güçleştirebilir. Bu nedenle yöntem seçimi, yalnızca gen aktarımının başarısı üzerinden değil, elde edilecek verilerin istatistiksel ve biyolojik olarak anlamlı biçimde analiz edilebilmesi açısından da değerlendirilmelidir (Brown, 2016; (Bruce et al., 2022) et al., 2022).

Bu doğrultuda gen aktarım yönteminin belirlenmesi, teknik, biyolojik ve deneysel kriterlerin birlikte ele alındığı çok boyutlu bir karar sürecini ifade etmektedir. Uygun yöntemin bilinçli biçimde seçilmesi, rekombinant DNA çalışmalarında güvenilir, tekrarlanabilir ve yorumlanabilir sonuçların elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu yaklaşım, moleküler biyoloji uygulamalarında yöntem seçiminin neden deneysel tasarımın merkezinde yer aldığını açık biçimde ortaya koymaktadır (Green & Sambrook, 2012; Watson et al., 2013).

5.4. Klon Seçimi ve Doğrulama: Moleküler Tarama ve Analitik Yaklaşımlar

Rekombinant DNA teknolojilerinde genetik materyalin hücrelere aktarılması, deneysel sürecin yalnızca başlangıç aşamasını

oluşturmaktadır. Aktarım sonrasında elde edilen hücre popülasyonları, genetik olarak homojen yapılardan ziyade, farklı genetik konfigürasyonlar içeren karmaşık bir dağılım sergiler. Bu nedenle klon seçimi ve doğrulama basamakları, hedef genetik yapının doğru biçimde elde edildiğinin gösterilmesi açısından vazgeçilmez bir kontrol süreci olarak değerlendirilmelidir. Klonlama deneylerinin güvenilirliği, büyük ölçüde bu aşamalarda uygulanan moleküler tarama ve analitik yaklaşımların doğruluğuna bağlıdır (Green & Sambrook, 2012; Brown, T. A., 2020; Watson et al., 2013).

Klon seçimi süreci, yalnızca rekombinant DNA'yı taşıyan hücrelerin ayırt edilmesini değil, aynı zamanda hedef genin vektör içerisindeki yapısal bütünlüğünün ve yöneliminin doğrulanmasını da kapsar. Transformasyon veya transfeksiyon sonrasında elde edilen koloniler, yüzeysel olarak benzer görümlerine karşın genetik düzeyde önemli farklılıklar gösterebilir. Bu durum, fenotipik gözlemlerin tek başına yeterli olmadığını ve moleküler doğrulama yaklaşımlarının zorunlu olduğunu ortaya koymaktadır (Watson et al., 2013).

Moleküler tarama yöntemleri, klonlama sürecinde hızlı ön eleme yapılmasına olanak tanırken, analitik doğrulama yaklaşımları elde edilen klonların genetik yapısına ilişkin daha ayrıntılı bilgi sağlar. Bu iki yaklaşım, birbirinin alternatifi değil, tamamlayıcısı olarak değerlendirilmelidir. Yalnızca tarama yöntemlerine dayalı seçimler, yanlış pozitif klonların gözden kaçmasına yol açabilirken; yalnızca ileri doğrulama tekniklerine odaklanması, deneysel zaman ve kaynak kullanımını gereksiz biçimde artırabilir. Bu nedenle klon seçimi süreci,

aşamalı ve rasyonel bir strateji çerçevesinde ele alınmalıdır (Primrose et al., 2001).

Klon doğrulama basamaklarının önemi, özellikle ekspresyon çalışmalarında ve fonksiyonel analizlerde daha belirgin hâle gelmektedir. Hedef genin eksik, ters yönlü veya mutasyon içeren biçimde vektöre entegre edilmesi, deneysel sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Bu tür hatalar, çoğu zaman gen aktarım aşamasından ziyade, yetersiz doğrulama stratejilerinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla klon seçimi ve doğrulama, deneysel başarının güvence altına alındığı kritik karar noktaları olarak değerlendirilmelidir (Brown, T. A., 2020). Bu bölümde klon seçimi ve doğrulama süreçlerinde kullanılan başlıca moleküler tarama yöntemleri, klasik ve güncel analitik yaklaşımlar çerçevesinde ele alınacaktır. Yöntemlerin sağladığı avantajlar, sınırlılıklar ve deneysel bağlam içindeki rolleri, klonlama çalışmalarında güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi perspektifiyle tartışılacaktır (Goodwin et al., 2016).

5.4.1. Klon Seçiminin Deneysel Mantığı ve Güncel Yaklaşımlar

Klon seçimi, rekombinant DNA teknolojilerinde genetik materyalin hücrelere aktarılmasını izleyen aşamada, hedeflenen genetik yapının doğru biçimde elde edildiğinin gösterilmesini amaçlayan kritik bir kontrol basamağını temsil eder. Transformasyon veya transfeksiyon sonrası oluşan hücre popülasyonları, genetik açıdan homojen değildir; aynı deneysel koşullar altında elde edilen koloniler dahi, vektör yapısı, insert varlığı ve yönelimi bakımından farklılık gösterebilir. Bu durum,

klon seçiminin rastlantısal bir eleme süreci değil, deneysel mantıkla yapılandırılması gereken sistematik bir değerlendirme olduğunu ortaya koymaktadır (Green & Sambrook, 2012; Brown, T. A., 2020; Watson et al., 2013). Deneysel açıdan klon seçiminin temel amacı, hedef genetik yapıyı doğru konfigürasyonla taşıyan hücrelerin erken aşamada ayırt edilmesidir. Bu amaç doğrultusunda kullanılan yaklaşımlar, hız ve doğruluk arasında bir denge kurmayı hedefler. Hızlı tarama yöntemleri, geniş koloni popülasyonları içerisinde potansiyel adayların kısa sürede belirlenmesini sağlarken, bu adayların genetik doğruluğunun kesinleştirilmesi için daha ayrıntılı doğrulama basamaklarına ihtiyaç duyulur. Bu iki aşamanın birlikte planlanması hem deneysel verimliliği artırmakta hem de yanlış pozitif klonların ilerleyen aşamalarda sorun yaratmasının önüne geçmektedir (Primrose et al., 2001).

Güncel klon seçimi yaklaşımları, klasik fenotipik gözlemlerden moleküler temelli tarama yöntemlerine doğru evrilmiştir. Antibiyotik seçimi gibi temel seleksiyon stratejileri, yalnızca vektör taşıyan hücrelerin ayırt edilmesine olanak tanırken; insertin varlığı, bütünlüğü ve yönelimi hakkında sınırlı bilgi sunar. Bu nedenle modern klonlama çalışmalarında klon seçimi, çoğunlukla moleküler düzeyde yapılan analizlerle desteklenmektedir. Bu yaklaşım, deneysel belirsizliklerin erken aşamada azaltılmasına katkı sağlamaktadır (Green & Sambrook, 2012; Gibson et al., 2009; Engler et al., 2008; de Kok et al., 2014).

Klon seçiminin deneysel mantığı, yalnızca “doğru klonu bulmak” ile sınırlı değildir; aynı zamanda downstream uygulamaların

güvenilirliğini sağlamayı da amaçlar. Yanlış seçilmiş bir klon, ekspresyon analizleri, fonksiyonel çalışmalar veya mutasyon taramaları gibi sonraki aşamalarda yanıltıcı sonuçlara yol açabilir. Bu tür hatalar, genellikle gen aktarım basamağından ziyade, yetersiz veya yüzeysel klon seçimi stratejilerinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla klon seçimi, deneysel sürecin doğruluğunu garanti altına alan erken bir kalite kontrol mekanizması olarak değerlendirilmelidir (Brown, T. A., 2020). Güncel yaklaşımlar, klon seçimini tek aşamalı bir karar noktası olmaktan çıkararak çok basamaklı ve doğrulayıcı bir süreç hâline getirmiştir. Hızlı tarama teknikleriyle elde edilen ön veriler, daha ayrıntılı moleküler analizlerle desteklenmekte ve böylece deneysel güvenilirlik artırılmaktadır. Bu bütüncül yaklaşım, klonlama çalışmalarında zaman ve kaynak kullanımının daha etkin planlanmasına olanak tanırken, deneysel sonuçların tekrarlanabilirliğini de güçlendirmektedir (Primrose et al., 2001; Green & Sambrook, 2012).

Bu çerçevede klon seçiminin deneysel mantığı, genetik doğruluğun erken aşamada güvence altına alınmasına dayanmaktadır. Güncel yaklaşımlar, hız ve doğruluk arasındaki dengeyi gözeterek, klonlama sürecinin ilerleyen basamaklarında karşılaşılabilecek sorunların minimize edilmesini amaçlamaktadır. Bu doğrultuda klon seçimi, rekombinant DNA çalışmalarında yalnızca teknik bir adım değil, deneysel bütünlüğü belirleyen stratejik bir karar alanı olarak ele alınmalıdır (Primrose et al., 2001).

5.4.2. Mavi-Beyaz Tarama: Güncel Kullanımı ve Sınırlılıkları

Mavi-beyaz tarama, rekombinant klonların hızlı biçimde ayırt edilmesini sağlayan klasik bir ön eleme yöntemi olarak moleküler klonlama çalışmalarında uzun süredir kullanılmaktadır. Bu yaklaşım, β -galaktozidaz aktivitesine dayalı görsel bir ayırım sunarak, insert içeren ve içermeyen klonların kısa sürede seçilmesine olanak tanır. Uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle mavi-beyaz tarama, özellikle yüksek sayıda koloni içeren deneysel düzeneklerde pratik bir başlangıç noktası olarak değerlendirilmektedir (Green & Sambrook, 2012; Brown, T. A., 2020). Bu yöntemin temel prensibi, hedef genin lacZ geninin belirli bir bölgesini kesintiye uğratması esasına dayanır. Vektör içerisinde insert bulunmayan klonlarda β -galaktozidaz aktivitesi korunurken, insert içeren klonlarda bu aktivite bozulur. Uygun substratların varlığında bu durum, kolonilerin renk farklılığıyla ayırt edilmesini mümkün kılar. Bu görsel ayırım, kısa sürede çok sayıda klonun taranabilmesini sağlayarak deneysel sürecin erken aşamalarında zaman kazandırmaktadır (Green & Sambrook, 2012).

Bununla birlikte mavi-beyaz tarama, sağladığı pratikliğe karşın genetik doğruluk açısından sınırlı bilgi sunmaktadır. Beyaz koloni oluşumu, insert varlığına işaret etse de insertin doğru boyutta, doğru yönelimde veya mutasyonsuz biçimde vektöre entegre edildiğini garanti etmez. Bu nedenle mavi-beyaz tarama, klon seçimi sürecinde tek başına yeterli bir doğrulama yöntemi olarak değerlendirilmemelidir. Yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkabilmesi, bu yaklaşımın temel sınırlılıkları arasında yer almaktadır (Primrose et al., 2001). Güncel

klonlama uygulamalarında mavi-beyaz tarama, çoğunlukla moleküler doğrulama yöntemleriyle birlikte kullanılan bir ön tarama basamağı olarak konumlandırılmaktadır. Koloni PCR, restriksiyon analizi veya dizileme gibi yöntemlerle desteklenmediği takdirde, yalnızca renk temelli seçime dayanan klonların ileri aşamalarda beklenmeyen sonuçlara yol açma riski bulunmaktadır. Bu durum, mavi-beyaz taramanın deneysel mantık içinde sınırlı fakat işlevsel bir rol üstlendiğini göstermektedir (Primrose et al., 2001).

Deneysel açıdan değerlendirildiğinde, mavi-beyaz taramanın etkinliği vektör tasarımı, konak hücre özellikleri ve kullanılan substrat koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Ayrıca arka plan aktivitesi veya kısmi enzimatik fonksiyon kayıpları, kolonilerin yanlış sınıflandırılmasına neden olabilir. Bu tür teknik belirsizlikler, yöntemin dikkatli yorumlanmasını ve mutlaka ek doğrulama basamaklarıyla desteklenmesini gerektirmektedir (Green & Sambrook, 2012).

Bu bağlamda mavi-beyaz tarama, klon seçimi sürecinde hızlı ve pratik bir ön eleme aracı sunmakla birlikte, genetik doğruluğun kesin olarak gösterilmesi açısından sınırlı bilgi sağlar. Güncel moleküler biyoloji uygulamalarında bu yöntem, kapsamlı doğrulama stratejilerinin bir parçası olarak kullanıldığında anlam kazanmaktadır. Bu yaklaşım, deneysel verimlilik ile genetik güvenilirlik arasında dengeli bir klon seçimi sürecinin oluşturulmasına katkı sağlamaktadır (Primrose et al., 2001).

5.4.3. Koloni PCR: Hız, Özgüllük ve Güncel Optimizasyon Stratejileri

Koloni PCR, klon seçimi sürecinde hedef DNA dizisinin varlığını hızlı ve doğrudan biçimde doğrulamaya olanak tanıyan moleküler bir tarama yaklaşımı olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Bergkessel & Guthrie, 2013; Güssow & Clackson, 1989). Bu yöntemde, bakteriyel kolonilerden saf DNA izolasyonu yapılmaksızın, minimal hücresel materyal doğrudan PCR reaksiyonuna dahil edilir. Bu özellik, koloni PCR'yi zaman ve iş gücü açısından avantajlı bir ön doğrulama aracı hâline getirmektedir (Green & Sambrook, 2012).

Yöntemin temel avantajı, yüksek sayıda klonun kısa sürede taranabilmesidir. Mavi-beyaz tarama gibi fenotipik yaklaşımlarla ön elemeyi geçiren koloniler, koloni PCR aracılığıyla moleküler düzeyde hızla değerlendirilebilir. Bu sayede insert varlığı, yaklaşık boyutu ve belirli bölgelerin amplifikasyonu erken aşamada doğrulanarak, ileri analizlere yalnızca uygun adayların taşınması sağlanır. Bu yaklaşım, deneysel sürecin verimliliğini belirgin biçimde artırmaktadır (Primrose et al., 2001). Bununla birlikte koloni PCR'nin başarısı, özgüllük ve reaksiyon koşullarının dikkatli biçimde optimize edilmesine bağlıdır. Hücresel materyalin doğrudan PCR'a dahil edilmesi, inhibitör bileşenlerin reaksiyonu etkilemesine yol açabilir. Ayrıca aşırı hücre yükü, polimeraz aktivitesini baskılayarak yalnızca negatif sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle koloni miktarının sınırlı tutulması ve uygun ön ısıtma veya hücre lizisi basamaklarının

uygulanması, reaksiyon verimliliği açısından kritik öneme sahiptir (Green & Sambrook, 2012; Bustin et al., 2009).

Primer tasarımı, koloni PCR'nin özgüllüğünü belirleyen en önemli unsurlardan biridir. Insert-spesifik primerler, hedef DNA'nın varlığını doğrudan ortaya koyarken; vektör–insert sınırlarını kapsayan primer kombinasyonları, insertin doğru konumlanmasına ilişkin ek bilgi sağlayabilir. Bu stratejiler, yalnızca insert varlığının değil, aynı zamanda klonlama tasarımına uygunluğun da değerlendirilmesine olanak tanımaktadır (Bergkessel & Guthrie, 2013).

Güncel uygulamalarda koloni PCR, tek başına nihai bir doğrulama yöntemi olarak değil, çok aşamalı klon seçimi stratejisinin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Elde edilen pozitif amplifikasyon sonuçları, çoğunlukla restriksiyon analizi veya dizileme gibi daha ayrıntılı yöntemlerle desteklenmektedir. Bu yaklaşım, koloni PCR'nin sağladığı hız avantajını korurken, yanlış pozitif veya eksik değerlendirme riskini minimize etmektedir (Primrose et al., 2001).

Bu değerlendirme, koloni PCR'nin klon seçimi sürecinde hız ve pratiklik açısından güçlü bir araç sunduğunu göstermektedir. Ancak yöntemin sınırlılıkları göz önünde bulundurulmadığında, elde edilen sonuçların yanlış yorumlanması mümkündür. Bu nedenle koloni PCR, dikkatli optimizasyon ve tamamlayıcı doğrulama basamaklarıyla birlikte kullanıldığında, klonlama çalışmalarında güvenilir bir moleküler tarama yaklaşımı olarak değer kazanmaktadır (Green & Sambrook, 2012; Bustin et al., 2009).

5.4.4. Restriksiyon Haritalama: Klasik Yaklaşımın Güncel Yorumu

Restriksiyon haritalama, rekombinant DNA'nın yapısal bütünlüğünü değerlendirmede uzun yıllardır kullanılan, deneysel olarak güvenilirliği kanıtlanmış bir doğrulama yaklaşımıdır. Bu yöntem, klonlanan DNA'nın belirli restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve ortaya çıkan fragman desenlerinin öngörülen haritayla karşılaştırılması esasına dayanır. Günümüzde daha ileri doğrulama teknikleri yaygınlaşmış olsa da, restriksiyon haritalama hâlen klonlama çalışmalarında önemli bir ara doğrulama basamağı olarak kullanılmaktadır (Green & Sambrook, 2012; Brown, T. A., 2020).

Restriksiyon haritalamanın temel avantajı, klonlanan insertin varlığına ek olarak yönelimi ve yaklaşık boyutu hakkında bilgi sunabilmesidir. Uygun enzim kombinasyonları kullanıldığında, vektör–insert sınırları ve insert içi kesim bölgeleri aynı deneysel düzenek içerisinde değerlendirilebilir. Bu durum, yanlış yönlendirilmiş veya kısmi ligasyon ürünlerinin erken aşamada ayırt edilmesine olanak tanımaktadır (Primrose et al., 2001). Bununla birlikte restriksiyon haritalamanın yorumlanabilirliği, deneysel tasarımın doğruluğuna doğrudan bağlıdır. Yanlış enzim seçimi, kısmi sindirim veya özgül olmayan kesim davranışları, elde edilen bant desenlerinin beklenenden sapmasına yol açabilir. Bu tür teknik sınırlılıklar, yöntemin dikkatli optimizasyon gerektirdiğini ve tek başına nihai doğrulama aracı olarak kullanılmasının uygun olmadığını göstermektedir (Green & Sambrook, 2012).

Güncel klonlama yaklaşımlarında restriksiyon haritalama, çoğunlukla hızlı tarama yöntemleri ile dizileme temelli doğrulama arasında bir ara basamak olarak konumlandırılmaktadır. Koloni PCR gibi yöntemlerle ön doğrulamadan geçirilen klonlar, restriksiyon analiziyle yapısal olarak değerlendirilmekte; ardından seçilen adaylar daha yüksek çözünürlüklü doğrulama tekniklerine yönlendirilmektedir. Bu çok aşamalı yaklaşım, deneysel verimlilik ile genetik doğruluk arasında dengeli bir doğrulama süreci oluşturulmasına katkı sağlamaktadır (Primrose et al., 2001). Restriksiyon haritalamanın güncel yorumunda, yöntemin sağladığı bilginin sınırlı fakat anlamlı olduğu kabul edilmektedir. Nükleotid düzeyinde doğruluk sunmamakla birlikte, büyük ölçekli yapısal hataların tespitinde hâlen etkili bir araçtır. Bu özellik, restriksiyon haritalamayı özellikle zaman ve kaynak kısıtlarının bulunduğu deneysel düzeneklerde değerli kılmaktadır (Green & Sambrook, 2012).

Bu çerçevede restriksiyon haritalama, klasik bir yöntem olmasına karşın güncel klonlama stratejileri içerisinde işlevsel bir yer tutmaya devam etmektedir. Doğru planlandığında ve tamamlayıcı doğrulama teknikleriyle birlikte kullanıldığında, klon seçimi sürecinde güvenilir bir yapısal kontrol basamağı olarak deneysel bütünlüğe katkı sağlamaktadır (Primrose et al., 2001).

5.4.5. Dizileme Temelli Doğrulama: Sanger ve Yeni Nesil Yaklaşımlar

Dizileme temelli doğrulama yöntemleri, klonlama çalışmalarında elde edilen genetik yapıların nükleotid düzeyinde kesin

olarak değerlendirilmesini sağlayan en yüksek çözünürlüklü analitik yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Fenotipik tarama ve moleküler ön doğrulama teknikleri, klon seçimi sürecinde önemli bir eleme sağlasa da, hedef DNA dizisinin bütünlüğü ve doğruluğu ancak dizileme yöntemleriyle güvenilir biçimde ortaya konulabilmektedir. Bu nedenle dizileme, klon doğrulama sürecinin nihai ve belirleyici basamağı olarak değerlendirilmektedir (Goodwin et al., 2016).

Sanger dizileme yöntemi, uzun yıllardır klon doğrulamada altın standart olarak kabul edilen, yüksek doğruluk oranına sahip bir yaklaşımdır. Özellikle tek gen veya sınırlı uzunluktaki insertlerin analizinde sağladığı güvenilirlik, bu yöntemi rutin laboratuvar uygulamalarında yaygın biçimde tercih edilir hâle getirmiştir. Vektör–insert sınırlarının doğrulanması, okuma çerçevesinin kontrolü ve nokta mutasyonlarının tespiti gibi amaçlarla Sanger dizileme, klonlama çalışmalarında kritik bilgiler sunmaktadır (Green & Sambrook, 2012). Bununla birlikte Sanger dizilemenin sınırlı okuma uzunluğu ve düşük throughput kapasitesi, daha karmaşık genetik yapıların analizinde kısıtlayıcı olabilmektedir. Büyük insertler veya çoklu klonların eş zamanlı değerlendirilmesi gereken durumlarda, bu yöntemin zaman ve maliyet açısından dezavantajları ortaya çıkmaktadır. Bu tür senaryolarda dizileme sürecinin aşamalı olarak planlanması veya tamamlayıcı yaklaşımların kullanılması gerekliliği doğmaktadır (Primrose et al., 2001).

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri, yüksek throughput ve paralel okuma kapasitesi sayesinde, çok sayıda klonun veya geniş

genomik bölgelerin aynı anda analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Bu yöntemler, yalnızca hedef insertin doğrulanmasını değil, aynı zamanda istenmeyen mutasyonların, yeniden düzenlenmelerin veya klonlar arası varyasyonların daha kapsamlı biçimde değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu özellik, özellikle büyük ölçekli klonlama projeleri ve ileri genom mühendisliği uygulamalarında NGS yaklaşımlarını cazip hâle getirmektedir (Goodwin et al., 2016; Shapland et al., 2015; van Dijk et al., 2014). Ancak NGS temelli doğrulama stratejileri, veri analizi ve biyoinformatik altyapı gereksinimleri nedeniyle daha karmaşık bir deneysel çerçeve sunmaktadır. Elde edilen yüksek hacimli verinin doğru biçimde işlenmesi ve yorumlanması, teknik uzmanlık ve ek analiz basamakları gerektirmektedir. Bu durum, NGS'nin klon doğrulamada her koşulda birincil tercih olmasını sınırlamakta ve yöntem seçiminin deneysel hedeflere göre yapılmasının önemini ortaya koymaktadır (Currin et al., 2019).

Güncel klonlama stratejilerinde dizileme temelli doğrulama, çoğunlukla çok aşamalı bir yaklaşımın son basamağı olarak konumlandırılmaktadır. Ön tarama ve yapısal analizlerle aday klonlar daraltıldıktan sonra, seçilen klonların dizileme yoluyla kesin olarak doğrulanması, deneysel güvenilirliği önemli ölçüde artırmaktadır. Bu yaklaşım, zaman ve kaynak kullanımını optimize ederken, genetik doğruluk açısından yüksek bir güvence sağlamaktadır (Gallegos et al., 2020; Brown et al., 2023).

Bu doğrultuda dizileme temelli doğrulama yöntemleri, klonlama çalışmalarında elde edilen genetik yapıların kesin ve ayrıntılı biçimde değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Sanger ve yeni nesil dizileme yaklaşımlarının avantajları ve sınırlılıklarının bilinçli biçimde değerlendirilmesi, klon doğrulama stratejilerinin deneysel bağlama uygun şekilde planlanmasına katkı sağlamaktadır (Primrose et al., 2001).

5.4.6. Yanlış Pozitif ve Yanlış Negatif Senaryolar

Klon seçimi ve doğrulama süreçlerinde kullanılan tarama ve analitik yöntemler, her ne kadar yüksek güvenilirlik sunmayı amaçlasa da, belirli koşullar altında yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu tür senaryolar, klonlama çalışmalarında deneysel hataların önemli bir kaynağını oluşturmakta ve elde edilen verilerin yorumlanmasını güçleştirmektedir. Yanlış sonuçların temel nedenlerinin anlaşılması, doğrulama stratejilerinin daha bilinçli biçimde yapılandırılmasına katkı sağlamaktadır (Watson et al., 2013; Green & Sambrook, 2012).

Yanlış pozitif sonuçlar, genellikle hedef genetik yapının mevcut olmadığı hâlde, kullanılan tarama yönteminin pozitif sinyal üretmesi durumunda ortaya çıkar. Mavi-beyaz tarama gibi fenotipik yaklaşımlarda, β -galaktozidaz aktivitesinin kısmi baskılanması veya arka plan etkileri, insert içermeyen klonların yanlışlıkla pozitif olarak sınıflandırılmasına yol açabilir. Benzer şekilde koloni PCR uygulamalarında, özgül olmayan primer bağlanmaları veya kontaminasyon, gerçekte mevcut olmayan hedef dizilerin

amplifikasyonuna neden olabilir (Green & Sambrook, 2012; Bergkessel & Guthrie, 2013). Yanlış negatif sonuçlar ise hedef genetik yapının gerçekten mevcut olduğu hâlde, kullanılan yöntemin bunu tespit edememesi durumunda ortaya çıkar. Koloni PCR’de hücresel inhibitörlerin reaksiyonu baskılaması, restriksiyon sindiriminde kısmi kesimler veya düşük verimli ligasyon ürünleri, doğru klonların gözden kaçmasına neden olabilir. Bu tür durumlar, özellikle tarama basamaklarının aşırı katı yorumlandığı deneysel düzeneklerde deneysel kayıplara yol açabilmektedir (Green & Sambrook, 2012; Birnboim & Doly, 1979).

Bu senaryoların ortaya çıkmasında yöntemlerin teknik sınırlılıkları kadar, deneysel koşulların yetersiz optimizasyonu da etkili olmaktadır. Primer tasarımıındaki hatalar, uygunsuz enzim konsantrasyonları veya reaksiyon sürelerinin doğru ayarlanmaması hem yanlış pozitif hem de yanlış negatif sonuçların olasılığını artırmaktadır. Bu nedenle doğrulama yöntemlerinin uygulanması, standart protokollerin mekanik olarak izlenmesinden ziyade, deneysel bağlama göre bilinçli biçimde uyarlanmalıdır (Bustin et al., 2009; Primrose et al., 2001). Güncel klonlama stratejilerinde yanlış sonuçların etkisini azaltmak amacıyla, tek bir doğrulama yöntemine dayalı karar verme yaklaşımından kaçınılmaktadır. Bunun yerine, farklı prensiplere dayanan birden fazla tarama ve doğrulama basamağının birlikte kullanılması önerilmektedir. Bu çoklu doğrulama yaklaşımı, yöntemlere özgü hataların dengelenmesine ve daha güvenilir klon

seçiminin yapılmasına olanak tanımaktadır (Primrose et al., 2001; Watson et al., 2013).

Bu çerçevede yanlış pozitif ve yanlış negatif senaryolar, klonlama çalışmalarının kaçınılmaz bir parçası olarak değerlendirilmeli ve deneysel tasarım bu olasılıklar dikkate alınarak yapılandırılmalıdır. Yöntemlerin sınırlılıklarının farkında olunması ve doğrulama basamaklarının birbirini tamamlayacak biçimde planlanması, klon seçimi sürecinde deneysel güvenilirliğin artırılmasına önemli katkı sağlamaktadır (Green & Sambrook, 2012; Watson et al., 2013).

5.4.7. Çok Aşamalı Doğrulama Stratejileri

Klonlama çalışmalarında tek bir tarama veya doğrulama yöntemine dayalı karar verme yaklaşımı, genetik doğruluğun güvence altına alınması açısından çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Her yöntemin kendine özgü teknik sınırlılıkları ve hata olasılıkları bulunması, klon seçiminin çok aşamalı ve tamamlayıcı stratejiler çerçevesinde ele alınmasını gerekli kılmaktadır. Bu yaklaşım, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların etkisini azaltarak deneysel güvenilirliği artırmayı amaçlamaktadır (Primrose et al., 2001; Green & Sambrook, 2012). Çok aşamalı doğrulama stratejileri, genellikle hızlı ve düşük maliyetli tarama yöntemleriyle başlar. Fenotipik seçim veya koloni PCR gibi yaklaşımlar, geniş klon popülasyonları içerisinde potansiyel adayların erken aşamada belirlenmesini sağlar. Bu ön eleme basamağı, deneysel sürecin verimli biçimde ilerlemesine katkı sağlarken, ayrıntılı doğrulama gerektiren klon sayısını da

sınırlandırmaktadır (Bergkessel & Guthrie, 2013; Güssow & Clackson, 1989).

Ön taramadan geçen klonlar, yapısal doğrulama basamaklarıyla daha ayrıntılı biçimde değerlendirilir. Restriksiyon haritalama gibi yöntemler, insertin varlığına ek olarak yönelimi ve yaklaşık boyutu hakkında bilgi sunarak, klonlama tasarımına uyumsuz yapıların elenmesine olanak tanır. Bu aşama, genetik yapının genel bütünlüğünün kontrol edilmesi açısından önemli bir ara basamak olarak işlev görmektedir (Primrose et al., 2001).

Çok aşamalı doğrulamanın son basamağında ise dizileme temelli yaklaşımlar devreye girmektedir. Sanger veya yeni nesil dizileme yöntemleriyle yapılan analizler, hedef DNA dizisinin nükleotid düzeyinde doğrulanmasını sağlayarak, önceki basamaklarda tespit edilemeyen küçük mutasyonların veya yeniden düzenlenmelerin ortaya çıkarılmasına olanak tanır. Bu nihai doğrulama, klonlama sürecinde genetik doğruluğun kesin olarak güvence altına alındığı aşamayı temsil etmektedir (Goodwin et al., 2016; Shapland et al., 2015; van Dijk et al., 2014). Bu stratejinin temel avantajı, her bir yöntemin güçlü yönlerinden yararlanılırken, sınırlılıklarının diğer yöntemler tarafından dengelenmesidir. Hızlı tarama yaklaşımları deneysel zaman kazandırırken, yüksek çözünürlüklü doğrulama teknikleri genetik doğruluğun derinlemesine değerlendirilmesini mümkün kılar. Böylece deneysel süreç, hem verimli hem de güvenilir bir yapı kazanır (Currin et al., 2019; Gallegos et al., 2020; Brown et al., 2023).

Bu bağlamda çok aşamalı doğrulama stratejileri, klonlama çalışmalarında deneysel hataların minimize edilmesi ve genetik doğruluğun güvence altına alınması açısından merkezi bir rol üstlenmektedir. Farklı prensiplere dayanan yöntemlerin bilinçli biçimde bir araya getirilmesi, klon seçimi sürecinin rastlantısal olmaktan çıkarak sistematik ve öngörülebilir bir yapıya kavuşmasını sağlamaktadır. Bu yaklaşım, rekombinant DNA çalışmalarında güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinin temelini oluşturmaktadır (Primrose et al., 2001; Green & Sambrook, 2012; Gibson et al., 2009; Engler et al., 2008; de Kok et al., 2014)

5.5. Genom Düzenleme Yaklaşımları: CRISPR-Cas Sistemleri ve Güncel Uygulamalar

CRISPR-Cas9 teknolojisi, genom üzerinde hedefe yönelik ve programlanabilir değişiklikler yapılmasını mümkün kılan, modern genetik mühendisliğinin en dönüştürücü araçlarından biri olarak değerlendirilmektedir (Doudna & Charpentier, 2014; Hsu et al., 2014). Bu sistemin önemi, yalnızca genetik materyalin kesilmesine olanak tanımasından değil, bu kesimlerin hücresel onarım mekanizmalarıyla birlikte kontrollü genetik değişikliklere dönüştürülebilmesinden kaynaklanmaktadır (Jinek et al., 2012; Hsu et al., 2014). Bu yönüyle CRISPR-Cas9, klasik rekombinant DNA yaklaşımlarının ötesine geçerek genom düzenlemesini daha esnek, daha hızlı ve daha erişilebilir bir düzleme taşımıştır (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019; (Anzalone et al., 2020).

CRISPR-Cas9'un deneysel değerini belirleyen temel unsur, hedef özgülüğünün rehber RNA aracılığıyla yönlendirilebilmesidir (Mali et al., 2013; Doench, 2018). Bu yapı, gen düzenleme sürecini sabit enzim dizilerine bağımlı olmaktan çıkarak, deneysel tasarımın araştırma sorusuna göre yeniden şekillendirilebilmesine olanak tanır. Böylece genetik müdahale, rastlantısal entegrasyonlara dayanan klasik yöntemlerden farklı olarak, önceden öngörülebilir ve tekrarlanabilir bir çerçeve kazanmıştır (Doench, 2018; Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). Bu teknolojinin laboratuvar uygulamalarında yaygın biçimde benimsenmesinin bir diğer nedeni, farklı hücre tipleri ve organizma sistemleriyle uyumlu çalışabilmesidir (Hsu et al., 2014). Hücresel bağlama göre değişen onarım yanıtları, CRISPR-Cas9'un yalnızca bir kesme aracı olarak değil, aynı zamanda hücresel genetik dinamikleri anlamaya yönelik bir deneysel platform olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Bu durum, sistemin fonksiyonel genomik çalışmalarda merkezi bir konum kazanmasına katkı sağlamıştır (Anzalone et al., 2020).

Bununla birlikte CRISPR-Cas9 uygulamaları, mutlak doğruluk ve sınırsız kontrol vadeden bir yaklaşım olarak değerlendirilmemelidir. Hedef dışı etkiler, hücresel onarım yollarının öngörülemeyen sonuçları ve deneysel koşullara bağı değişkenlikler, bu teknolojinin dikkatli ve çok aşamalı doğrulama stratejileriyle kullanılmasını gerekli kılmaktadır (Zhang, X.-H. et al., 2015; Haeussler et al., 2016; Śledziński et al., 2021). Bu bağlamda CRISPR-Cas9, yüksek potansiyele sahip olmakla

birlikte, metodolojik sınırları göz ardı edildiğinde yanıltıcı sonuçlar üretebilecek bir sistem olarak ele alınmalıdır.

Bu bölümde CRISPR-Cas9 teknolojisinin biyolojik temelleri, moleküler çalışma prensipleri ve laboratuvar uygulamaları, deneysel bağlam ve metodolojik sınırlılıklar dikkate alınarak ele alınacaktır. Sistematik bir çerçeve içerisinde değerlendirilen bu yaklaşım, gen düzenleme çalışmalarında güvenilir ve yorumlanabilir sonuçlar elde edilmesi açısından gerekli olan kavramsal altyapıyı ortaya koymayı amaçlamaktadır (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017).

5.5.1. CRISPR-Cas Sistemlerinin Biyolojik Kökeni ve Moleküler Temeli

CRISPR-Cas sistemleri, bakteriler ve arkelerde evrimleşmiş, yabancı genetik materyale karşı özgül ve adaptif bir savunma mekanizması olarak tanımlanmaktadır (Barrangou & Marraffini, 2014; Koonin et al., 2017). Bu sistemin biyolojik önemi, hücrelerin daha önce karşılaştıkları istilacı nükleik asitlere ait bilgiyi genetik hafıza biçiminde saklayabilmesinden kaynaklanmaktadır. Böylece prokaryotik hücreler, tekrarlayan enfeksiyonlara karşı daha hızlı ve hedefe yönelik bir yanıt geliştirebilmektedir. CRISPR-Cas sistemlerinin bu adaptif niteliği, klasik bağışıklık yaklaşımlarından ayrılarak onları moleküler düzeyde benzersiz kılmaktadır. Sistemin temelinde, genomda düzenli aralıklarla yerleşmiş kısa tekrar dizileri ile bu tekrarlar arasına entegre edilen yabancı DNA kökenli spacer dizileri bulunmaktadır (Barrangou & Marraffini, 2014). Spacer diziler, önceki

enfeksiyonlardan türetilmiş genetik izleri temsil ederken, tekrar dizileri bu yapının stabilitesini ve işlenebilirliğini sağlamaktadır. Bu düzenleme, hücrenin genetik belleğini fonksiyonel bir savunma aracına dönüştüren temel mimariyi oluşturmaktadır.

CRISPR lokusundan transkribe edilen RNA öncülleri, hücre içerisinde işlenerek kısa rehber RNA'lara dönüştürülür. Bu rehber RNA'lar, Cas proteinleriyle kompleks oluşturarak hedef DNA dizilerinin tanınmasını mümkün kılar (Jinek et al., 2012). Hedef özgüllüğün bu şekilde RNA–DNA eşleşmesine dayanması, sistemin biyolojik esnekliğini ve programlanabilirliğini açıklayan temel unsurlardan biridir. Bu mekanizma sayesinde hücre, istilacı DNA'yı yüksek özgüllükle ayırt edebilmekte ve etkili biçimde etkisiz hâle getirebilmektedir.

CRISPR-Cas sistemlerinin moleküler temeli yalnızca hedef tanıma ile sınırlı değildir; aynı zamanda hedef DNA'nın parçalanmasını sağlayan enzimatik aktiviteleri de içermektedir. Cas proteinleri, rehber RNA tarafından yönlendirilen hedef bölgede çift iplikli DNA kırıkları oluşturarak yabancı genetik materyalin işlevini ortadan kaldırır (Hsu et al., 2014). Bu kesim olayları, savunma mekanizmasının etkinliğini belirleyen kritik basamaklar arasında yer almaktadır. Bu biyolojik sistemin laboratuvar ortamına uyarlanması, doğal bir savunma mekanizmasının kontrollü bir gen düzenleme aracına dönüştürülmesini mümkün kılmıştır (Doudna & Charpentier, 2014). Ancak bu dönüşüm, CRISPR-Cas sistemlerinin doğrudan ve sorunsuz biçimde uygulanabileceği anlamına gelmemektedir. Doğal bağlamda

evrimleşmiş olan bu mekanizma, hücresel onarım süreçleri, hedef dışı etkileşimler ve bağlama özgü değişkenlikler nedeniyle deneysel kullanımlarda dikkatli bir değerlendirme gerektirmektedir (Koonin et al., 2017; Śledziński et al., 2021).

Bu çerçevede CRISPR-Cas sistemlerinin biyolojik kökeni, bu teknolojinin neden yüksek özgüllük ve esneklik sunduğunu açıklayan temel bir zemin sağlamaktadır (Koonin et al., 2017). Moleküler temellerin ayrıntılı biçimde anlaşılması, CRISPR-Cas9'un gen düzenleme uygulamalarında bilinçli ve kontrollü biçimde kullanılmasının ön koşulu olarak değerlendirilmektedir. Bu biyolojik altyapı, sonraki alt başlıklarda ele alınacak olan mekanistik ve metodolojik yaklaşımlar için kavramsal bir zemin oluşturmaktadır (Barrangou & Marraffini, 2014).

5.5.2. Cas9 Aracılı DNA Kırığı ve Hücresel Onarım Yolları

CRISPR-Cas9 sisteminin genom düzenleme kapasitesi, Cas9 endonükleazının hedef DNA üzerinde oluşturduğu çift iplikli kırıklar üzerinden şekillenmektedir (Jinek et al., 2012; Hsu et al., 2014). Bu kırıklar, genetik materyalin doğrudan değiştirilmesini sağlamaz; aksine hücrenin doğal DNA onarım mekanizmalarını devreye sokarak düzenlemenin gerçekleşmesine zemin hazırlar. Bu nedenle CRISPR-Cas9'un deneysel çıktıları, Cas9'un kesim etkinliği kadar, hücresel onarım yollarının nasıl ve hangi koşullarda çalıştığıyla da doğrudan ilişkilidir. Cas9 tarafından oluşturulan çift iplikli DNA kırıkları, hücre için ciddi bir genotoksik stres sinyali olarak algılanır. Hücre bu hasarı onarmak amacıyla başlıca iki temel onarım yolunu aktive eder: uç

birleştirme temelli hızlı onarım mekanizmaları ve homolog şablona dayalı daha kontrollü onarım süreçleri (Hsu et al., 2014; Zhang, X.-H. et al., 2015). Bu yolların hangisinin baskın hâle geleceği, hücre tipi, hücre döngüsünün evresi ve deneysel koşullar gibi birçok değişkene bağlı olarak farklılık gösterebilir.

Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yolu, çift iplikli kırıkların hızlı biçimde onarılmasını sağlayan, ancak yüksek doğruluk sunmayan bir mekanizmadır (Zhang, X.-H. et al., 2015). Bu süreçte kırık uçlar doğrudan birleştirilir ve çoğu zaman küçük ekleme veya silinmeler meydana gelir. CRISPR-Cas9 uygulamalarında bu özelliğin, hedef genin fonksiyonunun bozulması amacıyla bilinçli biçimde kullanıldığı görülmektedir. NHEJ'nin hata eğilimli yapısı, gen susturma veya fonksiyon kaybı çalışmalarında deneysel avantaj sağlamaktadır. Buna karşılık homolog rekombinasyon temelli onarım (HDR), hücreye sunulan homolog bir DNA şablonunun kullanılmasıyla daha kontrollü genetik değişikliklerin yapılmasına olanak tanır (Anzalone et al., 2020). Bu yol, belirli nükleotid değişikliklerinin eklenmesi, etiketlenmiş genlerin oluşturulması veya hassas genom düzenlemeleri için tercih edilmektedir. Ancak HDR'nin etkinliği, hücre döngüsünün belirli evreleriyle sınırlı olması nedeniyle genellikle NHEJ'ye kıyasla daha düşüktür. Bu durum, deneysel tasarımda onarım yolunun yönlendirilmesine yönelik stratejilerin önemini artırmaktadır.

Cas9 aracılı kırıkların hücresel yanıtları, yalnızca hedef bölgede gerçekleşen değişikliklerle sınırlı değildir. DNA hasar yanıtı (DDR) yolaklarının aktivasyonu, hücre döngüsünde geçici duraklamalara veya

bazı durumlarda apoptoza yol açabilir (Vakulskas et al., 2018). Bu tür yan etkiler, özellikle hassas hücre tiplerinde CRISPR-Cas9 uygulamalarının dikkatli biçimde optimize edilmesini gerektirmektedir. Bu bağlamda gen düzenleme verimliliği ile hücresel canlılık arasında hassas bir denge kurulması gerekmektedir (Śledziński et al., 2021).

Bu değerlendirme, Cas9 aracılı DNA kırıklarının genom düzenlemenin tetikleyici unsuru olduğunu; ancak elde edilen genetik sonuçların büyük ölçüde hücresel onarım yollarının doğasına bağlı biçimde şekillendiğini göstermektedir. NHEJ ve HDR mekanizmalarının moleküler temellerinin anlaşılması, CRISPR-Cas9 deneylerinin öngörülebilir ve kontrollü biçimde tasarlanmasının temelini oluşturmaktadır. Bu bilgi, sonraki alt başlıklarda ele alınacak olan hedef özgüllüğü ve sistematik sınırlılıkların daha iyi yorumlanmasına olanak tanımaktadır (Hsu et al., 2014; (Anzalone et al., 2020).

5.5.3. gRNA Tasarımı ve Hedef Özgüllüğün Belirlenmesi

CRISPR-Cas9 sisteminin deneysel başarısı, büyük ölçüde rehber RNA'nın (gRNA) hedef DNA dizisini ne ölçüde doğru ve seçici biçimde yönlendirebildiğine bağlıdır (Doench, 2018). gRNA tasarımı, yalnızca hedef dizinin tanımlanmasından ibaret olmayıp, aynı zamanda sistemin özgüllüğünü ve güvenilirliğini belirleyen temel bir karar aşamasını temsil etmektedir. Bu nedenle gRNA tasarımı, CRISPR-Cas9 uygulamalarında mekanik bir adım değil, deneysel sonuçları doğrudan şekillendiren stratejik bir süreç olarak ele alınmalıdır.

gRNA'nın hedef özgüllüğü, rehber dizinin hedef DNA ile kurduğu baz eşleşmesinin doğruluğuna dayanmaktadır. Bu eşleşmenin özellikle protospacer bitişik motifi (PAM) komşuluğundaki bölgelerde yüksek uyum göstermesi, Cas9'un kesim etkinliğini belirleyen kritik bir unsurdur (Concordet & Haeussler, 2018). Hedef dizideki küçük uyumsuzluklar dahi, kesim verimliliğini düşürebileceği gibi bazı durumlarda hedef dışı bölgelerde istenmeyen etkileşimlerin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Bu durum, gRNA tasarımı yalnızca hedeflenen genin değil, genomun bütününe dikkate alınmasını gerekli kılmaktadır. Deneysel açıdan gRNA tasarımı, hedef dizinin genom içerisindeki benzersizliğinin değerlendirilmesini de kapsar. Benzer dizilerin genomun farklı bölgelerinde bulunması, Cas9'un hedef dışı kesimler yapma olasılığını artırmaktadır (Haeussler et al., 2016). Bu nedenle gRNA dizileri belirlenirken, potansiyel eşleşme bölgeleri ve kısmi uyumluluk gösteren diziler önceden analiz edilmeli ve özgüllüğü en yüksek adaylar tercih edilmelidir. Bu yaklaşım, deneysel sonuçların yorumlanabilirliğini artıran önemli bir güvenlik katmanı oluşturmaktadır.

gRNA tasarımı dikkate alınması gereken bir diğer unsur, hedef bölgenin kromatin yapısı ve erişilebilirliğidir. Yoğun biçimde paketlenmiş heterokromatin bölgeleri, Cas9-gRNA kompleksinin hedef DNA'ya erişimini sınırlayabilirken, daha açık kromatin bölgeleri kesim için daha elverişli bir ortam sunmaktadır (Doench, 2018). Bu bağlamda hedef özgüllüğü, yalnızca dizisel uyumla değil, hücresel bağlamda DNA'nın fiziksel erişilebilirliğiyle de ilişkilidir. Güncel

CRISPR-Cas9 uygulamalarında gRNA tasarımı, genellikle birden fazla aday dizinin paralel olarak değerlendirilmesini içeren deneysel stratejilerle desteklenmektedir (Concordet & Haeussler, 2018). Farklı gRNA'ların aynı hedef gen üzerinde test edilmesi, hem kesim verimliliğinin hem de hedef dışı etkilerin karşılaştırmalı olarak analiz edilmesine olanak tanır. Bu yaklaşım, tek bir gRNA'ya dayalı sonuçların yaratabileceği deneysel belirsizlikleri azaltmaktadır.

Bu bağlamda gRNA tasarımı ve hedef özgüllüğün belirlenmesi, CRISPR-Cas9 sisteminin güvenilir ve kontrollü biçimde kullanılmasının temelini oluşturmaktadır. Hedef dizinin genomik bağlamı, potansiyel hedef dışı etkileşimler ve kromatin erişilebilirliği gibi faktörlerin birlikte değerlendirilmesi, gen düzenleme çalışmalarında istenmeyen sonuçların minimize edilmesine katkı sağlamaktadır. Bu bütüncül yaklaşım, CRISPR-Cas9 teknolojisinin deneysel potansiyelinin bilinçli biçimde ortaya konulmasını mümkün kılmaktadır (Doench, 2018; Haeussler et al., 2016).

5.5.4. Off-Target Etkiler ve Sistemik Sınırlılıklar

CRISPR-Cas9 teknolojisinin deneysel gücü, hedefe yönelik genom düzenleme kapasitesinden kaynaklanmakla birlikte, bu gücün beraberinde getirdiği bazı sistemik sınırlılıklar da bulunmaktadır. Off-target etkiler olarak tanımlanan bu durum, Cas9–gRNA kompleksinin hedeflenen dizinin dışında, genomun farklı bölgelerinde istenmeyen kesimler gerçekleştirilmesiyle ortaya çıkmaktadır (Zhang, X.-H. et al., 2015). Bu tür etkiler, gen düzenleme sonuçlarının yorumlanabilirliğini

ve biyolojik güvenilirliğini doğrudan etkileyen önemli bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir.

Off-target kesimlerin temelinde, gRNA ile hedef DNA arasındaki dizisel benzerlikler yer almaktadır. Özellikle kısa uyumsuzluklar içeren bölgeler, Cas9'un tolerans sınırları içinde kalabildiğinde, hedef dışı kesimlerin gerçekleşmesine zemin hazırlayabilmektedir (Haeussler et al., 2016). Bu durum, gRNA tasarımıyla yalnızca ideal hedef dizinin değil, potansiyel benzer dizilerin de dikkate alınmasını gerekli kılmaktadır. Aksi takdirde elde edilen fenotipik değişikliklerin, hedef gen düzenlemesinden mi yoksa istenmeyen genomik müdahalelerden mi kaynaklandığını ayırt etmek güçleşmektedir.

Sistematik sınırlılıkların bir diğer boyutu, hücresel bağlama özgü değişkenliklerden kaynaklanmaktadır. Farklı hücre tipleri, kromatin organizasyonu, DNA onarım kapasitesi ve hücresel stres yanıtları açısından önemli farklılıklar göstermektedir (Śledziński et al., 2021). Bu durum, aynı CRISPR-Cas9 tasarımının farklı hücresel ortamlarda farklı sonuçlar üretmesine neden olabilmektedir. Dolayısıyla gen düzenleme verimliliği ve özgüllüğü, yalnızca moleküler tasarıma değil, hücresel fizyolojiye de doğrudan bağlıdır. Cas9'un oluşturduğu çift iplikli DNA kırıklarının hücresel onarım süreçleriyle etkileşimi de sistematik sınırlılıkların önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Hata eğilimli onarım yollarının baskın olduğu koşullarda, hedeflenen düzenlemenin ötesinde beklenmeyen mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Vakulskas et al., 2018). Bu durum,

özellikle hassas genetik değişikliklerin amaçlandığı deneysel düzeneklerde, elde edilen sonuçların dikkatli biçimde doğrulanmasını zorunlu kılmaktadır.

Off-target etkilerin değerlendirilmesi ve sınırlandırılması amacıyla, CRISPR-Cas9 uygulamalarında çok aşamalı doğrulama ve kontrol stratejileri giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Farklı gRNA'ların karşılaştırmalı kullanımı, bağımsız klonların analiz edilmesi ve genetik değişikliklerin çoklu yöntemlerle doğrulanması, sistematik hataların ayıklanmasına katkı sağlamaktadır (Kleinstiver et al., 2016). Bu yaklaşımlar, gen düzenleme sonuçlarının güvenilirliğini artıran önemli deneysel önlemler arasında yer almaktadır.

Bu çerçevede off-target etkiler ve sistematik sınırlılıklar, CRISPR-Cas9 teknolojisinin mutlak doğruluk sunan bir araç olarak değil, dikkatli planlama ve kapsamlı doğrulama gerektiren güçlü bir deneysel sistem olarak ele alınmasını gerekli kılmaktadır. Bu sınırlılıkların farkında olunması, gen düzenleme çalışmalarında elde edilen bulguların daha sağlıklı biçimde yorumlanmasına ve metodolojik hataların minimize edilmesine katkı sağlamaktadır (Zhang, X.-H. et al., 2015; Haeussler et al., 2016).

5.5.5. Laboratuvar Uygulamaları ve Deneysel Doğrulama Stratejileri

CRISPR-Cas9 teknolojisinin laboratuvar ortamında uygulanması, moleküler tasarımın ötesinde, deneysel sürecin her aşamasında dikkatli planlama ve doğrulama gerektiren çok katmanlı bir yaklaşımı zorunlu kılmaktadır (Mali et al., 2013). Gen düzenleme

deneylerinde elde edilen sonuçların güvenilirliği, yalnızca Cas9 ve gRNA bileşenlerinin doğru biçimde tasarlanmasına değil, aynı zamanda bu bileşenlerin hücresel sistemlere nasıl sunulduğuna ve düzenleme sonrası değişikliklerin nasıl değerlendirildiğine de bağlıdır. Laboratuvar uygulamalarında ilk kritik aşama, CRISPR-Cas9 bileşenlerinin hücrelere aktarılmasıdır. Plazmid temelli sistemler, mRNA veya ribonükleoprotein kompleksleri gibi farklı aktarım formatları, deneysel hedeflere göre değişen avantajlar sunmaktadır (Vakulskas et al., 2018). Geçici ekspresyon sağlayan yaklaşımlar, hedef dışı etkilerin sınırlandırılması açısından tercih edilirken; daha uzun süreli ekspresyon gerektiren düzenlemelerde alternatif stratejiler devreye girmektedir. Bu seçim, deneysel sonuçların yorumlanabilirliği üzerinde doğrudan etkiye sahiptir.

Gen düzenleme sonrası doğrulama stratejileri, elde edilen genetik değişikliklerin varlığını ve niteliğini ortaya koymayı amaçlar. İlk aşamada, PCR temelli analizler veya restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan taramalar, hedef bölgede bir değişiklik olup olmadığına dair hızlı bir ön değerlendirme sağlar (Hsu et al., 2014). Bu yaklaşımlar, yüksek sayıda örneğin kısa sürede analiz edilmesine olanak tanıyarak deneysel verimliliği artırmaktadır. Bununla birlikte bu ön tarama yöntemleri, genetik değişikliklerin tam yapısı hakkında sınırlı bilgi sunar. Bu nedenle dizileme temelli doğrulama stratejileri, CRISPR-Cas9 uygulamalarında merkezi bir rol üstlenmektedir. Hedef bölgenin dizilenmesi, istenen mutasyonların doğru biçimde oluşturulup oluşturulmadığını ve beklenmeyen ek değişikliklerin ortaya çıkıp

çıkmadığını değerlendirmeyi mümkün kılar. Bu aşama, gen düzenleme deneylerinin nihai doğrulama basamağı olarak kabul edilmektedir (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019; Anzalone et al., 2020).

Deneyisel doğrulamanın bir diğer önemli boyutu, biyolojik sonuçların değerlendirilmesidir. Genetik değişikliklerin fenotipik yansımaları, hücresel fonksiyon, gen ekspresyon düzeyi veya protein aktivitesi gibi parametreler üzerinden analiz edilmelidir (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). Bu tür fonksiyonel doğrulamalar, moleküler düzeyde tespit edilen değişikliklerin biyolojik anlam taşıyıp taşımadığını ortaya koyarak, gen düzenleme çalışmalarının yorumlanabilirliğini güçlendirmektedir.

Bu doğrultuda CRISPR-Cas9'un laboratuvar uygulamaları, yalnızca genetik müdahalenin gerçekleştirilmesiyle sınırlı değildir; aynı zamanda bu müdahalenin çok yönlü ve aşamalı doğrulama stratejileriyle desteklenmesini gerektirir. Moleküler, dizisel ve fonksiyonel analizlerin birlikte kullanılması, gen düzenleme deneylerinde güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesinin temelini oluşturmaktadır (Mali et al., 2013; Vakulskas et al., 2018).

5.5.6. Etik, Güvenlik ve Metodolojik Sınırlar

CRISPR-Cas9 teknolojisinin sağladığı yüksek düzeyde kontrol ve esneklik, gen düzenleme çalışmalarında önemli fırsatlar sunarken, bu gücün beraberinde getirdiği etik, güvenlik ve metodolojik sınırların da dikkatle değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır. Genom üzerinde hedefe yönelik müdahalelerin mümkün hâle gelmesi, yalnızca teknik bir ilerleme değil; aynı zamanda biyolojik sistemlere müdahalenin

sınırları konusunda yeni sorumluluk alanları doğuran bir gelişme olarak ele alınmalıdır (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017).

Etik açıdan değerlendirildiğinde, CRISPR-Cas9 uygulamalarının sonuçları, deneysel bağlamın ötesine taşabilen etkiler yaratma potansiyeline sahiptir. Somatik hücrelerde gerçekleştirilen gen düzenleme çalışmaları, temel araştırma ve potansiyel terapötik uygulamalar açısından geniş kabul görürken; germ hattı hücrelerinde yapılan müdahaleler, kalıtsal değişikliklere yol açma olasılığı nedeniyle daha karmaşık etik tartışmaları beraberinde getirmektedir (Baylis, 2020; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). Bu ayrım, gen düzenleme çalışmalarında hangi hedeflerin bilimsel olarak anlamlı ve toplumsal olarak kabul edilebilir olduğu sorusunu merkezî hâle getirmektedir. Güvenlik boyutu, CRISPR-Cas9 teknolojisinin deneysel kullanımlarında en kritik değerlendirme alanlarından biridir. Off-target etkiler, istenmeyen genomik değişiklikler ve hücresel stres yanıtları, gen düzenleme sonuçlarının öngörülemez hâle gelmesine neden olabilir (Śledziński et al., 2021). Bu tür riskler, özellikle klinik veya translasyonel hedefler içeren çalışmalarda, kapsamlı ön testlerin ve çok aşamalı doğrulama stratejilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Güvenlik değerlendirmeleri, yalnızca hedeflenen genetik değişikliğin başarısına değil, hücresel ve genomik bütünlüğün korunmasına da odaklanmalıdır.

Metodolojik sınırlar ise CRISPR-Cas9'un mutlak doğruluk ve evrensel uygulanabilirlik sunan bir sistem olmadığını göstermektedir.

Hücre tipine bağlı değişkenlikler, onarım mekanizmalarının öngörülemeyen davranışları ve deneysel koşullara duyarlılık, elde edilen sonuçların bağlama özgü biçimde yorumlanmasını gerekli kılmaktadır (Nidhi et al., 2021). Aynı gen düzenleme stratejisinin farklı hücresel sistemlerde farklı çıktılar üretmesi, yöntemin standartlaştırılmasının önünde önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu sınırlılıkların farkında olunması, CRISPR-Cas9 teknolojisinin potansiyelini azaltan bir unsur olarak değil, bilinçli ve sorumlu kullanımın temel bir bileşeni olarak değerlendirilmelidir. Etik ve güvenlik çerçevelerinin deneysel tasarıma entegre edilmesi, gen düzenleme çalışmalarının hem bilimsel hem de toplumsal açıdan sürdürülebilirliğini güçlendirmektedir (Baylis, 2020; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017).

Bu bağlamda CRISPR-Cas9 teknolojisinin etik, güvenlik ve metodolojik sınırları, bu sistemin yalnızca ne kadar güçlü olduğunu değil, nasıl ve hangi koşullarda kullanılmasının uygun olduğunu da tanımlamaktadır. Bu sınırların açık biçimde kabul edilmesi ve deneysel tasarımlara yansıtılması, gen düzenleme çalışmalarında bilimsel sorumluluğun temel bir gereği olarak değerlendirilmektedir (Śledziński et al., 2021).

SONUÇ

Rekombinant DNA teknolojilerinin deneysel başarısı, yalnızca genetik materyalin kesilmesi, taşınması veya hücrelere aktarılmasıyla açıklanamayacak kadar çok aşamalı ve birbirine bağlı bir süreç mantığına dayanmaktadır. Bu bölüm boyunca ele alınan restriksiyon

enzimleri ve DNA ligasyonu, vektör sistemleri, transformasyon ve transfeksiyon yaklaşımları ile klon seçimi ve doğrulama stratejileri; genetik manipülasyonun her basamağında doğruluk, tekrarlanabilirlik ve öngörülebilirlik hedeflerinin nasıl kurulduğunu ortaya koymaktadır. Kesim özgüllüğü, uç tipi seçimi ve ligasyon dinamikleri gibi erken aşama parametreler, downstream klonlama verimini ve doğrulama gereksinimini doğrudan şekillendirirken; vektörün yapısal bileşenleri ve konak uyumu, genetik bilginin hücresel ortamda stabil biçimde korunması ve ifade edilebilir hâle gelmesi açısından belirleyici rol üstlenmektedir.

Gen aktarımının transformasyon ve transfeksiyon ekseninde değerlendirilmesi, yöntem seçiminin teknik bir tercih olmanın ötesinde, hücresel bariyerler ve aktarılan DNA'nın hücre içi kaderiyle doğrudan ilişkili bir stratejik karar olduğunu göstermektedir. Bu aşamada elde edilen hücre popülasyonlarının genetik açıdan heterojen doğası ise, klon seçimi ve doğrulama basamaklarını deneysel tasarımın vazgeçilmez bir kalite kontrol mekanizmasına dönüştürmektedir. Fenotipik ön eleme yaklaşımları, koloni PCR, restriksiyon analizi ve dizileme temelli doğrulamalar; hız, maliyet ve çözünürlük arasında rasyonel bir denge kurularak bir arada kullanıldığında, yanlış pozitif ve yanlış negatif risklerini minimize eden sistematik bir doğrulama çerçevesi oluşturmaktadır.

Bölümün son kısmında ele alınan CRISPR-Cas temelli genom düzenleme yaklaşımları, rekombinant DNA teknolojilerinin klasik klonlama çerçevesini aşarak hedefe yönelik ve programlanabilir

müdahalelerle genişlediğini göstermektedir. Bununla birlikte bu genişleme, mutlak doğruluk ve sınırsız kontrol anlamına gelmemekte; onarım yollarının doğası, hedef özgüllüğü, off-target etkiler ve hücresel bağlama özgü değişkenlikler nedeniyle çok aşamalı doğrulama ve sorumlu kullanım gerekliliğini daha da belirgin hâle getirmektedir. Bu nedenle rekombinant DNA ve genom düzenleme uygulamalarında güvenilir sonuçlara ulaşmanın temel koşulu, her basamağın kendi sınırları ve kontrol noktalarıyla birlikte planlandığı bütüncül bir deney tasarımını sürdürmektir.

Bu çerçevede Bölüm 5, genetik mühendisliği uygulamalarında “tek bir güçlü yöntem” yaklaşımından ziyade, birbirini tamamlayan tekniklerin ardışık ve doğrulayıcı biçimde kurgulanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Kesim-ligasyon mantığından vektör seçimine, gen aktarımından klon doğrulamaya ve CRISPR tabanlı müdahalelere uzanan bu hat; deneysel başarıyı belirleyen asıl unsurun, yöntemlerin tek tek performansından çok, aralarındaki uyum ve doğrulama disiplininin gücü olduğunu göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022). *Molecular biology of the cell* (7th ed.). W. W. Norton & Company.
- Anzalone, A. V., Koblan, L. W., & Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, 38(7), 824–844. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2002). *Short protocols in molecular biology* (5th ed.). Wiley.
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*, 54(2), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Baylis, F. (2020). Human germline and heritable genome editing: The global policy landscape. *The CRISPR Journal*, 3(5), 306–312. <https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0082>
- Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 299–309. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Brown, S. D., et al. (2023). Complete sequence verification of plasmid DNA using the Oxford Nanopore Technologies' MinION device. *BMC Bioinformatics*, 24, 526. <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05226-y>

- Brown, T. A. (2016). *Gene cloning and DNA analysis: An introduction* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
- Brown, T. A. (2020). *Gene cloning and DNA analysis: An introduction* (8th ed.). Wiley-Blackwell.
- Bustin, S. A., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2015). *Biotechnology: Applying the genetic revolution* (2nd ed.). Academic Press.
- Concordet, J.-P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Currin, A., et al. (2019). Highly multiplexed, fast and accurate nanopore sequencing for verification of synthetic DNA constructs. *Synthetic Biology*, 4(1), ysz025. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysz025>
- de Kok, S., et al. (2014). Rapid and reliable DNA assembly via ligase cycling reaction. *ACS Synthetic Biology*, 3(2), 97–106. <https://doi.org/10.1021/sb4001992>
- Doench, J. G. (2018). Am I ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 67–80. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.97>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLOS*

- Felgner, P. L., et al. (1994). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 5148–5152. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.5148>
- Freshney, R. I. (2016). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (7th ed.). Wiley-Blackwell.
- Gallegos, J. E., et al. (2020). Rapid, robust plasmid verification by de novo assembly of short sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, 48(18), e106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa727>
- Gibson, D. G., et al. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5547–5551. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5547>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Güssow, D., & Clackson, T. (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by PCR. *Nucleic Acids Research*, 17(10), 4000. <https://doi.org/10.1093/nar/17.10.4000>

- Haeussler, M., et al. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms. *Genome Biology*, 17, 148. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Jinek, M., et al. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kay, M. A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: The road ahead. *Nature Reviews Genetics*, 12(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrg2971>
- Kleinstiver, B. P., et al. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases. *Nature*, 529(7587), 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
- Koonin, E. V., et al. (2017). Diversity and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>
- Lehman, I. R. (1974). DNA ligase: Structure, mechanism, and function. *Science*, 186(4166), 790–797. <https://doi.org/10.1126/science.186.4166.790>
- Lewin, B. (2008). *Genes IX* (9th ed.). Jones & Bartlett Learning.
- Lodish, H., et al. (2007). *Molecular cell biology* (8th ed.). W. H. Freeman.
- Lodish, H., et al. (2022). *Molecular cell biology* (9th ed.). W. H. Freeman & Company.

- Mali, P., et al. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573), 351–360. <https://doi.org/10.1038/nature15818>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2017). *Human genome editing: Science, ethics, and governance*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/24623>
- Nidhi, S., et al. (2021). Novel CRISPR-Cas systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3327. <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>
- Old, R. W., & Primrose, S. B. (1994). *Principles of gene manipulation* (5th ed.). Blackwell Scientific Publications.
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(8), 490–507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
- Primrose, S. B., Twyman, R. M., & Old, R. W. (2001). *Principles of gene manipulation* (6th ed.). Blackwell Science.
- Shapland, E. B., et al. (2015). Low-cost, high-throughput sequencing of DNA assemblies. *ACS Synthetic Biology*, 4(7), 860–866. <https://doi.org/10.1021/sb500362n>
- Śledziński, P., et al. (2021). Paving the way towards precise and safe CRISPR genome editing. *Biotechnology Advances*, 49, 107737. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107737>
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5), 346–358. <https://doi.org/10.1038/nrg1066>

- Vakulskas, C. A., et al. (2018). A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex. *Nature Medicine*, 24(8), 1216–1224. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Library preparation methods for next-generation sequencing. *Experimental Cell Research*, 322(1), 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.008>
- Walther, W., & Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer. *Drugs*, 60(2), 249–271. <https://doi.org/10.2165/00003495-200060020-00002>
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2013). *Molecular biology of the gene* (7th ed.). Pearson.
- Zhang, X.-H., et al. (2015). Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*, 4, e264. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>

BÖLÜM 6:

NÜKLEİK ASİT DİZİLEME VE GENOMİK

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi

Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: celebiidil@atauni.edu.tr

Uzman Moleküler Biyolog Zeynep YAMAN

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: zeynep.eskentepe21@ogr.atauni.edu.tr

GİRİŞ

Genomik bilginin güvenilir biçimde elde edilmesi ve anlamlandırılması, yalnızca dizileme teknolojilerindeki teknik ilerlemelerle açıklanabilecek bir süreç değildir. Dizileme yöntemlerinin ürettiği ham veri, biyolojik ya da klinik açıdan doğrudan yorumlanabilir bir çıktı olmaktan ziyade, çok aşamalı değerlendirme süreçlerinden geçirilmesi gereken karmaşık bir bilgi kaynağını temsil etmektedir. Bu nedenle modern genomik çalışmalar, dizileme teknolojilerini tekil araçlar olarak ele almak yerine, deneysel süreçler ile analitik

değerlendirmelerin birlikte kurgulandığı bütüncül bir yaklaşımı gerekli kılmaktadır.

DNA dizileme teknolojileri tarihsel olarak incelendiğinde, yüksek doğruluk gerektiren hedefli analizlerden, geniş ölçekli ve yüksek verimli veri üretimini mümkün kılan platformlara doğru belirgin bir evrim süreci gözlenmektedir. Bu evrim, genomik araştırmaların yalnızca hızını ve kapsamını artırmakla kalmamış; aynı zamanda sorulabilen biyolojik soruların niteliğini ve analitik derinliğini de dönüştürmüştür. Ancak artan veri üretim kapasitesi, beraberinde veri güvenilirliği, yorumlanabilirlik ve standardizasyon gibi yeni metodolojik gereksinimleri de gündeme taşımıştır.

Bu bölüm, genomik dizileme teknolojilerinin söz konusu dönüşümünü üç tamamlayıcı düzlem üzerinden ele almaktadır. İlk olarak Sanger dizileme, baz düzeyinde sunduğu yüksek doğruluk ve görsel olarak denetlenebilir çıktı yapısı ile genomik analizlerin metodolojik temelini oluşturan bir yaklaşım olarak değerlendirilmiştir. Ardından yeni nesil dizileme teknolojileri, paralel veri üretimi ve geniş kapsama alanı sayesinde genomik analizlerin ölçeğini ve uygulama alanlarını genişleten çağdaş platformlar bağlamında ele alınmıştır. Son olarak biyoinformatik veri analizi, dizileme teknolojilerinin ürettiği büyük ölçekli verinin biyolojik ve klinik açıdan anlamlı bilgiye dönüştürülmesini sağlayan vazgeçilmez bir analitik bileşen olarak incelenmiştir.

Bu üç bileşenin birlikte ele alınması, genomik dizilemenin yalnızca teknik bir veri üretim süreci olmadığını açık biçimde ortaya

koymaktadır. Dizileme teknolojilerinin sunduğu doğruluk, hız ve verimlilik, ancak bu verilerin sistematik, şeffaf ve tekrarlanabilir analiz iş akışlarıyla değerlendirilmesi durumunda bilimsel ve klinik değere dönüştürülebilmektedir. Bu bağlamda biyoinformatik analiz, dizileme sürecinin tamamlayıcı bir unsuru olmaktan ziyade, genomik bilginin güvenilir biçimde yorumlanmasını sağlayan merkezi bir yapı taşı olarak konumlanmaktadır.

Bölüm boyunca ele alınan dizileme yaklaşımları ve analitik stratejiler, birbirini dışlayan alternatifler olarak değil, genomik bilginin üretilmesi, doğrulanması ve yorumlanması sürecinde farklı gereksinimlere yanıt veren tamamlayıcı bileşenler olarak değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, genomik teknolojilerin etkin kullanımının teknik kapasitenin ötesinde metodolojik bilinç ve analitik sorumluluk gerektirdiğini ortaya koymakta; aynı zamanda elde edilen bulguların güvenilir ve anlamlı sonuçlara dönüştürülmesi için bütüncül bir perspektifin gerekliliğini vurgulamaktadır.

6.1. Zincir Sonlandırma (Chain-Termination) Prensipleri

Genomik dizilerin baz düzeyinde güvenilir biçimde çözümlenebilmesi, elde edilen verinin biyolojik ve klinik bağlamda anlam kazanmasının ön koşuludur. Bu gereksinim, dizileme sürecinde üretilen sinyallerin yalnızca nicel olarak değil, aynı zamanda konumsal doğruluk açısından da değerlendirilebilmesini zorunlu kılar. Sanger dizileme yaklaşımı, bu doğruluk ihtiyacına yanıt veren ve DNA sentezinin ilerleyişini doğrudan kontrol altına alan bir reaksiyon mantığına dayanarak geliştirilmiştir. Yöntemin temelinde, uzama

sürecinin belirli noktalarda bilinçli biçimde kesintiye uğratılması yer almakta; bu sayede sentezlenen ürünlerin yapısal özellikleri üzerinden dizinin yeniden kurulması mümkün hale gelmektedir.

Bu mekanizma, DNA polimeraz aracılığıyla yürütülen primer uzatma reaksiyonuna, doğal nükleotitlerle birlikte uzamayı durdurma kapasitesine sahip analogların dahil edilmesiyle işlerlik kazanmaktadır. Uzatma sırasında zincire katılan bu analogların yapısal özellikleri, yeni bir bağ oluşumunu engelleyerek sentezin o noktada sonlanmasına neden olur. Böylece her bir uzama olayı, belirli bir baz konumunda tamamlanmış kısa DNA fragmanları ile sonuçlanır. Ortaya çıkan bu fragmanlar, sentez sürecinin rastlantısal değil, öngörülebilir bir kontrol mekanizması altında yürütüldüğünü göstermekte ve yöntemin analitik temelini oluşturmaktadır (Heather & Chain, 2016; Green & Sambrook, 2012).

Reaksiyon ortamında uzamayı sonlandıran analogların sınırlı oranlarda bulunması, zincir sonlanmasının belirli bir düzen içerisinde dağılmasını sağlar. Bu dağılım, aynı başlangıç noktasından hareket eden DNA zincirlerinin farklı uzunluklarda tamamlanmasına yol açarak, dizinin her bir bazına karşılık gelen fragmanların eş zamanlı olarak üretilmesine imkân tanır. Elde edilen bu fragman çeşitliliği, dizinin doğrudan okunmasından ziyade, fragman uzunlukları arasındaki ilişkiler üzerinden yeniden inşa edilmesini mümkün kılan analitik bir çerçeve sunar. Bu yaklaşım, dizileme doğruluğunu artıran temel unsurlardan biri olarak değerlendirilmektedir.

Teknolojik gelişmelerle birlikte zincir sonlandırma prensibi, floresan sinyal üretimine dayalı sistemlerle entegre edilerek daha işlevsel bir hale getirilmiştir. Her bir baz türünün farklı floresan işaretlerle ayırt edilmesi, reaksiyonun tek bir tüp içerisinde yürütülmesine olanak tanımış; bu durum hem deneysel karmaşıklığı azaltmış hem de veri üretim sürecinin standardizasyonunu sağlamıştır. Otomatik okuma sistemleriyle desteklenen bu yapı, baz çağrımının insan yorumuna bağımlılığını azaltarak tekrarlanabilirlik ve veri tutarlılığı açısından önemli bir kazanım sunmuştur (Al-Shuhaib, 2023).

Zincir sonlandırmaya dayalı bu kontrollü sentez yaklaşımı, dizileme sürecinde doğruluğun nasıl sistematik biçimde sağlanabileceğini ortaya koyan temel bir model sunmaktadır. Özellikle kısa hedef bölgelerde güvenilir baz çağrımına olanak tanınması, yöntemin daha karmaşık dizileme platformlarıyla elde edilen bulguların değerlendirilmesinde referans bir çerçeve olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Bu yönüyle zincir sonlandırma prensibi, tarihsel bir teknikten ziyade, güncel genomik iş akışlarında belirli analiz gereksinimlerine yanıt veren işlevsel bir yaklaşım olarak konumlanmaktadır (Green & Sambrook, 2012).

6.1.1. Kapiler Elektroforez ve Kromatogram Tabanlı Okuma

Zincir sonlandırma reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan DNA fragmanlarının ayırt edilebilir hale getirilmesi, Sanger dizilemenin güvenilirliğini belirleyen en kritik aşamalardan biridir. Bu aşamada elde edilen ürünlerin yalnızca varlığı değil, uzunluk farklarına dayalı olarak düzenli biçimde ayrıştırılabilmesi de büyük önem taşımaktadır. Kapiler

elektroforez, bu gereksinimi karşılamak üzere geliştirilen ve fiziksel ayırım prensiplerini yüksek hassasiyetle uygulayan bir sistem olarak Sanger dizileme iş akışının merkezinde yer almaktadır.

Kapiler elektroforez sürecinde DNA fragmanları, dar çaplı kapiler tüpler içerisinde elektrik alan etkisi altında hareket etmeye zorlanır. Moleküler uzunluk ile hareket hızı arasındaki ters ilişki, kısa fragmanların daha hızlı, uzun fragmanların ise daha yavaş ilerlemesine neden olur. Bu kontrollü farklılaşma, zincir sonlandırma mekanizması ile üretilmiş olan fragmanların uzunluklarına göre sıralanmasını mümkün kılar. Böylece dizinin doğrudan okunması yerine, fragmanların fiziksel davranışları üzerinden baz diziliminin yeniden yapılandırılmasına dayalı bir analiz yaklaşımı ortaya çıkar.

Kapiler sistemlerin sağladığı dar ve homojen ortam, klasik jel tabanlı ayırım yöntemlerine kıyasla daha yüksek çözünürlük sunar. Bu özellik, ardışık bazlar arasında oluşan çok küçük uzunluk farklarının dahi güvenilir biçimde ayırt edilmesini sağlar. Aynı zamanda kapiler elektroforezin otomasyona uygun yapısı, analiz süresinin kısalmasına ve deneysel değişkenliğin azalmasına katkıda bulunur. Bu yönüyle yöntem, yalnızca teknik bir ayırım aracı değil, aynı zamanda dizileme verisinin standardizasyonunu destekleyen bir kontrol mekanizması olarak değerlendirilmektedir (Green & Sambrook, 2012).

Elektroforetik ayırımın ardından DNA fragmanlarının algılanması, floresan sinyal üretimine dayalı sistemler aracılığıyla gerçekleştirilir. Zincir sonlandırma aşamasında işaretlenmiş olan bazlara özgü floresan sinyaller, lazer uyarımı ile açığa çıkarılır ve

dedektörler tarafından zaman sıralı olarak kaydedilir. Bu sinyallerin dijital ortama aktarılmasıyla oluşan kromatogramlar, dizileme çıktısının yalnızca nicel değil, aynı zamanda nitel olarak da değerlendirilmesine imkân tanır. Her bir pik, belirli bir bazın konumsal temsilini sunarken, sinyal yoğunluğu ve pik ayrımı veri kalitesi hakkında doğrudan bilgi sağlar.

Kromatogram tabanlı okuma, dizileme sürecine görsel bir denetim katmanı ekleyerek hataların erken aşamada fark edilmesini mümkün kılar. Piklerin üst üste binmesi, düzensiz sinyal profilleri veya artan arka plan gürültüsü, teknik sınırlılıklara ya da örnek kaynaklı sorunlara işaret edebilmektedir. Bu tür görsel ipuçları, özellikle heterozigot varyantların ayırt edilmesi ve sınırdaki kaliteye sahip bölgelerin değerlendirilmesi açısından kritik bir yorumlama avantajı sunmaktadır (Al-Shuhaib, 2023; Koboldt, 2020).

Kapiler elektroforez ve kromatogram tabanlı okuma sistemleri, Sanger dizilemenin yalnızca kimyasal reaksiyonlara dayalı bir süreç olmadığını; fiziksel ayrıştırma ve görsel denetim mekanizmalarıyla desteklenen bütüncül bir analiz yaklaşımı sunduğunu göstermektedir. Bu yapı, dizileme çıktılarının kalite açısından değerlendirilmesine olanak tanıyarak, baz çağrımının güvenilirliğini artıran ek bir kontrol katmanı oluşturur. Bu sayede Sanger dizileme, otomatik analizlere açık olmakla birlikte analitik yorumlamaya da imkân tanıyan dengeli bir sistem olarak öne çıkmaktadır.

6.1.2. Sanger Dizilemenin Doğruluk Profili ve Sınırlılıkları

Sanger dizilemenin uzun süre genomik analizlerde referans bir teknik olarak kabul edilmesi, yöntemden elde edilen verinin doğruluk düzeyiyle doğrudan ilişkilidir. Zincir sonlandırmaya dayalı kontrol mekanizması, baz çağrım sürecinin izlenebilir ve denetlenebilir biçimde ilerlemesini sağlayarak, dizileme çıktılarının güvenilirliğini artırır. Bu yapı, özellikle kısa hedef bölgelerde sinyal bütünlüğünün korunmasına katkı sunar ve yöntemden elde edilen sonuçların yorumlanabilirliğini güçlendirir.

Yöntemin yüksek doğruluk profili, reaksiyonun sınırlı sayıda fragman üzerinden yürütülmesi ve her bir fragmanın konumsal bilgisinin dolaylı olarak doğrulanabilmesi ile desteklenir. Kapiler elektroforez ve floresan tabanlı okuma sistemlerinin birlikte kullanımı, sinyal-gürültü dengesini iyileştirerek baz ayrımını daha belirgin hale getirir. Bu durum, yanlış baz çağrımı olasılığını düşürürken, tek nükleotid düzeyindeki farklılıkların güvenilir biçimde saptanmasına olanak tanır (Goodwin et al., 2016; Metzker, 2010).

Bununla birlikte, Sanger dizilemenin doğruluk avantajı belirli bağlamsal sınırlılıklarla birlikte değerlendirilmelidir. Yöntemin düşük paralellik kapasitesi, geniş ölçekli genomik taramalarda verimliliği sınırlar ve aynı anda analiz edilebilecek hedef sayısını kısıtlar. Ayrıca homopolimer uzunlukları, sekonder yapı oluşumuna yatkın diziler ve şablon kalitesindeki dalgalanmalar, sinyal çözünürlüğünü olumsuz etkileyerek veri kalitesinde yerel düşüşlere yol açabilir (Metzker, 2010).

Operasyonel açıdan bakıldığında zaman ve maliyet unsurları da yöntemin kullanım alanlarını belirleyen etmenler arasında yer alır. Her bir hedef bölgenin ayrı reaksiyonlar halinde ele alınması, özellikle büyük örnek setlerinde analiz süresini uzatır ve iş akışının ölçeklenebilirliğini sınırlar. Bu durum, yüksek verimlilik gerektiren genomik çalışmalarda yeni nesil dizileme platformlarının tercih edilmesini açıklayan temel nedenlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Goodwin et al., 2016).

Ancak bu sınırlılıklar, Sanger dizilemenin analitik değerini ortadan kaldırmaz. Aksine yöntem, belirli senaryolarda tamamlayıcı ve doğrulayıcı bir rol üstlenerek stratejik bir konumda yer alır. Yeni nesil dizileme platformlarından elde edilen varyantların doğrulanması, mozaiklik şüphesi taşıyan örneklerin değerlendirilmesi ve düşük frekanslı genetik değişimlerin analizi gibi durumlarda, Sanger dizilemenin sunduğu yüksek doğruluk belirleyici bir avantaj sağlar (Beck et al., 2016; Mu et al., 2016).

Sanger dizilemenin doğruluk profili ve operasyonel sınırlılıkları birlikte ele alındığında, yöntemin genomik analizlerde hangi bağlamlarda anlam kazandığı daha net biçimde ortaya çıkmaktadır. Yüksek doğruluk gerektiren hedefli uygulamalarda güçlü bir araç olarak öne çıkan bu yaklaşım, geniş ölçekli analiz gereksinimlerinin arttığı durumlarda yerini daha yüksek verimli teknolojilere bırakmaktadır. Bu durum, Sanger dizilemenin kullanım alanlarını tanımlayan yapısal bir dengeyi yansıtmaktadır.

6.1.3. Yeni Nesil Dizileme Sonrası Doğrulamada Sanger Dizilemenin Rolü

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin sağladığı yüksek veri üretim kapasitesi, genomik analizlerin ölçeğini genişletirken, elde edilen bulguların güvenilirliğinin nasıl değerlendirileceği sorusunu da beraberinde getirmiştir. Yüksek paralellik ve kapsama derinliği, çok sayıda varyantın kısa sürede raporlanmasına olanak tanısa da, dizileme platformlarına özgü hata profilleri ve hesaplamalı analiz basamaklarında ortaya çıkabilen belirsizlikler, sonuçların ek bir doğrulama süzgecinden geçirilmesini gerektirebilmektedir. Bu bağlamda Sanger dizileme, NGS çıktılarının doğruluk düzeyini destekleyen tamamlayıcı bir değerlendirme aracı olarak konumlanmaktadır.

Klinik genomik uygulamalarda, özellikle tanısal değeri yüksek olduğu düşünülen varyantların raporlanması öncesinde doğrulama ihtiyacı daha belirgin hale gelmektedir. Sanger dizilemenin sunduğu düşük hata oranı ve kromatogram tabanlı görsel çıktı, varyant çağrım sonuçlarının yalnızca sayısal eşiklere dayanarak değil, aynı zamanda sinyal kalitesi üzerinden de değerlendirilmesine olanak tanır. Bu yaklaşım, yanlış pozitif sonuçların elenmesine katkı sağlarken, klinik karar süreçlerinde güvenilirliğin artırılmasına hizmet etmektedir (Rehm et al., 2015b; Richards et al., 2015).

Bununla birlikte NGS teknolojilerinin olgunlaşması ve biyoinformatik analiz araçlarının gelişmesi, doğrulama stratejilerinin yeniden değerlendirilmesini gerekli kılmıştır. Yüksek kapsama derinliği

ile desteklenen ve sıkı kalite filtrelerinden geçirilen varyantların tamamı için rutin Sanger doğrulamasının her zaman ek bir bilgi sağlamadığı durumlar raporlanmaktadır. Özellikle iyi karakterize edilmiş genomik bölgelerde ve yüksek güven skorlarıyla tanımlanan varyantlarda, doğrulama gereksinimi analiz bağlamına göre daha seçici biçimde ele alınabilmektedir (Koboldt, 2020).

Buna karşın belirli analiz senaryoları, Sanger dizilemenin doğrulama aracı olarak önemini koruduğunu göstermektedir. Düşük frekanslı varyantların değerlendirilmesi, mozaiklik olasılığı taşıyan örnekler ve karmaşık genomik bölgelerde elde edilen NGS sonuçları, ek doğrulama ihtiyacını artıran durumlar arasında yer almaktadır. Bu tür bağlamlarda Sanger dizileme, sınırlı kapsama alanına rağmen sunduğu yüksek doğruluk sayesinde klinik yorumlamada güven artırıcı bir rol üstlenmektedir (Beck et al., 2016; Mu et al., 2016).

Yeni nesil dizileme sonrası doğrulama süreçlerinde Sanger dizilemenin konumu, sabit bir gereklilikten çok, analiz hedeflerine ve klinik bağlama göre şekillenen stratejik bir tercih olarak değerlendirilmektedir. Özellikle belirsizlik taşıyan ya da klinik açıdan kritik varyantların değerlendirilmesinde sunduğu yüksek doğruluk, yöntemin güncel genomik iş akışlarındaki tamamlayıcı rolünü tanımlamaktadır.

6.1.4. Klinik ve Moleküler Biyoloji Uygulamalarında Sanger Dizileme

Genomik teknolojilerdeki hızlı ilerlemeye rağmen Sanger dizilemenin klinik ve moleküler biyoloji uygulamalarında belirli kullanım alanlarını

koruması, yöntemin sunduğu veri türünün niteliği ile doğrudan ilişkilidir. Geniş ölçekli taramalardan ziyade sınırlı hedeflere yönelik analizlerde, elde edilen sonucun doğruluğu ve yorumlanabilirliği klinik karar süreçleri açısından belirleyici bir öneme sahiptir. Bu bağlamda Sanger dizileme, kapsam genişliğinden çok sonuç güvenilirliğinin önceliklendirildiği uygulamalarda tercih edilen bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Klinik genetik analizlerde, özellikle daha önce tanımlanmış ya da güçlü aday olarak değerlendirilen varyantların incelenmesinde, dizileme çıktılarının doğrudan görsel olarak değerlendirilebilmesi önemli bir avantaj sunar. Kromatogram temelli okuma, yalnızca baz dizisinin belirlenmesini değil, aynı zamanda sinyal kalitesinin ve olası teknik sapmaların eş zamanlı olarak gözlemlenmesini mümkün kılar. Bu durum, belirsiz ya da sınırda nitelik taşıyan varyantların daha temkinli biçimde yorumlanmasına olanak tanıyarak klinik raporlamada güvenilirliğin artırılmasına katkı sağlar (Rehm et al., 2015b).

Moleküler biyoloji araştırmalarında ise Sanger dizileme, deneysel süreçlerin doğrulanmasına yönelik bir kontrol katmanı işlevi görmektedir. Rekombinant DNA çalışmaları, hedefe yönelik mutagenез uygulamaları ve klonlama temelli deneylerde elde edilen nükleik asit dizilerinin beklenen yapıyla uyumlu olup olmadığının teyidi, deneysel bütünlüğün korunması açısından temel bir gereklilik olarak kabul edilmektedir. Bu tür uygulamalarda yöntem, yüksek verimlilikten ziyade düşük hata oranı ve hızlı geri bildirim sağlaması nedeniyle tercih edilmektedir (Green & Sambrook, 2012).

Eğitim ve temel araştırma laboratuvarlarında Sanger dizilemenin kullanımı, yöntemin yalnızca analitik bir araç olmadığını, aynı zamanda öğretici bir model sunduğunu göstermektedir. Zincir sonlandırma prensibine dayalı dizileme çıktılarının doğrudan gözlemlenebilir olması, dizileme teknolojilerinin kavramsal temellerinin anlaşılmasını kolaylaştırmakta ve genomik analizlerin metodolojik altyapısına yönelik öğrenme sürecini desteklemektedir. Bu yönüyle yöntem, genomik düşünce biçiminin aktarılmasında işlevsel bir rol üstlenmektedir (Heather & Chain, 2016).

Genel bir değerlendirme yapıldığında Sanger dizileme, klinik ve moleküler biyoloji uygulamalarında geniş ölçekli analizlerin temel omurgasını oluştırmaktan ziyade, belirli sorulara yüksek doğrulukla yanıt veren seçici bir teknik olarak konumlanmaktadır. Bu seçici kullanım alanları, yöntemin yeni nesil dizileme teknolojileriyle doğrudan rekabet etmek yerine, onları tamamlayan ve elde edilen sonuçların güvenilirliğini pekiştiren bir referans yaklaşım olarak modern genomik iş akışları içerisindeki yerini korumasını sağlamaktadır.

6.2. Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing)

Genomik analizlerde veri üretim kapasitesinin artması, dizileme teknolojilerinin yalnızca daha hızlı değil, aynı zamanda daha ölçeklenebilir biçimde kurgulanmasını gerekli kılmıştır. Bu gereksinim, klasik dizileme yaklaşımlarının sunduğu doğruluk avantajlarını korurken, aynı anda çok sayıda nükleik asit fragmanının analiz edilebilmesini mümkün kılan yeni metodolojik çerçevelerin

geliştirilmesine zemin hazırlamıştır. Yeni nesil dizileme teknolojileri, bu dönüşümün bir sonucu olarak ortaya çıkmış ve genomik araştırmaların kapsamını niteliksel olarak farklı bir düzleme taşımıştır (Metzker, 2010; Goodwin et al., 2016).

NGS yaklaşımlarının ayırt edici özelliği, dizileme sürecinin paralel olarak yürütülmesine olanak tanıyan mimari yapılarıdır. Bu yapı sayesinde, tek bir deneysel çalışmada milyonlarca kısa DNA fragmanı eş zamanlı olarak analiz edilebilmekte ve elde edilen veriler bütüncül bir genomik temsil oluşturacak şekilde bir araya getirilebilmektedir. Böylece dizileme, tekil hedeflerin analizinden çıkıp, genomun tamamına ya da geniş genomik bölgelerin sistematik biçimde taranmasına uzanan bir uygulama alanı kazanmıştır (Goodwin et al., 2016).

Bu yüksek paralellik kapasitesi, yalnızca veri miktarını artırmakla kalmamış, aynı zamanda genomik soruların niteliğini de dönüştürmüştür. Nadir varyantların tespiti, heterojen örneklerin analizi ve karmaşık genetik desenlerin ortaya konması gibi daha önce sınırlı ölçekte ele alınabilen konular, NGS teknolojileri sayesinde erişilebilir hale gelmiştir. Bu bağlamda yeni nesil dizileme, genomik analizlerde nicel bir genişlemeden ziyade, analitik derinliğin artmasına olanak tanıyan yapısal bir dönüşüm olarak değerlendirilmektedir (Koboldt, 2020).

Bununla birlikte NGS teknolojilerinin sunduğu bu genişleme, beraberinde yeni teknik ve analitik zorluklar da getirmiştir. Kısa okuma uzunlukları, platforma özgü hata profilleri ve büyük veri setlerinin

işlenmesine yönelik hesaplamalı gereksinimler, dizileme sürecinin yalnızca deneysel aşamalarla sınırlı olmadığını göstermektedir. Bu nedenle NGS, dizileme reaksiyonunun ötesinde, veri işleme ve yorumlama basamaklarını da kapsayan bütüncül bir iş akışı olarak ele alınmalıdır (Metzker, 2010; Koboldt, 2020).

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin genomik çalışmalarda yaygınlaşması, dizileme verisinin klinik ve araştırma bağlamında nasıl değerlendirileceği sorusunu da gündeme taşımıştır. Yüksek hacimli veri üretimi, sonuçların güvenilirliği ve klinik uygulanabilirliği açısından daha titiz kalite kontrol ve doğrulama stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Rehm et al., 2015b). Bu durum, NGS teknolojilerinin sunduğu avantajların, dikkatle tasarlanmış analitik yaklaşımlar ile desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

6.2.1. Kütüphane Hazırlama (Library Preparation)

Yeni nesil dizileme çalışmalarında elde edilen verinin niteliği, dizileme reaksiyonunun kendisinden önce yürütülen kütüphane hazırlama süreçleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu aşama, genomik materyalin dizileme platformları tarafından algılanabilir ve analiz edilebilir bir forma dönüştürülmesini amaçlayan çok basamaklı bir dönüşüm sürecini ifade etmektedir. Dolayısıyla kütüphane hazırlama, yalnızca teknik bir ön işlem değil, dizileme çıktılarının doğruluğunu, temsil gücünü ve analitik güvenilirliğini belirleyen temel bir yapı taşı olarak değerlendirilmelidir (Head et al., 2014; Goodwin et al., 2016).

Kütüphane hazırlama süreci, nükleik asit örneklerinin kontrollü biçimde fragmente edilmesiyle başlar. Fragman boyutlarının

homojenliği, dizileme sırasında elde edilecek okuma dağılımlarının dengeli olmasını sağlayarak kapsama derinliği üzerinde belirleyici bir etki yaratır. Bu aşamada uygulanan fragmentasyon stratejileri, örnek türüne ve hedeflenen analiz kapsamına göre farklılık gösterebilmekte; mekanik, enzimatik ya da kimyasal yaklaşımlar arasından uygun olanı tercih edilmektedir. Seçilen yöntemin özellikleri, elde edilen kütüphanenin temsil doğruluğunu doğrudan etkilemektedir (Head et al., 2014).

Fragmente edilen DNA ya da RNA moleküllerinin dizileme sürecine entegre edilebilmesi için platforma özgü adaptör dizileri ile işaretilmesi gerekmektedir. Bu adaptörler, dizileme reaksiyonunun başlatılmasını mümkün kılmak yanı sıra, örneklerin çoğaltılması ve tanımlanması açısından da işlevsel roller üstlenmektedir. Adaptör ligasyonu sırasında oluşabilecek verim kayıpları ya da yanlılıklar, kütüphane çeşitliliğini sınırlandırarak dizileme verisinin analitik gücünü azaltabileceğinden, bu basamak yüksek dikkat gerektiren kritik bir süreç olarak ele alınmaktadır (Quail et al., 2012; Head et al., 2014).

Kütüphane hazırlamanın bir diğer önemli boyutu, amplifikasyon adımlarının dengeli biçimde yürütölmesidir. Çoğaltma süreçleri, yeterli sinyal üretimi açısından gerekli olmakla birlikte, aşırı amplifikasyon durumlarında belirli fragmanların orantısız biçimde temsil edilmesine yol açabilmektedir. Bu durum, dizileme verisinde yanlış kapsama profillerinin oluşmasına neden olarak biyoinformatik analizlerde yorum güçlükleri yaratabilir. Bu nedenle amplifikasyon

koşulları, örnek türü ve analiz hedefleri doğrultusunda optimize edilmelidir (Aird et al., 2011; Head et al., 2014).

Kütüphane hazırlama sürecinde gerçekleştirilen kalite kontrol adımları, dizileme öncesinde olası sorunların erken aşamada tespit edilmesini mümkün kılar. Fragman boyut dağılımı, kütüphane konsantrasyonu ve adaptör ligasyon verimliliği gibi parametrelerin değerlendirilmesi, dizileme aşamasına geçilmeden önce kütüphanenin uygunluğunu ortaya koymaktadır. Bu kontroller, başarısız dizileme koşullarının ve veri kayıplarının önlenmesi açısından kritik bir güvence mekanizması olarak işlev görmektedir (Quail et al., 2012).

Kütüphane hazırlama aşamasında yapılan metodolojik tercihler, dizileme sürecinin ilerleyen basamaklarında elde edilecek verinin temsil gücü ve güvenilirliği üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Fragmentasyon, adaptör ligasyonu ve amplifikasyon stratejilerinin dengeli biçimde yürütülmesi, dizileme çıktılarının biyolojik olarak anlamlandırılabilirliğini destekleyen temel unsurlar arasında yer almaktadır (Goodwin et al., 2016).

6.2.2. Illumina Platformları ve Bridge Amplification Mekanizması

Illumina platformları, yeni nesil dizileme teknolojileri arasında geniş ölçekte benimsenmiş olmalarını, dizileme sürecini yüksek doğrulukla ve ölçeklenebilir biçimde yürütebilen özgün bir çoğaltma ve okuma mimarisine borçludur. Bu mimarinin merkezinde yer alan bridge amplification mekanizması, dizileme öncesinde sinyal yoğunluğunu artırmaya yönelik bir çoğaltma stratejisi sunarken, aynı zamanda dizileme sırasında elde edilecek verinin mekânsal olarak düzenli ve

izlenebilir olmasını mümkün kılmaktadır. Bu yönüyle bridge amplification, Illumina tabanlı dizilemenin yalnızca hazırlık aşamasına ait bir işlem değil, tüm dizileme çıktısının niteliğini şekillendiren temel bir yapı olarak değerlendirilmektedir (Bentley et al., 2008; Quail et al., 2012).

Bridge amplification süreci, kütüphane hazırlama aşamasında adaptör dizileri ile işaretlenmiş DNA fragmanlarının, akış hücresi yüzeyine immobilize edilmiş tamamlayıcı dizilere bağlanmasıyla başlar. Bu bağlanma, fragmanların yüzey üzerinde sabitlenmesini sağlarken, çoğaltma sürecinin kontrollü bir ortamda gerçekleşmesine olanak tanır. Yüzeye tutunan DNA molekülleri, bükülerek komşu tamamlayıcı dizilerle etkileşime girer ve böylece “köprü” benzeri yapılar oluşturur. Bu fiziksel düzenleme, çoğaltma işleminin yüzeyle sınırlı ve mekânsal olarak organize biçimde ilerlemesini sağlayan ayırt edici bir özelliktir (Bentley et al., 2008).

Bu mekanizma sayesinde tekil DNA fragmanları, ardışık çoğaltma döngüleri sonucunda kümeler halinde çoğaltılır. Oluşan bu kümeler, dizileme sırasında yeterli sinyal yoğunluğu sağlayarak tekil moleküllerden kaynaklanabilecek zayıf sinyallerin önüne geçer. Böylece dizileme reaksiyonu, bireysel DNA fragmanlarının okunmasına dayansa da, pratikte kümeler üzerinden yürütülen bir sinyal algılama sürecine dönüşür. Bu yaklaşım, yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından Illumina platformlarının öne çıkan avantajlarından biri olarak değerlendirilmektedir (Metzker, 2010; Goodwin et al., 2016).

Bridge amplification mekanizmasının bir diğer önemli boyutu, çoğaltma sürecinin mekânsal kontrol altında tutulmasıdır. Her bir DNA kümesinin akış hücresi üzerinde belirli bir konuma karşılık gelmesi, dizileme sırasında elde edilen sinyallerin karışmasını engelleyerek baz çağrım doğruluğunu artırır. Ancak bu mekânsal düzenin sağlanabilmesi, kütüphane yoğunluğunun ve bağlanma koşullarının dikkatle optimize edilmesini gerektirir. Aşırı yoğunluk durumlarında kümeler arası örtüşme meydana gelebilirken, düşük yoğunlukta ise veri çıkışında verim kaybı gözlenebilmektedir (Quail et al., 2012).

Illumina platformlarında bridge amplification ile elde edilen bu çoğaltma mimarisi, dizileme-by-synthesis yaklaşımıyla doğrudan ilişkilidir. Çoğaltılmış DNA kümeleri üzerinde yürütülen ardışık nükleotid ekleme döngüleri, her baz eklenmesini floresan sinyaller aracılığıyla izlenebilir hale getirir. Bu entegrasyon, çoğaltma ve okuma süreçlerinin birbirini tamamlayan bir bütün olarak işlemlerini sağlayarak dizileme verisinin tutarlılığını ve analiz edilebilirliğini artırmaktadır (Bentley et al., 2008; Metzker, 2010).

Illumina platformlarında kullanılan bridge amplification mekanizması, dizileme sürecinin mekânsal olarak düzenli ve izlenebilir biçimde yürütülmesini mümkün kılmaktadır. Bu çoğaltma mimarisi, sinyal yoğunluğunu artırırken aynı zamanda baz çağrım doğruluğunu destekleyerek, dizileme verisinin tutarlılığını belirleyen temel bileşenlerden biri olarak öne çıkmaktadır.

6.2.3. Oxford Nanopore Teknolojisi ve Tek Molekül Dizileme

Oxford Nanopore teknolojisi, yeni nesil dizileme yaklaşımları arasında tek molekül düzeyinde doğrudan ölçüm yapılmasına olanak tanıyan özgün bir çalışma mantığı sunmaktadır. Bu teknoloji, dizileme sürecini çoğaltma basamaklarından bağımsız hale getirerek, nükleik asit moleküllerinin doğal yapılarıyla analiz edilebilmesini hedefler. Böylece dizileme, kimyasal çoğaltma döngülerine dayalı sinyal üretimi yerine, fiziksel etkileşimlerin doğrudan ölçümüne dayanan farklı bir analitik çerçeveye taşınmaktadır (Branton et al., 2008; Jain et al., 2016).

Nanopore tabanlı dizileme sistemlerinde temel prensip, nanometre ölçeğindeki gözeneklerden geçirilen tekil nükleik asit moleküllerinin oluşturduğu iyon akımı değişimlerinin izlenmesine dayanır. DNA ya da RNA molekülü gözenekten geçerken, baz dizisine bağlı olarak akımda meydana gelen anlık değişimler kaydedilir ve bu sinyaller hesaplamalı algoritmalar aracılığıyla baz dizisine dönüştürülür. Bu süreçte her bir molekülün ayrı ayrı analiz edilmesi, tek molekül dizilemenin ayırt edici özelliğini oluşturmaktadır (Branton et al., 2008; Jain et al., 2016).

Oxford Nanopore teknolojisinin öne çıkan yönlerinden biri, okuma uzunlukları açısından sunduğu esnekliktir. Moleküler fragmanların uzunluğuna bağlı kalmaksızın dizileme yapılabilmesi, uzun genomik bölgelerin kesintisiz biçimde analiz edilmesine olanak tanır. Bu özellik, yapısal varyantların belirlenmesi, tekrar bölgelerinin çözülmesi ve kompleks genomik düzenlemelerin anlaşılması açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (Jain et al., 2018). Böylece Nanopore

dizileme, kısa okuma uzunluklarıyla sınırlı yaklaşımların ötesine geçen bir analiz perspektifi sunmaktadır.

Tek molekül dizileme yaklaşımı, veri üretim sürecinde belirli zorlukları da beraberinde getirmektedir. Nanopore sistemlerinde ölçülen sinyallerin gürültü düzeyi ve platforma özgü hata profilleri, elde edilen verinin yorumlanmasında dikkatli kalite kontrol ve hesaplamalı düzeltme adımlarını gerekli kılmaktadır. Bu nedenle Nanopore dizileme, deneysel aşamaların ötesinde, güçlü biyoinformatik analiz stratejileriyle desteklenmesi gereken bir teknoloji olarak değerlendirilmektedir (Loman et al., 2015; Jain et al., 2018). Ancak bu zorluklar, teknolojinin sunduğu esneklik ve uzun okuma avantajları göz önünde bulundurulduğunda, bağlama bağlı olarak kabul edilebilir sınırlılıklar olarak ele alınmaktadır.

Oxford Nanopore teknolojisinin bir diğer önemli yönü, dizileme sürecinin gerçek zamanlı olarak izlenebilmesidir. Veri üretiminin eş zamanlı gerçekleşmesi, analizlerin anlık olarak yönlendirilmesine ve deneysel sürecin dinamik biçimde kontrol edilmesine imkân tanır. Bu özellik, özellikle saha çalışmaları, hızlı tanı gerektiren uygulamalar ve zaman kısıtlı analizler açısından Nanopore dizilemeyi farklılaştıran bir unsur olarak öne çıkmaktadır (Quick et al., 2016).

Oxford Nanopore teknolojisinin sunduğu tek molekül dizileme yaklaşımı, dizileme sürecini çoğaltma basamaklarından bağımsız hale getirerek farklı bir analitik perspektif sunmaktadır. Bu yaklaşım, uzun okuma uzunlukları ve gerçek zamanlı veri üretimi gibi özellikleriyle,

belirli genomik yapıların çözümünde tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir (Jain et al., 2018; Koboldt, 2020).

6.2.4. Platformlar Arası Karşılaştırmalı Değerlendirme

Yeni nesil dizileme platformlarının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi, teknolojilerin mutlak üstünlükleri üzerinden değil, belirli analiz hedeflerine ne ölçüde yanıt verebildikleri üzerinden anlam kazanmaktadır. Farklı dizileme yaklaşımlarının sunduğu okuma uzunlukları, hata profilleri, veri üretim hızları ve operasyonel gereksinimler, her platformun belirli uygulama alanlarında öne çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle platformlar arası karşılaştırma, teknik özelliklerin sıralanmasından ziyade, kullanım bağlamına dayalı bir değerlendirme çerçevesi içerisinde ele alınmalıdır (Metzker, 2010; Goodwin et al., 2016).

Kısa okuma uzunluklarına dayalı platformlar, yüksek doğruluk ve homojen kapsama profilleri sunmaları nedeniyle varyant tespiti ve nicel analizlerde avantaj sağlamaktadır. Bu sistemler, özellikle tek nükleotid düzeyindeki değişimlerin güvenilir biçimde saptanmasında ve yüksek örnek sayılarının eş zamanlı olarak analiz edilmesinde tercih edilmektedir. Ancak okuma uzunluklarının sınırlı olması, tekrar bölgeleri ve karmaşık genomik yapılar söz konusu olduğunda analitik kısıtlar yaratabilmektedir (Goodwin et al., 2016; Koboldt, 2020).

Uzun okuma teknolojileri ise genomik yapının daha bütüncül biçimde ele alınmasına olanak tanımaktadır. Tek molekül düzeyinde gerçekleştirilen dizileme yaklaşımları, yapısal varyantların belirlenmesi ve uzun tekrar bölgelerinin çözülmesi gibi alanlarda belirgin avantajlar

sunmaktadır. Buna karşın bu platformlarda gözlenen daha yüksek hata oranları, elde edilen verinin yorumlanmasında kapsamlı biyoinformatik düzeltme ve kalite kontrol adımlarını gerekli kılmaktadır. Bu durum, uzun okuma teknolojilerinin analitik gücünü, hesaplamalı altyapı ile doğrudan ilişkilendirmektedir (Jain et al., 2018; Koboldt, 2020).

Platformlar arası karşılaştırmada dikkate alınması gereken bir diğer unsur, dizileme sürecinin deneysel ve operasyonel boyutlarıdır. Örnek hazırlama karmaşıklığı, çalışma süresi, maliyet yapısı ve altyapı gereksinimleri, teknolojik tercihler üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Yüksek verimlilik sunan sistemler, büyük ölçekli projelerde avantaj sağlarken, esnek ve taşınabilir platformlar belirli saha uygulamalarında ön plana çıkabilmektedir. Bu çeşitlilik, tek bir platformun tüm analiz gereksinimlerine evrensel bir çözüm sunmadığını ortaya koymaktadır (Goodwin et al., 2016).

Karşılaştırmalı değerlendirmede veri yorumlama süreçleri de merkezi bir konuma sahiptir. Platforma özgü hata profilleri ve sinyal özellikleri, biyoinformatik analiz stratejilerinin platforma göre uyarlanmasını gerekli kılmaktadır. Bu bağlamda dizileme verisinin güvenilirliği, yalnızca deneysel aşamalara değil, veri işleme ve analiz basamaklarının bütüncül biçimde tasarlanmasına da bağlıdır. Dolayısıyla platform seçimi, biyoinformatik kapasite ve analiz hedefleri ile ele alınmalıdır (Koboldt, 2020).

Yeni nesil dizileme platformlarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi, teknolojilerin mutlak üstünlükleri üzerinden değil, belirli analiz hedeflerine ne ölçüde yanıt verebildikleri üzerinden anlam

kazanmaktadır. Kısa ve uzun okuma yaklaşımlarının birlikte değerlendirilmesi, genomik analizlerde kapsam ve doğruluk arasında dengeli bir strateji oluşturulmasına olanak tanımaktadır (Metzker, 2010; Goodwin et al., 2016).

6.3. Biyoinformatik Veri Analizi

Yeni nesil dizileme teknolojileri ile elde edilen büyük ölçekli genomik verinin biyolojik ve klinik olarak anlamlandırılabilmesi, deneysel sürecin başarısının ötesinde, sistematik ve güvenilir biyoinformatik analiz yaklaşımlarının uygulanmasını gerektirmektedir. Ham dizileme verisi, doğrudan yorumlanabilir bir bilgi kaynağı olmaktan ziyade, çok aşamalı bir işleme sürecinden geçirilmesi gereken karmaşık bir veri yapısını temsil etmektedir. Bu nedenle biyoinformatik analiz, dizileme teknolojilerinin sunduğu potansiyelin pratik çıktılara dönüştürülebilmesinde merkezi bir rol üstlenmektedir (Metzker, 2010; Koboldt, 2020).

Biyoinformatik veri analizi, dizileme sürecinin tamamlayıcı bir unsuru değil, genomik çalışmanın ayrılmaz bir bileşeni olarak ele alınmalıdır. Ham verinin kalite değerlendirmesinden başlayarak hizalama, varyant çağırımı, anotasyon ve sonuçların biyolojik bağlamda yorumlanmasına uzanan bu süreç, elde edilen verinin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini doğrudan belirlemektedir. Analiz basamakları arasında kurulacak tutarlı ve izlenebilir bir iş akışı, hem teknik hataların azaltılmasını hem de sonuçların farklı çalışmalar arasında karşılaştırılabilir olmasını mümkün kılmaktadır (Rehm et al., 2015a ; Koboldt, 2020).

Yeni nesil dizileme verisinin biyoinformatik analizi, büyük veri hacimleri ve karmaşık hata profilleri nedeniyle klasik veri işleme yaklaşımlarından ayrılmaktadır. Kısa okuma uzunlukları, platforma özgü yanlılıklar ve örnek kaynaklı varyasyonlar, analiz sürecinde dikkatle ele alınması gereken faktörler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda biyoinformatik analiz, yalnızca algoritmik bir işlem zinciri değil, aynı zamanda veri kalitesine ve biyolojik bağlama duyarlı bir değerlendirme süreci olarak ele alınmalıdır (Goodwin et al., 2016; Koboldt, 2020).

Biyoinformatik iş akışlarının güvenilirliği, kullanılan yazılım araçlarının yanı sıra, bu araçların hangi parametrelerle ve hangi varsayımlar altında çalıştırıldığı ile de yakından ilişkilidir. Farklı analiz stratejileri, aynı dizileme verisi üzerinde farklı sonuçlara yol açabilmekte; bu durum, biyoinformatik analizlerde standardizasyon ve şeffaflığın önemini ortaya koymaktadır. Analiz sürecinin her aşamasında yapılan tercihler, nihai sonuçların biyolojik ve klinik yorumlanabilirliğini doğrudan etkilemektedir (Rehm et al., 2015a).

Klinik genomik uygulamalarda biyoinformatik analiz, yalnızca varyantların teknik olarak tanımlanmasını değil, aynı zamanda bu varyantların klinik anlamlarının doğru biçimde değerlendirilmesini de kapsayan çok katmanlı bir süreçtir. Yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçların klinik kararlar üzerindeki potansiyel etkileri göz önünde bulundurulduğunda, biyoinformatik analizlerin titizlikle tasarlanması ve doğrulanması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle klinik bağlamda kullanılan biyoinformatik iş akışları, araştırma amaçlı analizlerden daha

katı kalite kontrol ve doğrulama kriterleri ile desteklenmektedir (Richards et al., 2015; Rehm et al., 2015a).

Bu bölümde biyoinformatik veri analizinin temel aşamaları, dizileme verisinin ham formdan biyolojik ve klinik olarak anlamlı bilgiye dönüştürülme süreci göz önünde bulundurularak ele alınacaktır. Böylece biyoinformatik analiz, teknik bir zorunluluk olmanın ötesinde, genomik verinin güvenilir ve etkili biçimde yorumlanmasını sağlayan stratejik bir bileşen olarak değerlendirilecektir (Koboldt, 2020).

6.3.1. Ham Veri İşleme ve Kalite Kontrol

Yeni nesil dizileme platformlarından elde edilen ham dizileme verileri, genellikle FASTQ formatında sunulmakta ve baz çağırımı ile kalite skorlarını içermektedir. Bu veriler, doğrudan biyolojik yorumlamaya uygun olmamakla birlikte, izleyen analiz basamaklarının güvenilirliğini belirleyen temel girdiyi oluşturmaktadır. Bu nedenle ham veri işleme aşaması, biyoinformatik analiz iş akışlarının en kritik basamaklarından biri olarak değerlendirilmektedir (Cock et al., 2010; Koboldt, 2020).

Ham dizileme verilerinin kalite değerlendirmesi, dizileme sürecinde oluşabilecek teknik hataların ve platforma özgü yanlılıkların erken aşamada tespit edilmesini amaçlamaktadır. Baz kalite skorlarının dağılımı, okuma uzunlukları boyunca kalite değişimleri ve adaptör kontaminasyonu gibi parametreler, veri kalitesinin bütüncül biçimde değerlendirilmesine olanak tanır. Bu değerlendirmeler, ilerleyen analiz basamaklarında yanlış hizalama ve hatalı varyant çağırımı risklerinin

azaltılması açısından büyük önem taşımaktadır (Andrews, 2010; Bolger et al., 2014).

Kalite kontrol sürecinde elde edilen bulgular doğrultusunda, düşük kaliteli bazların ve adaptör dizilerinin temizlenmesi yaygın olarak uygulanan bir adımdır. Bu tür ön işlemler, dizileme verisinin gürültü düzeyini azaltarak hizalama doğruluğunu artırır ve analiz sonuçlarının daha güvenilir hale gelmesine katkı sağlar. Ancak aşırı filtreleme uygulanması, veri kaybına ve kapsama derinliğinde istenmeyen düşüşlere yol açabileceğinden, kalite eşiklerinin dikkatle belirlenmesi gerekmektedir (Bolger et al., 2014; Koboldt, 2020).

Ham veri işleme sürecinde dikkate alınması gereken bir diğer önemli unsur, örnekler arası tutarlılığın korunmasıdır. Farklı örnekler arasında kalite parametrelerinde gözlenen belirgin farklılıklar, deneysel aşamalarda oluşabilecek sorunlara işaret edebilmektedir. Bu nedenle kalite kontrol sonuçlarının örnekler arası karşılaştırmalı biçimde değerlendirilmesi, sistematik hataların ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır (Head et al., 2014).

Ham veri işleme ve kalite kontrol adımları, biyoinformatik analiz sürecinin ilerleyen aşamalarında karşılaşılabilecek hataların önlenmesi açısından belirleyici bir rol üstlenmektedir. Okuma kalitesi, adaptör kontaminasyonu ve örnekler arası tutarlılığın bu aşamada değerlendirilmesi, hizalama ve varyant analizi gibi basamakların güvenilirliğini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle kalite kontrol süreci, analiz iş akışının teknik bir başlangıcından çok, bütün sürecin

sağlamlığını belirleyen temel bir değerlendirme noktası olarak ele alınmalıdır (Koboldt, 2020).

6.3.2. Dizi Hizalama (Alignment) ve Referans Genom Kullanımı

Dizi hizalama aşaması, ham dizileme verilerinin biyolojik olarak anlamlandırılabilmesi için referans genom ile ilişkilendirilmesini amaçlayan temel bir biyoinformatik adımdır. Kısa okuma uzunluklarına sahip dizileme verilerinin doğrudan yorumlanması mümkün olmadığından, bu okumaların uygun bir referans genom üzerinde konumlandırılması gerekmektedir. Bu süreç, dizileme verisinin genomik bağlam içerisine yerleştirilmesini sağlayarak izleyen analiz basamaklarının temelini oluşturmaktadır (Li & Durbin, 2009; Koboldt, 2020).

Hizalama algoritmaları, dizileme okumaları ile referans genom arasındaki benzerlikleri tespit etmeye yönelik olarak tasarlanmış hesaplamalı yaklaşımlara dayanmaktadır. Bu algoritmalar, okuma uzunluğu, hata profilleri ve genomik tekrar bölgeleri gibi faktörleri dikkate alarak en olası hizalama konumlarını belirlemeyi amaçlar. Bu bağlamda hizalama süreci, yalnızca teknik bir eşleştirme işlemi değil, dizileme verisinin biyolojik doğruluğunu etkileyen kritik bir değerlendirme aşaması olarak ele alınmalıdır (Li & Durbin, 2009; Langmead & Salzberg, 2012).

Referans genom seçimi, hizalama doğruluğu üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Kullanılan referansın kalite düzeyi, güncelliği ve analiz edilen örnek ile olan uyumu, hizalama sonuçlarının güvenilirliğini doğrudan etkilemektedir. Referans genom ile örnek

arasındaki yapısal farklılıklar ya da eksik bölgeler, yanlış hizalamalara ve izleyen analizlerde hatalı varyant çağrılarına yol açabilmektedir. Bu nedenle referans genom seçimi, biyoinformatik analiz sürecinde stratejik bir karar noktası olarak değerlendirilmelidir (Church et al., 2011; Koboldt, 2020).

Dizi hizalama sürecinde karşılaşılan bir diğer önemli zorluk, genomik tekrar bölgeleri ve düşük kompleksiteli dizilerdir. Bu bölgeler, birden fazla potansiyel hizalama konumu oluşturabilmekte ve okuma yerleştirmesinde belirsizliklere yol açabilmektedir. Hizalama algoritmaları, bu tür durumlarda kalite skorları ve istatistiksel eşikler kullanarak en olası konumları belirlemeye çalışsa da, belirli genomik bağlamlarda bu belirsizliklerin tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmayabilmektedir (Langmead & Salzberg, 2012).

Dizi hizalama süreci, dizileme verisinin genomik bağlam içerisine doğru biçimde yerleştirilebilmesi açısından merkezi bir öneme sahiptir. Kullanılan algoritmaların özellikleri ve referans genomun uygunluğu, izleyen varyant çağırımı ve anotasyon aşamalarının doğruluğunu doğrudan belirlemektedir. Bu bağlamda hizalama, yalnızca hesaplamalı bir eşleştirme işlemi değil, genomik verinin biyolojik anlamını şekillendiren kritik bir analiz basamağı olarak değerlendirilmektedir (Koboldt, 2020).

6.3.3. Varyant Analizi ve VCF Formatı

Varyant analizi, dizi hizalama aşamasının ardından genomik veride referans genomdan sapmaların sistematik biçimde tanımlanmasını amaçlayan temel bir biyoinformatik süreçtir. Bu analiz,

tek nükleotid değişimleri, küçük ekleme ve silinmeler ile daha karmaşık varyasyonların tespit edilmesini kapsayarak, dizileme verisinin biyolojik ve klinik olarak anlamlandırılmasında merkezi bir rol üstlenmektedir. Bu nedenle varyant analizi, ham dizileme verisinin işlenmesinden elde edilen çıktılar arasında en kritik değerlendirme basamaklarından biri olarak kabul edilmektedir (Koboldt, 2020; Nielsen et al., 2011).

Varyant çağırımı sürecinde kullanılan algoritmalar, hizalanmış okuma verileri üzerinde gözlenen baz farklılıklarını istatistiksel modeller aracılığıyla değerlendirerek gerçek varyantları teknik hatalardan ayırt etmeyi amaçlamaktadır. Okuma derinliği, baz kalite skorları ve hizalama güvenilirliği gibi parametreler, varyant çağırımının doğruluğunu belirleyen temel ölçütler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda varyant analizi, yalnızca bir tespit süreci değil, veri kalitesine duyarlı bir karar mekanizması olarak ele alınmalıdır (DePristo et al., 2011; Koboldt, 2020).

Varyant analizinin çıktıları, genellikle Variant Call Format (VCF) dosyaları içerisinde yapılandırılmış biçimde sunulmaktadır. VCF formatı, tanımlanan varyantların genomik konumları, referans ve alternatif aleller, kalite metrikleri ve örnek bazlı genotip bilgilerini standart bir çerçevede bir araya getirmektedir. Bu yapılandırılmış format, varyant verilerinin farklı analiz araçları arasında taşınabilirliğini ve yeniden işlenebilirliğini mümkün kılarak biyoinformatik iş akışlarında yaygın biçimde kullanılmaktadır (Danecek et al., 2011).

VCF dosyaları, yalnızca varyant bilgisini değil, aynı zamanda bu bilginin güvenilirliğine ilişkin çok sayıda ek parametreyi de içermektedir. Filtreleme bayrakları, kalite skorları ve açıklayıcı alanlar, varyantların analitik bağlamda değerlendirilmesine olanak tanır. Bu özellikler, biyoinformatik analizlerde düşük güvenilirliğe sahip varyantların elenmesini ve izleyen anotasyon aşamalarına daha sağlam bir veri setinin aktarılmasını mümkün kılmaktadır (Danecek et al., 2011; Koboldt, 2020).

Varyant analizi sürecinde karşılaşılan zorluklar arasında, platforma özgü hata profilleri, düşük kapsama derinliği ve heterojen örnek yapıları yer almaktadır. Bu faktörler, yanlış pozitif ya da yanlış negatif varyant çağırımı riskini artırabilmekte ve analiz sonuçlarının yorumlanmasını güçleştirebilmektedir. Bu nedenle varyant analizi, standartlaştırılmış iş akışları ve dikkatle belirlenmiş filtreleme kriterleri ile desteklenmesi gereken çok katmanlı bir süreç olarak ele alınmalıdır (Nielsen et al., 2011; Koboldt, 2020).

Varyant analizi, dizileme verisinde tanımlanan genomik sapmaların sistematik biçimde değerlendirilmesini sağlayarak, biyolojik ve klinik yorumlamanın temelini oluşturmaktadır. Bu sürecin çıktısı olan VCF dosyaları, varyant bilgilerini kalite metrikleriyle birlikte yapılandırılmış bir formatta sunarak izleyen analiz aşamalarına güvenilir bir veri tabanı sağlar. Bu yönüyle varyant analizi, ham dizileme verisi ile klinik ve biyolojik çıkarımlar arasında işlevsel bir ara katman oluşturmaktadır (DePristo et al., 2011; Danecek et al., 2011).

6.3.4. Varyant Anotasyonu ve Genom Veri Tabanları

Varyant anotasyonu, varyant çağırımı aşamasında tanımlanan genomik değişimlerin biyolojik ve klinik bağlamda anlamlandırılmasını amaçlayan kritik bir biyoinformatik süreçtir. Bu aşama, ham varyant listesinin ötesine geçilerek, her bir varyantın gen fonksiyonu, protein yapısı ve olası fenotipik etkileri açısından değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu nedenle varyant anotasyonu, genomik verinin yorumlanabilir bilgiye dönüştürülmesinde merkezi bir rol üstlenmektedir (McLaren et al., 2016; Koboldt, 2020).

Varyant anotasyonu sürecinde genom veri tabanları, tanımlanan varyantlara ilişkin mevcut biyolojik bilgilerin sistematik biçimde eşleştirilmesini sağlamaktadır. Genomik koordinatlar, gen modelleri ve fonksiyonel bölgeler gibi temel bilgiler, anotasyon araçları aracılığıyla referans veri tabanlarından elde edilmektedir. Bu entegrasyon, varyantların genom üzerindeki konumlarına bağlı olarak olası fonksiyonel sonuçlarının değerlendirilmesine olanak tanımaktadır (Aken et al., 2016; McLaren et al., 2016).

Genom veri tabanları yalnızca yapısal bilgileri değil, aynı zamanda varyantların popülasyon sıklıkları ve bilinen hastalık ilişkileri gibi klinik açıdan kritik verileri de içermektedir. Popülasyon temelli veri tabanları, nadir ve yaygın varyantların ayırt edilmesini mümkün kılarak yanlış pozitif klinik yorumların önlenmesine katkı sağlamaktadır. Bu tür bilgiler, özellikle klinik genomik analizlerde

varyantların önceliklendirilmesi açısından önemli bir referans noktası oluşturmaktadır (Karczewski et al., 2020; Landrum et al., 2018).

Varyant anotasyonu sürecinde karşılaşılan temel zorluklardan biri, farklı veri tabanları arasında yer alan bilgi tutarsızlıkları ve güncellik farklılıklarıdır. Aynı varyant için farklı kaynaklarda bildirilen etkiler, yorumlama sürecinde belirsizliklere yol açabilmektedir. Bu nedenle anotasyon süreci, tek bir veri tabanına dayalı olarak değil, çoklu kaynaklardan elde edilen bilgilerin bütüncül biçimde değerlendirilmesi yoluyla yürütülmelidir (Richards et al., 2015; Koboldt, 2020).

Anotasyon araçları ve genom veri tabanlarının etkin kullanımı, varyantların klinik ve biyolojik öneminin doğru biçimde yorumlanabilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Kullanılan yazılımların sürümleri, referans veri tabanlarının güncelliği ve analiz parametreleri, anotasyon çıktılarının güvenilirliğini doğrudan etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda varyant anotasyonu, teknik bir eşleştirme işleminin ötesinde, dikkatli metodolojik tercihler gerektiren çok katmanlı bir değerlendirme süreci olarak ele alınmalıdır (McLaren et al., 2016; Richards et al., 2015).

Varyant anotasyonu süreci, tanımlanan genomik değişimlerin fonksiyonel ve klinik bağlam içerisinde değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Genom veri tabanlarıyla kurulan bu ilişki, varyantların yalnızca genom üzerindeki konumlarıyla değil, olası biyolojik etkileriyle birlikte ele alınmasına olanak tanır. Bu nedenle anotasyon aşaması, varyant çağrımının ötesine geçerek genomik bilginin

anlamlandırılmasında belirleyici bir analiz katmanı olarak değerlendirilmektedir (McLaren et al., 2016; Koboldt, 2020).

6.3.5. Klinik ve Araştırma Amaçlı Yorumlama Stratejileri

Genomik varyantların yorumlanması, biyoinformatik analiz sürecinin teknik basamaklarının ötesine geçerek, elde edilen bulguların klinik ve araştırma bağlamında nasıl değerlendirileceğini belirleyen çok katmanlı bir süreçtir. Klinik ve araştırma amaçlı yorumlama stratejileri, benzer analiz adımlarını paylaşmakla birlikte, hedeflenen çıktılar ve karar mekanizmaları açısından farklı önceliklere sahiptir. Bu nedenle varyant yorumlama süreci, analiz amacına göre şekillenen esnek ve bağlama duyarlı yaklaşımlar gerektirmektedir (Richards et al., 2015; Rehm et al., 2015a).

Klinik amaçlı yorumlama stratejileri, varyantların hastalıkla ilişkili olma olasılığının sistematik biçimde değerlendirilmesini ve klinik karar süreçlerine rehberlik edecek güvenilir sonuçların üretilmesini hedeflemektedir. Bu bağlamda varyantların patojenite sınıflandırması, klinik genomik uygulamaların temel bileşenlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Klinik yorumlama sürecinde kullanılan kriterler, literatür kanıtları, popülasyon sıklıkları ve fonksiyonel etki öngörülerini gibi çok sayıda veri kaynağının bütüncül biçimde değerlendirilmesini gerektirmektedir (Richards et al., 2015; Karczewski et al., 2020).

Araştırma amaçlı yorumlama stratejileri ise daha keşif odaklı bir yaklaşımı benimsemekte ve genellikle yeni gen-fenotip ilişkilerinin ortaya konmasını hedeflemektedir. Bu bağlamda nadir ya da daha önce

tanımlanmamış varyantlar, biyolojik anlam ve fonksiyonel etki açısından daha geniş bir çerçevede ele alınabilmektedir. Araştırma ortamlarında yorumlama süreci, hipotez üretimine ve deneysel doğrulama çalışmalarına zemin hazırlayan esnek bir değerlendirme alanı sunmaktadır (MacArthur et al., 2014; Rehm et al., 2015a).

Klinik ve araştırma amaçlı yorumlama stratejileri arasındaki temel farklardan biri, belirsizliğe yaklaşım biçimidir. Klinik uygulamalarda belirsizlik, hasta güvenliği ve klinik kararlar üzerindeki potansiyel etkiler nedeniyle dikkatle sınırlandırılırken, araştırma ortamlarında belirsizlik çoğu zaman yeni bilgi üretiminin doğal bir parçası olarak kabul edilmektedir. Bu durum, varyantların sınıflandırılması ve raporlanmasında kullanılan eşiklerin ve kriterlerin bağlama göre uyarlanmasını gerekli kılmaktadır (Richards et al., 2015).

Varyant yorumlama sürecinde çok disiplinli yaklaşımlar da giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Klinik genetik, moleküler biyoloji, biyoinformatik ve ilgili uzmanlık alanlarının birlikte değerlendirme yapması, yorumlama sürecinin güvenilirliğini ve kapsamını artırmaktadır. Bu tür iş birlikleri, özellikle karmaşık ya da nadir varyantların değerlendirilmesinde daha dengeli ve bütüncül kararların alınmasına katkı sağlamaktadır (Rehm et al., 2015a).

Klinik genomik uygulamalarda biyoinformatik analiz, varyantların teknik olarak tanımlanmasının ötesinde, klinik bağlam içerisinde doğru biçimde yorumlanmasını gerektirmektedir. Yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların klinik kararlar üzerindeki olası etkileri göz önünde bulundurulduğunda, analiz iş akışlarının

standardizasyonu ve doğrulanabilirliği kritik bir önem kazanmaktadır. Bu durum, biyoinformatik analizlerin klinik uygulamalarda neden daha katı kalite kriterleriyle ele alındığını açıklamaktadır (Richards et al., 2015; Rehm et al., 2015a).

SONUÇ

Bu bölümde ele alınan dizileme teknolojileri ve biyoinformatik analiz yaklaşımları, genomik bilginin üretilmesi ve yorumlanmasının tekil yöntemlerle değil, birbirine bağlı ve tamamlayıcı süreçlerle mümkün olduğunu açık biçimde ortaya koymaktadır. Sanger dizileme, baz düzeyinde sunduğu yüksek doğruluk ve görsel olarak denetlenebilir çıktı yapısıyla genomik analizlerin metodolojik temelini temsil ederken; yeni nesil dizileme teknolojileri, paralel veri üretimi ve geniş kapsama alanı sayesinde genomik araştırmaların ölçeğini ve kapsamını belirgin biçimde genişletmiştir. Bu iki yaklaşım, farklı teknik özelliklere sahip olmalarına karşın, genomik analizlerde doğruluk ve kapsam gereksinimlerinin nasıl dengelendiğini gösteren tamamlayıcı örnekler sunmaktadır.

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin sağladığı yüksek veri üretim kapasitesi, genomik soruların daha karmaşık ve çok katmanlı biçimde ele alınabilmesini mümkün kılmıştır. Bununla birlikte, büyük ölçekli dizileme verisinin tek başına biyolojik ya da klinik anlam taşıması mümkün değildir. Bu noktada biyoinformatik veri analizi, ham dizileme çıktılarının kalite kontrol, hizalama, varyant çağırımı, anotasyon ve yorumlama basamakları aracılığıyla güvenilir bilgiye dönüştürülmesini sağlayan merkezi bir rol üstlenmektedir. Biyoinformatik analiz,

dizileme sürecinin tamamlayıcı bir unsuru olmaktan ziyade, genomik çalışmanın analitik omurgasını oluşturan vazgeçilmez bir bileşen olarak konumlanmaktadır.

Sanger dizileme, yeni nesil dizileme ve biyoinformatik analiz süreçleri birlikte değerlendirildiğinde, genomik analizlerde mutlak bir teknoloji üstünlüğünden söz etmek yerine, yöntemlerin kullanım bağlamına göre anlam kazandığı görülmektedir. Yüksek doğruluk gerektiren hedefli analizlerde ve doğrulama süreçlerinde Sanger dizileme öne çıkarken; geniş ölçekli taramalar ve karmaşık genomik desenlerin incelenmesinde yeni nesil dizileme platformları belirleyici bir avantaj sunmaktadır. Bu teknolojilerin ürettiği verinin güvenilir biçimde yorumlanabilmesi ise, standardize edilmiş ve şeffaf biyoinformatik iş akışlarının uygulanmasına bağlıdır.

Bu bağlamda genomik dizileme, yalnızca deneysel bir teknoloji seçimi olarak değil, deneysel tasarım, platform tercihi ve analitik stratejilerin birlikte ele alındığı bütüncül bir yaklaşım olarak değerlendirilmelidir. Dizileme teknolojilerinin sunduğu teknik kapasitenin etkin biçimde kullanılabilmesi, veri üretimi ile veri analizi arasındaki ilişkinin doğru kurulmasına ve sonuçların biyolojik ile klinik bağlamda temkinli biçimde yorumlanmasına bağlıdır. Bu bütüncül perspektif, genomik çalışmaların güvenilirliğini artırmakla kalmamakta; aynı zamanda elde edilen bulguların bilimsel ve klinik değere dönüştürülmesini de mümkün kılmaktadır.

KAYNAKÇA

Aird, D., Ross, M. G., Chen, W.-S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D. B., Nusbaum, C., & Gnirke, A. (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology*, 12(2), R18. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-r18>

Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., ... Searle, S. M. J. (2016). The Ensembl gene annotation system. *Database*, 2016, baw093. <https://doi.org/10.1093/database/baw093>

Al-Shuhaib, M. B. S. (2023). Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21, Article 115. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00587-6>

Andrews, S. (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Beck, T. F., Mullikin, J. C., NISC Comparative Sequencing Program, & Biesecker, L. G. (2016). Systematic evaluation of Sanger validation of next-generation sequencing variants. *Clinical Chemistry*, 62(4), 647–654. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249623>

Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., & Bignell, H. R. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53–59.
<https://doi.org/10.1038/nature07517>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., ... Schloss, J. A. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1146–1153.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1495>

Church, D. M., Schneider, V. A., Steinberg, K. M., Schatz, M. C., Quinlan, A. R., Chin, C. S., ... Hubbard, T. (2011). Modernizing reference genome assemblies. *PLoS Biology*, 9(7), e1001091.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001091>

Cock, P. J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1767–1771.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., ... Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>

DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., ... Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43(5), 491–498. <https://doi.org/10.1038/ng.806>

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2), 61–77. <https://doi.org/10.2144/000114133>

Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>

Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: Delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17, Article 239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>

Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., ... Phillippy, A. M. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*, 36(4), 338–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>

Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., ... MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>

Koboldt, D. C. (2020). Best practices for variant calling in clinical sequencing. *Genome Medicine*, 12, Article 91. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00791-w>

Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., ... Maglott, D. R. (2018). ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*,

46(D1), D1062–D1067.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>

Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>

Loman, N. J., Quick, J., & Simpson, J. T. (2015). A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nature Methods*, 12(8), 733–735.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3444>

MacArthur, D. G., Manolio, T. A., Dimmock, D. P., Rehm, H. L., Shendure, J., Abecasis, G. R., ... Banks, E. (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*, 508(7497), 469–476.
<https://doi.org/10.1038/nature13127>

McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., ... Cunningham, F. (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, 17, Article 122.
<https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies: The next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46.
<https://doi.org/10.1038/nrg2626>

Mu, W., Lu, H.-M., Chen, J., Li, S., & Elliott, A. M. (2016). Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(6), 923–932.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.07.006>

Nielsen, R., Paul, J. S., Albrechtsen, A., & Song, Y. S. (2011). Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*, 12(6), 443–451.
<https://doi.org/10.1038/nrg2986>

Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms. *BMC Genomics*, 13, 341.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>

Quick, J., Loman, N. J., Duraffour, S., Simpson, J. T., Severi, E., ... Carroll, M. W. (2016). Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, 530(7589), 228–232.
<https://doi.org/10.1038/nature16996>

Rehm, H. L., Bale, S. J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J. S., Brown, K. K., Deignan, J. L., ... Working Group of the American College of

Medical Genetics and Genomics. (2015a). ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*, 17(1), 68–73.

<https://doi.org/10.1038/gim.2014.138>

Rehm, H. L., Berg, J. S., Brooks, L. D., Bustamante, C. D., Evans, J. P., Landrum, M. J., Ledbetter, D. H., Maglott, D. R., Martin, C. L., Nussbaum, R. L., Plon, S. E., Ramos, E. M., Sherry, S. T., Watson, M. S., & ClinGen. (2015b). ClinGen: The clinical genome resource. *The New England Journal of Medicine*, 372(23), 2235–2242.
<https://doi.org/10.1056/NEJMsrl406261>

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424.
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

BÖLÜM 7:

PROTEİN ANALİZİ VE PROTEOMİK

Doç.Dr. Özgür ÇELEBİ
Atatürk Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Erzurum, Türkiye
E-mail: ozgur.celebi@atauni.edu.tr

Uzman Moleküler Biyolog Betül ARI
Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Erzurum, Türkiye
E-mail: betulari255@hotmail.com

GİRİŞ

Mikrobiyolojide proteomik analizler, genomik verilerin ötesine geçerek hücrenin anlık fizyolojik durumunu, çevresel stres faktörlerine verdiği yanıtları ve patogeneze süreçlerini anlamamızı sağlayan en dinamik araçlardır (Vogel & Marcotte, 2012). Genomik bilgi, bir mikroorganizmanın biyolojik potansiyelini belirlerken; proteomik, bu potansiyelin fonksiyonel olarak nasıl hayata geçirildiğini ve fenotipik

yansımasını gösterir (Aslam et al., 2017). Bakteriyel bir hücrede ifade edilen proteinlerin toplamı (proteom), sadece gen dizilimiyle değil, aynı zamanda transkripsiyonel düzenlemeler, translasyonel verimlilik ve karmaşık post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) gibi çok katmanlı süreçlerle şekillenir (Vogel & Marcotte, 2012).

Son yıllarda kütle spektrometrisi ve yüksek çözünürlüklü immünooblotlama tekniklerindeki teknolojik sıçramalar, mikrobiyal proteinlerin sadece tanımlanmasını değil, aynı zamanda protein-protein etkileşim ağlarının (interaktom) haritalanmasını da mümkün kılmıştır (Sauer & Kliem, 2010a). Bu durum, özellikle antibiyotik direnç mekanizmalarının deşifre edilmesi, yeni nesil aşı adaylarının belirlenmesi ve patojen-konak etkileşimlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması noktasında merkezi bir öneme sahiptir (Singhal et al., 2015a). Bu bölümde, ham mikrobiyal lizatlardan protein eldesinden başlayarak, bu proteinlerin kantitatif ve kalitatif analiz yöntemleri ile modern klinik tanıdaki rollerini kapsayan kapsamlı bir metodolojik perspektif sunulmaktadır.

7.1. Protein Ekstraksiyonu ve Solubilizasyon

Mikrobiyal protein analizinin başarısı, hedeflenen proteinin biyolojik aktivitesini ve yapısal bütünlüğünü koruyarak hücre dışına çıkarılmasına bağlıdır. Bu aşamada temel zorluk, mikroorganizmaların yapısal çeşitliliği ve özellikle hücre duvarı direncidir.

7.1.1. Mikrobiyal Spesifikasyon ve Hücre Parçalama Stratejileri

Protein izolasyonunda "tek bir yöntem her mikroorganizmaya uyar" yaklaşımı, mikrobiyal çeşitlilik nedeniyle geçersizdir. Ekstraksiyonun verimliliği, hedeflenen mikroorganizmanın hücre duvarı yapısına uygun parçalama yönteminin seçilmesine doğrudan bağlıdır (Hankins et al., 2013).

- **Bakteriyel Hücre Duvarı Farklılıkları:** *Escherichia coli* gibi Gram-negatif bakterilerde, ince bir peptidoglikan tabakası ve bir dış membran bulunur; bu yapı standart ozmotik şok veya hafif deterjan uygulamalarıyla (örn. Triton X-100) kolayca aşılabilir (Linke, 2009). Ancak Gram-pozitif bakterilerde (örn. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), hücreyi çevreleyen ve yüksek derecede çapraz bağlı olan kalın peptidoglikan tabakası, proteinlerin salınımı önünde ciddi bir fiziksel engel teşkil eder (Vollmer et al., 2008).
- **Mekanik Parçalama Yöntemleri:** Hücrelerin parçalanmasında mekanik ve kimyasal yaklaşımlar genellikle kombine edilerek kullanılır. Sonikasyon, yüksek frekanslı ses dalgalarının oluşturduğu kavitasyon enerjisiyle hücreleri parçalamada yaygın bir yöntemdir; ancak bu işlem sırasında açığa çıkan yüksek termal enerji protein denatürasyonuna yol açabileceği için numunenin mutlaka buz banyosunda tutulması ve işlemin kısa periyotlarla (pulse) yapılması zorunludur (Kämpfer, 1995).
- **Bead Beating (Bilyalı Parçalama):** Özellikle hücre duvarı dirençli olan Gram-pozitif bakteriler, mayalar ve sporlu formlar

için Bead Beating yöntemi tercih edilir. Bu yöntemde cam, seramik veya zirkonyum boncuklar aracılığıyla oluşturulan yüksek hızlı çarpışma enerjisi, en dirençli hücre duvarlarını bile yüksek verimle parçalayabilmektedir (Vandeventer et al., 2011).

- **Enzimatik Parçalama Yöntemleri:** Mekanik yöntemlerin verimini artırmak ve proteinlerin yapısal bütünlüğünü korumak amacıyla, mikrobiyal hücre duvarına spesifik enzimler sıklıkla sürece dahil edilir. **Lizozim (Muramidaz)** enzimi peptidoglikan tabakasındaki N-asetilmuramik asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) birimleri arasındaki β -1,4-glikozid bağlarını hidrolize eder (Salton & Kim, 1996). **Lizostafin** enzimi ise başta Staphylococcus türleri olmak üzere, peptidoglikan çapraz bağlarında bulunan pentaglisin (Gly5) köprülerini spesifik olarak hidrolize eden bir endopeptidazdır (Schindler & Schuhardt, 1964). Lizozime dirençli olan stafilokok hücre duvarlarının parçalanmasında kullanılır ve proteomik çalışmalarda hücre içi proteinlerin yüksek verimle geri kazanılmasını sağlar (Bastos et al., 2010). **Mutanolizin** ise Lizozime dirençli olan Streptococcus ve Lactococcus gibi türlerin hücre duvarını parçalamada kullanılan bir N-asetilmuramidazdır (Yokogawa et al., 1974).

7.1.2. Proteaz İnhibitörleri ve Stabilizasyon

Hücre parçalandığı anda, sitoplazmadan serbest kalan endojen proteazlar hedef proteinleri hızla degrade etmeye başlar. Bu bozulmayı

engellemek için ekstraksiyon tamponuna mutlaka proteaz inhibitör kokteylleri (PMSF, EDTA, Leupeptin, Aprotinin) eklenmelidir.

Parçalama sonrası, özellikle hidrofobik yapıda olan porinler ve dış membran proteinlerinin (OMP) çözünür hale getirilmesi (solubilizasyon) gerekir. Geleneksel deterjanlar (SDS) proteinleri denatüre ederken, CHAPS (zwitteriyonik) ve ASB-14 (amfofilik) gibi özel deterjanlar, protein-protein ve protein-lipid etkileşimlerini bozarak membran proteinlerini miseller içinde stabilize eder. Bu bileşikler, özellikle iki boyutlu (2D) elektroforez ve kütle spektrometrisi öncesinde proteinlerin çökmesini önlemek için vazgeçilmezdir (Rabilloud & Lelong, 2011).

7.2. SDS-PAGE ve Western Blotting

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve spesifik proteinlerin immünolojik olarak tespiti, mikrobiyal patogenezi çalışmalarında (örneğin toksin tespiti veya yüzey proteinlerinin analizi) merkezi bir rol oynar.

7.2.1. SDS-PAGE ve Proteinlerin Ayrılması

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), proteinlerin doğal yapılarını (ikincil ve üçüncül) bozarak onları doğrusal bir forma sokar. SDS, proteinlerin amino asit zinciri boyunca bağlanarak (yaklaşık her iki amino asit için bir SDS molekülü) proteine kütlesiyle orantılı, güçlü bir negatif yük kazandırır. Bu sayede proteinlerin jel içindeki göç hızı, yapısal formlarından bağımsız hale gelir ve sadece moleküler ağırlıklarına bağlı olarak ayrışırlar.

Bakteriyel lizat gibi karmaşık örneklerde, protein bantlarının netliği için "stacking" (yığma) ve "resolving" (ayırma) jellerinin pH farkından (pH: 6.8 vs pH: 8.8) yararlanılır (Brunelle & Green, 2014).

7.2.2. Protein Transferi (Blotting) ve Membran Seçimi

Jelde yürütülen proteinlerin antikorlarla etkileşime girebilmesi için jelden katı bir destek yüzeyine (membran) aktarılması gerekir. Mikrobiyal proteinlerin fizikokimyasal özellikleri (hidrofobisite, moleküler ağırlık, pI değeri) kullanılacak membranın türünü doğrudan belirler. Literatürde en yaygın kullanılan iki destek yüzeyi Nitroselüloz ve PVDF (Poliviniliden florür) membranlardır.

7.2.2.1 Nitroselüloz Membranlar

Western Blotting için geleneksel ve ekonomik bir seçenektir. Proteinleri elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler yoluyla bağlar. En büyük avantajı, arka plan gürültüsünün (background noise) düşük olması ve yüksek sinyal oluşturmastır. Özellikle orta ve yüksek moleküler ağırlıklı (20 kDa - 150 kDa) proteinlerin tespiti için idealdir. Ancak, nitroselüloz membranlar PVDF'ye göre daha kırılgandır ve "re-probing" (membranın yıkanıp tekrar başka bir antikorla muamele edilmesi) işlemleri için uygun değildir. Gözenek boyutu seçimi kritiktir; 0.45 µm standart proteinler için kullanılırken, 20 kDa altındaki küçük mikrobiyal proteinler için proteinin membrandan geçip gitmesini (blow-through) önlemek amacıyla 0.2 µm gözenek boyutu tercih edilmelidir (Kurien & Scofield, 2015).

7.2.2.2 PVDF Membranlar

Nitroselüloz menmbrana göre çok daha yüksek bir protein bağlama kapasitesine (yaklaşık 150-200 µg/cm²) sahiptir ve mekanik olarak oldukça dayanıklıdır. Bu dayanıklılık, PVDF'yi "stripping" (antikorları sökme) ve yeniden bağlama işlemleri için vazgeçilmez kılar. Özellikle bakteriyel dış membran proteinleri (OMP) gibi yüksek oranda hidrofobik yapıdaki proteinler PVDF'ye çok daha güçlü bağlanır. Ayrıca, düşük moleküler ağırlıklı (<20 kDa) küçük proteinlerin tutulmasında nitroselüloza göre üstünlük sağlar. Dezavantajı ise, kullanım öncesinde membranın mutlaka metanol ile aktive edilme zorunluluğu ve hidrofobik doğası nedeniyle arka plan gürültüsüne (non-spesifik bağlanma) daha yatkın olmasıdır. Mikrobiyal patogenezi çalışmalarında, nadir ifade edilen veya miktarı çok düşük olan efektör proteinlerin tespitinde yüksek hassasiyeti nedeniyle PVDF tercih edilmelidir (Mahmood & Yang, 2012; Towbin et al., 1979).

7.2.3. Membran Bloklama (Blocking) Stratejileri

Membranlar seçilip transfer işlemi tamamlandıktan sonra, membranın proteine bağlanmayan boş bölgeleri bulunmaktadır ve antikorların bu bölgelere non-spesifik olarak bağlanma riski oldukça yüksektir. Bloklama işlemi, bu boş alanların inert proteinler veya deterjanlar kullanılarak kapatılması ve böylece arka plan gürültüsünün (background noise) minimize edilerek sinyal-gürültü oranının maksimize edilmesi esasına dayanır (Kurien & Scofield, 2015).

- **Yağsız Süt Tozu (Non-Fat Dried Milk - NFDM):**

Laboratuvarlarda en yaygın kullanılan, ekonomik ve yüksek

verimli bloklama ajanıdır. İçerdiği kazein proteini, membrandaki boşluklara yüksek afinite ile hızla tutunur ve güçlü bir maskeleme sağlar (Johnson et al., 1984). Ancak, mikrobiyolojik ve moleküler çalışmalarda süt tozunun kullanımı 2 temel teknik kısıtlamaya sahiptir: **1-** Süt, doğal bir fosfoprotein olan kazeini içerir. Bu durum, fosfo-spesifik antikorlarla yapılan sinyal iletimi çalışmalarında antikorun kazeine çapraz reaksiyon vermesine ve yüksek arka plan kirliliğine neden olur (Mahmood & Yang, 2012). **2-** Süt içinde bulunan serbest biyotin molekülleri, streptavidin-biyotin bazlı tespit sistemlerinde etkileşime girerek sinyal oluşumunu inhibe edebilir veya yanlış sonuçlara yol açabilir (Mahmood & Yang, 2012).

- **Bovin Serum Albumin (BSA):** Genellikle %1-5 konsantrasyonunda tercih edilen BSA, süt tozuna kıyasla daha "homojen" ve "temiz" bir bloklama yüzeyi oluşturur. Moleküler yapısının sadeliğı sayesinde, özellikle bakteriyel proteinlerin fosforilasyon durumları incelenirken veya süt tozunun karmaşık protein yapısının maskeleyebileceğı eser miktardaki mikrobiyal antijenlerin hassas tespitinde kullanılır (Xiao & Isaacs, 2012). Ayrıca, BSA içeren bloklama çözeltileri, antikorların hedef epitopa erişimini kısıtlamadan daha spesifik bağlanma verileri elde edilmesine olanak tanır (Towbin et al., 1979) .

7.2.4. Antikor Seçimi ve İmmünobloklama Stratejileri

Bloklama işlemi tamamlandıktan sonra, hedef mikrobiyal proteine özgü antikorların (immünoglobulinlerin) uygulanmasına geçilir. Western Blotting'in başarısı, karmaşık bir mikrobiyal proteom içinden sadece hedef proteinin (antijen) hatasız bir şekilde seçilmesine bağlıdır. Bu seçimde kullanılan antikorların üretim kaynağı, işaretlenme biçimi ve uygulama stratejisi deneyin hassasiyetini belirler (Kurien & Scofield, 2015).

7.2.4.1 Poliklonal ve Monoklonal Antikor Seçimi

Laboratuvar pratiğinde, özellikle mikrobiyal proteinlerin tespitinde poliklonal antikorlar sıklıkla tercih edilir. Poliklonal antikorlar, hedef proteinin üzerindeki birden fazla farklı epitopu tanıdıkları için daha güçlü bir sinyal sağlarlar. Bu durum, proteinin denatüre olduğu (SDS-PAGE sonrası) ve bazı epitopların bozulduğu koşullarda büyük avantaj sağlar (Lipman et al., 2005). Öte yandan, monoklonal antikorlar tek bir epitopa bağlanarak çok yüksek özgüllük sunar; ancak hedeflenen epitopun saklanması veya modifiye olması durumunda sinyal kaybına yol açabilirler (Lipman et al., 2005).

Antikorların raporlayıcı enzimlerle (genellikle Horseradish Peroxidase- HRP) işaretli olup olmaması, deneyin basamak sayısını, hassasiyetini ve sinyal gücünü doğrudan değiştirir (Lequin, 2005). Bu seçim, hedeflenen mikrobiyal proteinin konsantrasyonuna ve beklenen özgüllük düzeyine göre yapılmalıdır.

- **HRP-Bağlı Primer Antikorlar (Doğrudan Yöntem):** Hedef mikrobiyal antikorunu tanıyan primer antikorun doğrudan HRP enzimi ile konjuge edildiği sistemdir. Bu antikorlar, hedef protein miktarının çok yüksek olduğu (örn. aşırı ifade edilen rekombinant proteinler) veya sekonder antikorun çapraz reaksiyon verme riskinin yüksek olduğu durumlarda seçilmelidir. Sekonder antikor uygulama basamağı olmadığı için deney süresini kısaltır ve non-spesifik bağlanmaları minimize eder (Zubair & Launico, 2025). Ancak bu yöntem sinyal amplifikasyonu yapamaz, dolayısıyla eser miktardaki proteinlerde saptama sınırı düşüktür.
- **HRP-Bağlı Sekonder Antikorlar (Dolaylı Yöntem):** Primer antikorun işaretlenmemiş olduğu, onu tanıyan ikinci bir antikorun HRP taşıdığı sistemdir. Standart mikrobiyolojik araştırmalarda, özellikle düşük konsantrasyonlu virülans faktörlerinin tespitinde tercih edilmelidir. Bir primer antikora birden fazla sekonder antikor bağlanabildiği için sinyal şiddeti dramatik şekilde artar (amplifikasyon) (Mahmood & Yang, 2012). Dolaylı yöntemde sekonder antikorun, primer antikorun üretildiği türü (Host) tanınması zorunludur (örn. primer tavşanda üretiliyse, sekonder "Anti-Rabbit IgG" olmalıdır) (Burnette, 1981).

Mikrobiyolojiye özgü en büyük risk, bazı bakterilerin antikorları doğal olarak bağlama yeteneğidir. Örneğin, *Staphylococcus aureus*'un ürettiği Protein A ve *Streptococcus* türlerinin ürettiği Protein

G, antikorun değişken bölgesi (Fab) yerine sabit bölgesine (Fc) bağlanır. Bu durum, primer antikor ortada olmasa bile sekonder antikorun bakteriyel yüzeye yapışmasına ve "yalancı pozitif" bantlar oluşmasına neden olur. Bu riski bertaraf etmek için blocking solüsyonlarında normal serum kullanımı veya spesifik Fc-blokajı yapan ajanların eklenmesi kritiktir (Kronvall et al., 1970; Surolia et al., 1982).

7.2.5. Kemilüminesans Görüntüleme Mekanizması

Modern laboratuvarlarda sinyal tespiti çoğunlukla Gelişmiş Kemilüminesans (ECL) yöntemiyle yapılır. Bu süreçte, sekonder antikora bağlı olan HRP (Horseradish Peroxidase) enzimi katalizör görevi görür. Membran üzerine hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lüminol içeren bir substrat çözeltisi eklenir. HRP enzimi, hidrojen peroksiti parçalayarak lüminolü oksitler. Oksitlenen lüminol, uyarılmış bir ara basamağa geçer ve kararlı hale dönerken mavi ışık (yaklaşık 425 nm) yayar (Whitehead et al., 1983). Bu ışık enerjisi, dijital görüntüleme sistemleri (CCD kameralar) veya röntgen filmleri tarafından yakalanarak bant yoğunluğu (dansitometri) olarak analiz edilir (Alegria-Schaffer et al., 2009). Bu yöntem, kolorimetrik yöntemlere göre 10-100 kat daha hassas olup, pikogram seviyesindeki proteinleri bile tespit edebilir (Mruk & Cheng, 2011).

7.3. Protein Miktar Tayini

Ekstraksiyon sonrası elde edilen protein konsantrasyonunun bilinmesi, downstream (akış aşağı) uygulamalarda jel yükleme miktarlarının standardize edilmesi için zorunludur. Mikrobiyal protein örnekleri genellikle deterjan, şelatlayıcı ajanlar veya indirgeyici

maddeler içerdüğinden, yöntem seçimi bu kontaminantların toleransına göre yapılmalıdır.

7.3.1. Bradford Metodu

Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerin bazik ve aromatik amino asit kalıntılarına bağlanması prensibine dayanır. Boyanın asidik ortamdaki kırmızımsı-kahverengi formu, proteine bağlandığında maviye dönüşür ve 595 nm'de absorbans verir. Bradford yöntemi, hızlı olması ve birçok şelatlayıcı ajana tolerans göstermesi nedeniyle avantajlıdır; ancak deterjanlara (örneğin SDS) karşı oldukça hassastır ve bu maddelerin varlığında hatalı sonuçlar verebilir (Bradford, 1976).

7.3.2. BCA (Bisinşoninic Asit) ve Lowry Metotları

Lowry metodu, proteinlerin bakır iyonlarını indirgemesi ve ardından Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenerek mavi renk oluşturması esasına dayanır (LOWRY et al., 1951). BCA yöntemi ise Lowry'nin modern bir modifikasyonudur; burada indirgenen bakır iyonları BCA ile stabil bir mor kompleks oluşturur (562 nm). BCA'nın en büyük avantajı, %5'e kadar olan deterjan konsantrasyonlarından etkilenmemesidir, bu da onu mikrobiyal lizat analizlerinde Bradford'a göre daha güvenilir kılar (Smith et al., 1985).

7.4. ELISA ve Protein-Protein Etkileşimleri

Mikroorganizmaların konak hücrelerle etkileşimi, hücre içi sinyal yollarının manipülasyonu veya patojenlerin salgıladığı

ekzotoksinlerin tespiti, proteinlerin spesifik bağlanma afinitelerinin incelenmesini gerektirir.

7.4.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve Mikrobiyal Uygulamalar

ELISA, mikrobiyal antijenlerin veya bu antijenlere karşı konakçı tarafından geliştirilen antikorların kantitatif tayini için altın standart kabul edilir (Engvall & Perlmann, 1971). Bu yöntemin mikrobiyolojideki başarısı, çok düşük konsantrasyonlardaki (pikogram/nanogram seviyesi) patojen bileşenlerini karmaşık biyolojik matrisler (serum, dışkı, gıda örneği vb.) içinden yüksek özgüllükle saptayabilmesinden kaynaklanmaktadır (Lequin, 2005).

- **Sandviç ELISA:** Özellikle bakteriyel toksinlerin (örn. *C. botulinum* toksini) veya viralproteinlerin tespiti için kullanılır. Kuyucuklara önceden kaplanmış olan "yakalayıcı" (capture) antikor, örneğin içindeki hedef proteini spesifik olarak tutar. Yıkama işlemlerinin ardından, proteinin farklı bir epitopuna bağlanan enzim işaretli bir "tespit antikorunu" eklenerek antijen-antikor kompleksi bir sandviç gibi tamamlanır. Hedef proteinin iki farklı antikor tarafından tanınması, yöntemin özgüllüğünü ve sinyal-gürültü oranını klasik dolaylı yöntemlere göre anlamlı ölçüde artırır (Lequin, 2005).
- **Dolaylı (Indirect) ELISA:** Serolojik taramalarda, hastanın serumunda patojene özgü antikor (IgM/IgG) olup olmadığını belirlemek için kullanılır. Bu yöntemin mikrobiyolojideki en

büyük avantajı, çok düşük konsantrasyonlardaki (nanogram seviyesi) patojen bileşenlerini yüksek özgüllükle saptayabilmesidir (Engvall & Perlmann, 1971).

7.4.2. İmmünopresipitasyon (IP) ve Co-IP

Protein-protein etkileşimlerini (PPI) belirlemek amacıyla kullanılan IP yönteminde, hedef proteine karşı geliştirilen spesifik bir antikor, hedef proteinin içinde bulunduğu kompleksi çözeltiden "çökerterek" izole eder. Bu süreç genellikle antikorun protein A/G kaplı manyetik boncuklara veya agaroz küreciklerine bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Bonifacino et al., 2016).

Mikrobiyolojide Co-IP (Co-Immunoprecipitation) uygulamaları, bir bakteriyel efektör proteinin (virülans faktörü) konak hücredeki hangi proteinle etkileşime girdiği ve bu etkileşimin fonksiyonel sonuçlarını kanıtlamak için kullanılan temel yöntemdir. Bu teknik, patojenin konak hücrenin sinyal yollarını, hücre iskeletini veya bağışıklık yanıtlarını nasıl manipüle ederek savunma mekanizmalarını bozduğunu moleküler düzeyde anlamamızı sağlar (Phizicky & Fields, 1995).

7.4.3. Mayada İki-Hibrit (Y2H) Sistemi ve Virülans Haritalama

In vivo bir yaklaşım olan Y2H sistemi, etkileşimi bir raportör genin aktivasyonu üzerinden takip eder. Sistemde bir "yem" (bait - örn. bakteriyel protein) ve bir "av" (prey - örn. konak hücre proteini) bulunur. Bu iki protein etkileşime girdiğinde, bir transkripsiyon faktörünün DNA bağlayıcı ve aktivasyon bölgeleri bir araya gelerek

gen ifadesini (örn. *lacZ*) başlatır geniş kapsamlı mikrobiyal interaktom haritalarının çıkarılmasına olanak tanır (Fields & Song, 1989; Uetz et al., 2000).

7.4.4. MALDI-TOF MS ile Protein Parmak İzi

Günümüzde kütle spektrometrisi, mikrobiyal proteomun hızlı bir şekilde analiz edilmesini sağlayarak tür ve alt tür düzeyinde tanımlama yapmak amacıyla klinik mikrobiyolojide temel bir standart haline gelmiştir (Sauer & Kliem, 2010b). Bu teknoloji, proteinlerin kütle/yük oranlarını temel alan "protein parmak izi" (protein fingerprinting) yöntemini kullanarak geleneksel fenotipik tanı sürelerini önemli ölçüde kısaltmıştır (Bizzini & Greub, 2010).

7.4.4.1 Çalışma Prensibi ve İyonizasyon

Yöntem, izole edilmiş mikroorganizma kolonisinin veya doğrudan klinik örneğin, düşük moleküler ağırlıklı ve UV ışığını emebilen bir matriks çözeltisi ile karıştırılması esasına dayanır (Singhal et al., 2015b). Matriks içindeki proteinlerin lazer atışları ile desorpsiyonu ve iyonizasyonu sağlanarak bir vakum tüpü içinde hızlandırılması süreci MALDI mekanizmasını oluşturur (Fenselau & Demirev, 2001). Protein iyonlarının dedektöre ulaşma süreleri (Time of Flight- TOF), doğrudan moleküler ağırlıklarıyla ilişkili olup, her mikroorganizma için özgün bir kütle spektrumu üretilmesini sağlar (Patel, 2015).

7.4.4.2 Klinik Mikrobiyolojideki Yeri ve Tanısal Avantajları:

- **Ribozomal Protein Odaklılık:** MALDI-TOF MS analizi, hücre içinde bol miktarda bulunan ve evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş olan ribozomal proteinleri temel aldığı için taksonomik tanımlamada yüksek doğruluk sunar (Sauer & Kliem, 2010b).
- **Tanı Hızı ve İş Akışı:** Geleneksel biyokimyasal ve morfolojik testlerin 24 ile 48 saatlik inkübasyon gereksinimine karşılık; bu sistem, protein spektrumlarını saniyeler içinde devasa veritabanlarıyla kıyaslayarak dakikalar bazında sonuç üretir (Cherkaoui et al., 2010).
- **Sepsis ve Acil Vakalar:** Özellikle pozitif kan kültürlerinden (bottled blood culture) doğrudan protein analizi yapılabilmesi, sepsis gibi hayati tablolarda doğru antibiyotik tedavisinin (ampirikten hedefe yönelik tedaviye geçiş) çok daha erken aşamada başlamasına olanak tanır (Moussaoui et al., 2010; Sauer & Kliem, 2010b).

SONUÇ

Protein analizi ve proteomik yaklaşımlar, modern mikrobiyolojinin betimsel bir bilimden öngörüselsel ve fonksiyonel bir disipline dönüşmesinde katalizör görevi görmüştür. Bu bölümde detaylandırılan hücre parçalama stratejilerinden başlayarak, modern kütle spektrometrisi yöntemlerine kadar uzanan teknik zincir,

mikroorganizmaların yaşam döngüsünü protein düzeyinde anlamamıza olanak tanımaktadır.

Western Blotting ve ELISA gibi klasik yöntemlerin, yüksek hassasiyetli görüntüleme sistemleri ve özgün antikor stratejileriyle entegre edilmesi, eser miktardaki virülans faktörlerinin bile yüksek özgüllükle tespitini mümkün kılmıştır. Bununla birlikte, protein-protein etkileşimlerini inceleyen moleküler sistemler, patojenlerin konak savunmasını nasıl manipüle ettiğini aydınlatarak yeni terapötik hedeflerin yolunu açmıştır. Özellikle MALDI-TOF MS teknolojisinin klinik laboratuvarlara girişi, tanı hızını saniyeler bazına indirerek protein analizinin halk sağlığı ve enfeksiyon kontrolündeki hayati önemini pekiştirmiştir. Böylelikle mikrobiyal proteomun derinlemesine analizi; klinik tanıda hızın, aşı teknolojisinde etkinliğin ve enfeksiyon kontrolünde başarının temel anahtarı haline gelmiştir.

KAYNAKÇA

Alegria-Schaffer, A., Lodge, A., & Vattam, K. (2009). *Chapter 33 Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection* (pp. 573–599). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63033-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63033-0)

Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>

Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G., & Coelho, M. L. V. (2010). Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals*, 3(4), 1139–1161. <https://doi.org/10.3390/ph3041139>

Bizzini, A., & Greub, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(11), 1614–1619. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x>

Bonifacino, J. S., Gershlick, D. C., & Dell’Angelica, E. C. (2016). Immunoprecipitation. *Current Protocols in Cell Biology*, 71(1). <https://doi.org/10.1002/cpcb.3>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). *One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)* (pp. 151–159). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>

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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., & Schrenzel, J. (2010). Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1169–1175. <https://doi.org/10.1128/JCM.01881-09>

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)

Fenselau, C., & Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4), 157–171. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>

Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245–246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>

Hankins, J. V., Madsen, J. A., Needham, B. D., Brodbelt, J. S., & Trent, M. S. (2013). *The Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria: Lipid A Isolation and Characterization* (pp. 239–258). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-245-2_15

Johnson, D. A., Gautsch, J. W., Sportsman, J. R., & Elder, J. H. (1984). Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene*

Analysis Techniques, 1(1), 3–8. [https://doi.org/10.1016/0735-0651\(84\)90049-9](https://doi.org/10.1016/0735-0651(84)90049-9)

Kämpfer, P. (1995). An efficient method for preparation of extracts from Gram-positive bacteria for comparison of cellular protein patterns. *Journal of Microbiological Methods*, 21(1), 55–60. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)00033-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)00033-4)

Kronvall, G., Seal, U. S., Finstad, J., & Williams, R. C. (1970). Phylogenetic Insight into Evolution of Mammalian Fc Fragment of γ G Globulin Using Staphylococcal Protein A. *The Journal of Immunology*, 104(1), 140–147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.104.1.140>

Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (Eds.). (2015). *Western Blotting* (Vol. 1312). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7>

Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>

Linke, D. (2009). *Chapter 34 Detergents* (pp. 603–617). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63034-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63034-2)

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>

Moussaoui, W., Jaulhac, B., Hoffmann, A.-M., Ludes, B., Kostrzewa, M., Riegel, P., & Prévost, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(11), 1631–1638. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x>

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2011). Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting. *Spermatogenesis*, 1(2), 121–122. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16606>

Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry*, 61(1), 100–111. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>

Phizicky, E. M., & Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 94–123. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.94-123.1995>

Rabilloud, T., & Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *Journal of Proteomics*, 74(10), 1829–1841. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.040>

Salton, M. R. J., & Kim, K.-S. (1996). *Structure*.

Sauer, S., & Kliem, M. (2010a). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 74–82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2243>

Sauer, S., & Kliem, M. (2010b). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 74–82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2243>

Schindler, C. A., & Schuhardt, V. T. (1964). LYSOSTAPHIN: A NEW BACTERIOLYTIC AGENT FOR THE STAPHYLOCOCCUS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(3), 414–421. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.3.414>

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015a). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015b). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

Surolia, A., Pain, D., & Islam Khan, M. (1982). Protein A: nature's universal anti-antibody. *Trends in Biochemical Sciences*, 7(2), 74–76. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(82\)90082-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(82)90082-2)

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., & Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein–protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403(6770), 623–627. <https://doi.org/10.1038/35001009>

Vandeventer, P. E., Weigel, K. M., Salazar, J., Erwin, B., Irvine, B., Doeblner, R., Nadim, A., Cangelosi, G. A., & Niemz, A. (2011). Mechanical Disruption of Lysis-Resistant Bacterial Cells by Use of a Miniature, Low-Power, Disposable Device. *Journal of Clinical*

Microbiology, 49(7), 2533–2539.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02171-10>

Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232.
<https://doi.org/10.1038/nrg3185>

Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>

Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G., Carter, T. J. N., Groucutt, C., & Kricka, L. J. (1983). Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. *Nature*, 305(5930), 158–159.
<https://doi.org/10.1038/305158a0>

Xiao, Y., & Isaacs, S. N. (2012). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)—not all BSAs are alike. *Journal of Immunological Methods*, 384(1–2), 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.06.009>

Yokogawa, K., Kawata, S., Nishimura, S., Ikeda, Y., & Yoshimura, Y. (1974). Mutanolysin, Bacteriolytic Agent for Cariogenic Streptococci: Partial Purification and Properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6(2), 156–165.
<https://doi.org/10.1128/AAC.6.2.156>

Zubair, M., & Launico, M. V. (2025). *Western Blot: Principles, Procedures, and Clinical Applications*.

BÖLÜM 8:

FLOW SİTOMETRİ (AKIŞ SİTOMETRİSİ) VE HÜCRESEL ANALİZLER

Doç. Dr. Demet ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: celebiidil@atauni.edu.tr

Dr. Ece KAPLAN

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: ece.aytek.98@gmail.com

GİRİŞ

Akış sitometrisi, bir hücrenin süspansiyon halinde bir ölçüm cihazından akarken boyut ve granüler yapısı gibi birden fazla fiziksel özelliğini eş zamanlı olarak ölçen gelişmiş bir cihazdır. Çalışma prensibi, incelenen hücrelerin ışık saçılma özelliklerine dayanır; bu özellikler, hücre yüzeyinde bulunan hücre dışı molekülleri veya hücre içindeki hücre içi molekülleri hedefleyen boyalar veya monoklonal antikorlardan elde edilebilir.

Tipik olarak florofor konjugeli antikorlar aracılığıyla gerçekleştirilen hedef molekül tanımlaması; hematopoetik hücrelerden mikroorganizmalara, bitki hücrelerinden ayrıştırılmış dokulara kadar çeşitlilik gösteren pek çok biyolojik sistemde uygulama alanı bulmaktadır. Akış sitometrisi, hücre zarları, sitoplazmik ve nükleer antijenlerin tespiti temelinde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Ayrıca, tam hücreler ve organeller, çekirdekler, DNA, RNA, kromozomlar, sitokinler, hormonlar ve protein içeriği gibi hücresel bileşenler de akış sitometrisi ile araştırılabilir. Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü analizi ile kalsiyum akışı ve membran potansiyeli ölçümleri, akış sitometrisi için geliştirilen ve yaygın olarak başvuru alan metodolojik uygulamaların başlıca örnekleridir. (Adan et al., 2017, Cossarizza et al., 2017)

Bu bölümde; modern biyoteknolojinin en güçlü analitik araçlarından biri olan akış sitometrisi teknolojisinin temel çalışma prensipleri ve çok yönlü uygulama alanları kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır.

8.1. Flow Sitometrinin Temel Prensipleri

Geliştirilen ilk akış sitometrisi, yalnızca hücrelerin boyutunu tespit eden tek parametrelili bir cihazdır. Günümüzde, 14 parametreyi aynı anda tespit etme kapasitesine sahip donanımlı cihazlar geliştirilmiştir (Wilkerson, 2012). Akış sitometrisi, tek bir hücrenin veya mikroorganizmalar, çekirdekler ve kromozom hazırlıkları gibi diğer parçacıkların optik ve floresan özelliklerini ölçme yeteneğine sahiptir; bu ölçüm, parçacıkların bir ışık kaynağından (genellikle bir

lazer ışını) geçtiği sıvı akışı içinde gerçekleşir (Macey, 2010). Hücre boyutu ve granülarite gibi fiziksel özelliklerin yanı sıra, antikor ya da kimyasal problardan türetilen floresan sinyalleri, hücrelerin multiparametrik karakterizasyonunda ve farklı fenotiplerin birbirinden ayırt edilmesinde kritik rol oynamaktadır (Wilkerson, 2012). Akış sitometreleri, çok sayıda hücresel özelliği tanımlamak için bir arada kullanılan üç ana sistemden oluşur: sıvı dinamiği, optik ve elektroniği. Akışkanlar sistemi, partikülleri içeren süspansiyonun odaklanmış ışık kaynağına hassas bir şekilde yönlendirilmesinden sorumludur. Eksitasyon (uyarma) optiği, ışık kaynağını hücreler veya partiküller üzerine odaklarken; toplama optiği, partikülden kaynaklanan ışık saçılımını veya floresan emisyonunu işlenmek üzere elektronik ağı iletmektedir. Elektronik ağ, sinyali algılar ve sinyalleri ışık yoğunluğuna orantılı dijital verilere dönüştürür; ayrıca verilerin analiz edilmesi için bir bilgisayara da ihtiyaç duyulmaktadır. (Tzanoudaki & Konsta., 2023)

8.1.1 Sıvı Dinamiği Sistemi

Akışkanlar sisteminin temel amacı; hücrelerin sıvı bir akış içerisinde algılama bölgesinden geçişini koordine etmek ve her bir hücrenin lazer kaynağından eşit miktarda ışığa maruz kalmasını sağlamaktır. Hücrelerin optik özelliklerinin hassasiyetle ölçülebilmesi için, hücrelerin odaklanmış lazer ışınlarının tam merkezinden geçmesi kritik öneme sahiptir. Işık toplama optiği, hücrelerin lazer ışınlarıyla kesiştiği noktaya odaklanarak saçılan ışık ve floresan sinyallerini toplar.

'Algılama bölgesi' (sensing zone) olarak tanımlanan bu alan, hücresel parametrelerin ölçüldüğü temel merkezdir. (Adan et al., 2017)

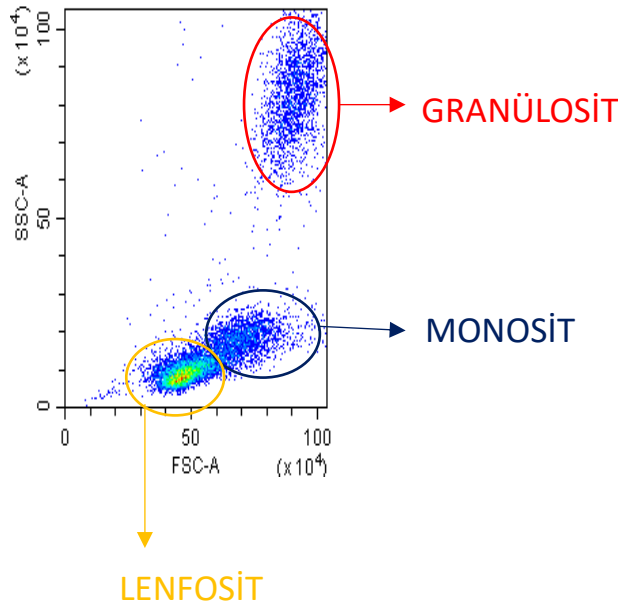
Sıvı sistemi, sheath akışı ve basınçlı hatlar ile hücreleri bir çözelti içerisinde alarak verileri elde etmek için cihaz üzerinden taşır. Kılıf (sheath) sıvısı, genellikle fosfat tamponlu salin (PBS) içeren bir seyreltici ve basınçlı hatlar vasıtasıyla cihazın merkezinde konumlanan akış hücresine (flow cell) iletilir. Eş zamanlı olarak, basınçlı bir hava hattı, numune tüpü içerisinde süspansiyon halindeki hücreleri akış lümenine enjekte ederek sisteme dahil eder. Örnek akışı, sheath akışının ortasında bir merkezi çekirdek haline gelir ve bu yapı, sheath akışı ile örnek akışı arasındaki basınç farkına dayanan koaksiyal akış olarak adlandırılır (Macey, 2010; Wilkerson, 2012). Örnek akışındaki basınç her zaman sheath akışının basıncından daha yüksektir, bu da hücrelerin lazer ışını üzerinden tek sıra halinde hizalanmasını sağlar. Bu olay, "hidrodinamik odaklama" olarak adlandırılır. Hidrodinamik odaklamanın ardından, hücreler bir lümen üzerinden akar ve burada bir veya daha fazla lazerin kesişimi gerçekleşir. Her lazer, ultraviolette infrared'e kadar olan belirli bir frekansta tek bir dalga boyu ışık üretir. Hücreler akış kabinini geçerken, lazer ışığını saçarlar; bu ışık, bir dizi dikroik ayna ve filtreler aracılığıyla fotomultiplator tüpleri (PMT'ler) yönlendirilerek tespit edilir. Aynı zamanda, hücrelere bağlı olan herhangi bir florokrom etiketli antikor da floresan yayarak ölçülebilir bir sinyal üretir (Tzanoudaki & Konsta., 2023, Cossarizza et al., 2017).

Hücrelerin lazer ışınına enjeksiyon hızı, analitik hedeflere bağlı olarak kullanıcı tarafından optimize edilebilmektedir. Örneğin; memeli hücrelerinin immünofenotiplendirilmesi gibi nitel ölçümlerde yüksek akış hızları tercih edilirken, DNA içeriği analizi gibi yüksek çözünürlük gerektiren uygulamalarda düşük akış hızları daha uygundur. Düşük akış hızı, numune çekirdeğinin çapını daraltarak aydınlatmanın homojenliğini ve ölçümün doğruluğunu artırmaktadır (Macey, 2010; Shapiro, 2004; Wilkerson, 2012). Partiküller ile lazer ışını arasında ideal bir kesişme sağlanması, akışkanlar sistemi bileşenlerinin stabil çalışmasına bağlıdır. Bu bağlamda operasyon sırasında sistemin hava kabarcığı ve kalıntılardan arındırılmış olması ve sürekli olarak uygun basınçta tutulması kritik öneme sahiptir. (Adan et al., 2017)

8.1.2 Optik Sistem

Bir akış sitometrisi, lazer, lensler ve sabit pozisyonlardaki toplama optiklerini içeren bir optik sistem bulundurur. Lensler ilgilenilen hücreden yayılan ışığı toplamak ve toplanan ışığı paralel hale getirerek optik tezgah boyunca dedektörlere yönlendirmek için kullanılırlar. Bu süreçte lazer, yüksek voltajlı elektrik enerjisi aracılığıyla elektronları daha yüksek enerji orbitallerine uyararak ışık üretimi gerçekleştirir. Uyarılan bu elektronlar, daha düşük enerji seviyelerine geri döndüklerinde foton (ışık partikülleri) salınımı yaparlar (Wilkerson, 2012). Lazer ışını hücrelere çarptığında, ışığın hücre kenarları etrafında sapmasıyla 'ışık saçılımı' (light scattering) olayı meydana gelir. Bu etkileşim sonucunda ileri saçılım (FSC) ve yan saçılım (SSC) olmak üzere iki temel saçılım türü oluşur. Lazer ışınına

yaklaşık 2-20°'lik bir açıyla ölçülen FSC, hücrenin yüzey alanı veya göreceli boyutuyla orantılıdır; bu durum FSC'yi, belirli bir boyutun üzerindeki partiküllerin tespiti ve immünofenotiplendirme çalışmaları için en yaygın kullanılan parametre haline getirmektedir SSC ise hücre granülaritesi ile ilişkilidir ve lazer hattına 90°'lik bir açıyla ölçülür. FSC gibi, her hücreye özeldir ve diğer ölçümlerle birlikte kullanılır. FSC ve SSC kullanarak, kan gibi heterojen dağılımlı bir örnekte ana alt popülasyonlar tanımlanabilir. Bu tür bir analiz Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil.1. Sağlıklı bir buzağıya ait kan numunesinin akış sitometrisi ile analizi. (Görsel Power Point programı kullanılarak hazırlanmıştır.)

Işık toplama optiği, parçacık-lazer ışını etkileşimi sonucu yayılan ışığı toplamak için bir dizi lens ve toplanan ışığın belirli dalga boylarını ayırmak ve yönlendirmek için bir dizi optik ayna ve filtre sistemini içerir (Reggeti & Bienzle, 2011).

Optik fitreler uzun geçişli filtreler, kısa geçişli filtreler ve bant geçişli filtreler olarak incelenebilir. Uzun geçişli filtreler, LP harfleri ve belirli bir sayı ile gösterilir, örneğin LP 750. Bu durum, 750 nm ve üzerindeki dalga boyuna sahip ışığın filtreden geçişine izin verilirken, bu değerin altındaki tüm dalga boylarının engellendiği anlamına gelmektedir. Kısa geçişli (short-pass) filtreler de benzer bir isimlendirme mantığına sahiptir; örneğin SP 500 filtresi, 500 nm'den kısa dalga boylarını geçirirken daha uzun olanları bloke eder. Bu durumda, 500 nm ve daha kısa dalga boylarına sahip ışık geçebilirken, geri kalan ışık engellenir. Bant geçişli filtreler, belirli bir dalga boyu aralığındaki ışığın geçmesine izin verir. Bant geçişli filtreler, BP harflerinin ardından iki sayı ile gösterilir. İlk sayı, dalga boyu aralığının orta noktasını temsil eder. İkinci sayı, geçebilecek dalga boyu aralığını nm cinsinden belirtir.

Dikroik aynalar esasen filtrelerle benzer işlevlere sahip olmakla birlikte, yerleşim geometrisi açısından farklılık gösterirler. Filtreler ışık yoluna dik (90°) olarak konumlandırılırken, dikroik aynalar ışık yoluna 45° 'lik bir açıyla yerleştirilirler. Bu yapılandırma sayesinde, dikroik aynadan geçemeyen (transmite edilemeyen) ışık, 90° 'lik bir açıyla saptırılarak bir sonraki ışık dedektörüne doğru yönlendirilir.

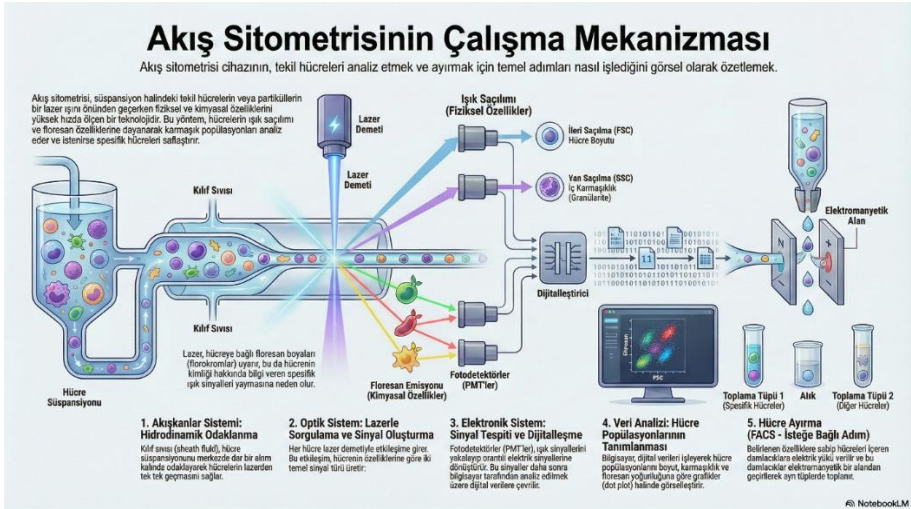
Fotomultiplikatör tüpler (PMT'ler), spesifik floresan emisyon kanallarını monitorize eden hassas fotodedektörlerdir. Bu bileşenler, partikül üzerindeki floroforlardan kaynaklanan zayıf ışık sinyallerini kaskat etkisiyle yükselterek analog bir elektrik akımına dönüştürür. Amplifikasyon düzeyi, PMT'ye uygulanan gerilim (gain) ile kontrol edilir; yüksek voltaj girişleri, sinyal şiddetini artırarak Ortalama Floresan Yoğunluğu (MFI) verilerini yukarı çeker. PMT çıkışında oluşan elektrik akımı, elektronik ağlar vasıtasıyla bir gerilim darbesi olarak kodlanarak dijital veri işleme sürecine hazırlanır (Cossarizza et al., 2017).

8.1.3 Elektronik Sistem

Akış sitometrisinin elektronik sistemi; lazer etkileşimi sonucu oluşan ve fotomultiplikatör tüpler (PMT) veya fotodiyotlar tarafından toplanan fotonları, ışık şiddetiyle orantılı analog elektrik akımlarına dönüştürür. Elde edilen bu analog sinyaller, analog-dijital dönüştürücülerin (ADC) bit derinliği kapasitesine göre sayısallaştırılarak bilgisayar arayüzüne aktarılır. Her bir hücrenin lazer demeti içinden geçişi esnasında oluşan voltaj darbesi (pulse), 'darbe işleme' (pulse processing) teknikleri aracılığıyla üç temel parametre üzerinden karakterize edilir: Sinyalin ulaştığı maksimum yoğunluğu Yükseklik (Height - H), hücrenin lazer odağındaki kalış süresini yansıtan ve hücre boyutuyla korelasyon göstergesini Genişlik (Width - W) ve toplam floresan miktarının integral değerini Alan (Area - A) ifade eder. Bu parametrik değerlendirmeler, özellikle hücre döngüsü analizlerinde iki diploid hücrenin (dublet) tek bir tetraploid hücreden

ayrıt edilmesinde ve veri hassasiyetinin korunmasında büyük önem arz etmektedir (McKinnon, K. M., 2018).

Akış sitometresinin çalışma mekanizması Şekil.2. de özetlenmiştir.



Şekil.2. Akış Sitometresinin çalışma mekanizması.(NotebookLM, Akış sitometresinin Çalışma Mekanizması)

8.2. Florokromlar ve Floresan Etiketleme

Hücrede halihazırda bulunan ve floresan özellik gösteren bileşiklerin sayısı ve etkinliğinin sınırlı olması nedeni ile hücreler, florokrom adı verilen floresan problerle boyanarak görünür hale getirilir. Floresan probler, hücre ayırma, immunfenotipleme, nükleik asit içeriğinin belirlenmesi, enzim aktivitesi, apoptik hücre popülasyonlarının ölçülmesi ve hücre yüzey reseptörlerinin

tanımlanması gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır. (Baumgarth, N., & Roederer, M., 2000)

Florokromlar, spesifik bir dalga boyunda enerjinin absorbe edildiği bir eksitasyon spektrumu ile emilen bu enerjinin ışık formunda salındığı bir emisyon spektrumuna sahiptir. Bir florokromun verimliliğini ve ayırt edilebilirliğini belirleyen temel parametrelerden biri olan Stokes Kayması, absorbsiyon ve emisyon dalga boylarının maksimum zirveleri arasındaki farkı ifade etmektedir. Enerji kaybı prensibi gereği, florokromun emisyon dalga boyu her zaman absorbsiyon dalga boyundan daha uzun olmalıdır. Örneğin; 400-550 nm aralığında ışığı absorbe eden ve 490 nm civarında maksimum eksitasyona ulaşan FITC molekülünün emisyon dalga boyu, bu değerlerin üzerinde bir spektrumda gerçekleşir.

Eksitasyon ve emisyon ışıklarının farklı dalga boylarında olması, bu sinyallerin optik filtreler aracılığıyla birbirinden efektif bir şekilde ayrılmasına olanak tanır. Akış sitometresinin eş zamanlı analiz edebileceği floresan renk sayısı ve spektral aralığı, cihazın konfigürasyonundaki lazer sayısına bağlıdır. Geleneksel sistemlerde yaygın olarak kullanılan 488 nm (mavi), 405 nm (violet), 561 nm (sarı-yeşil) ve 640 nm (kırmızı) gibi lazerler, florokromları uyatarak karakteristik ışımlar üretmelerini sağlar. Bu emisyonlar, dedektörler tarafından yakalanıp ölçülerek dijital verilere dönüştürülmektedir. (McKinnon, K. M., 2018).

8.2.1 Florokromların Sınıflandırması

Akış sitometrisinde kullanılan florokromlar; kimyasal yapıları, moleküler ağırlıkları ve uyarılma (eksitasyon) kaynaklarına göre spesifik kategorilere ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma, panel tasarımı ve veri doğruluğu açısından kritik öneme sahiptir.

8.2.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma

Küçük Organik Moleküller: Antikor konjugasyonunda yaygın olarak tercih edilen Florosein (389 Da), Texas Red (325 Da) ve Cy5 (762 Da) gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Bu moleküller, yaklaşık 50-100 nm aralığında dar bir Stokes Kayması sergileyen, kararlı ve tutarlı emisyon spektrumlarına sahip yapılardır. Özellikle Alexa Fluor (Thermo Fisher) serisi boyalar, yüksek fotostabilite değerleri ve fotobeyazlamaya (photobleaching) karşı dirençleri sayesinde hem akış sitometrisi hem de mikroskopik görüntüleme için ideal reaktiflerdir (McKinnon, K. M., 2018).

Fikobiliproteinler: Siyanobakteri ve alglerden türetilen, yüksek moleküler ağırlıklı (örneğin PE; 240.000 Da) büyük protein kompleksleridir. PE, APC ve PerCP gibi örnekleri içeren bu grup, 75-200 nm aralığındaki geniş Stokes kaymaları ve yüksek parlaklık değerleri ile öne çıkmaktadır. Ancak bu proteinlerin fotobeyazlamaya karşı hassas olmaları, uzun süreli veya tekrarlanan uyarım gerektiren uygulamalarda kullanımını sınırlandırmaktadır (McKinnon, K. M., 2018).

Polimer Boyalar: Işık sinyallerini toplamak üzere "ayarlanabilen" polimer zincirlerinden oluşan bu grup (BV, BUV ve BB serileri), fikobiliproteinlere benzer kuantum verimliliği sunarken çok daha yüksek bir fotostabilite sergiler. Polimer boyalar, belirli dalga boylarında spesifik olarak uyarılabilecek şekilde mühendislik ürünü olarak geliştirildikleri için, çok parametrelili deneylerde karşılaşılan "çoklu lazer uyarımı" sorunlarını minimize ederler (McKinnon, K. M., 2018).

Tandem Boyalar (FRET Çiftleri): Bir donör (genellikle bir fikobiliprotein veya polimer) ile bir akseptör (küçük organik molekül) arasındaki Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) mekanizmasına dayanır. Örneğin, PE-Texas Red tandeminde, PE'den yayılan enerji FRET aracılığıyla Texas Red'i uyararak tek bir lazer kaynağıyla (488 nm veya 532 nm) daha uzak dalga boylarında ışıma yapılmasını sağlar. 150-300 nm gibi oldukça geniş Stokes kaymalarına sahip olan bu boyalar, düşük yoğunluklu antijenlerin tespiti için son derece parlak seçenekler sunar. Ancak, enerji transfer verimliliğinin lot bazlı değişebilmesi ve donör-akseptör bağının kararsızlığı (decoupling), kompanzasyon sürecinde hassasiyet gerektirmektedir (McKinnon, K. M., 2018).

8.2.1.2. Eksitasyon Kaynağına (Lazer) Göre Sınıflandırma

Cihaz konfigürasyonundaki lazerlerin dalga boyları, kullanılabilecek florokrom spektrumunu doğrudan belirler:

Violet Lazer (405 nm): Özellikle BV serisi polimer boyaların geliştirilmesiyle çok parametrelili analizlerin merkezine yerleşmiştir. Pacific Blue, BV421 ve V500 bu spektrumda uyarılır.

Blue Lazer (488 nm): Akış sitometrisinin standart eksitasyon kaynağıdır; FITC, PerCP ve PerCP-Cy5.5 gibi klasik boyaların uyarılmasını sağlar.

Yellow-Green Lazer (561 nm): Fikobiliproteinler için optimize edilmiştir; PE ve PE-Cy7, PE-Texas Red gibi tandem türevlerinin en verimli şekilde okunduğu kanaldır.

Red Lazer (633/640 nm): APC, Alexa Fluor 647 ve APC-Cy7 gibi uzun dalga boylu florokromların uyarılmasından sorumludur.

8.3. Numune Hazırlama Teknikleri

Akış sitometrik analizlerde, numunelerin ölçüme uygun hale getirilmesi için standart bir iş akışı izlenmelidir. Bu protokolün aşamaları sırasıyla şunlardır: örnek hazırlığı, tek hücre süspansiyonu oluşturma, fiksasyon ve permeabilizasyon, bloklama, immün boyama ve yıkama.

8.3.1. Ön Hazırlık

Akış sitometrisinde elde edeceğiniz verinin kalitesi, doğrudan örneği cihaza vermeden önce nasıl hazırladığınıza bağlıdır. Güvenilir veri eldesi için numunedeki hücre yoğunluğunun optimize edilmesi şarttır. Hücre sayısının fazla olması, cihazın analiz hassasiyetini etkileyerek hatalı sonuçlara neden olurken; az olması veri toplama süresini uzatır. Buna ek olarak, ölü hücrelerin antikorlara spesifik

olmayan bağlanması sonucu oluşan 'yalancı pozitif' sinyallerin önüne geçilmelidir. Bu amaçla, FSC/SSC grafikleri üzerinden eleme yapılmalı ya da canlılık boyası (viability dye) kullanılmalıdır. Nadir hücre popülasyonlarının (örn. dolaşımdaki tümör hücreleri, hematopoetik kök hücreler) analizi söz konusu olduğunda ise, immünomanyetik yöntemlerle ön zenginleştirme yapılması önerilmektedir (Cossarizza et al., 2017).

8.3.2. Tek Hücre Süspansiyonu

Akış sitometrisi, hücrelerin hidrodinamik odaklama ile lazer hattından tekil olarak (single file) geçmesi prensibine dayanır. Bu gereklilik nedeniyle, katı dokuların disosiye edilerek tek hücre süspansiyonu elde edilmesi zorunludur. İşlemin temel amacı; hücre bütünlüğünü ve canlılığını koruyarak izolasyonu sağlamak, agregasyonu (topaklanmayı) engellemek ve numuneyi immünofenotipleme veya boyama işlemi için optimize etmektir. (Cossarizza., 2017). Bu bağlamda, sadece süspansiyon kültürlerden değil, aynı zamanda yapışan (adherent) hücre kültürlerinden ve katı dokulardan da veri elde edebilmek büyük önem taşır. Özellikle tümör araştırmalarında doku disosiyasyonu, sonuçları doğrudan etkileyen kritik bir adımdır. Mevcut standart protokollere ve otomatik ayrıştırma sistemlerine rağmen, en doğru veriyi elde etmek için ayrıştırma süreci her doku tipine özgü olarak optimize edilmelidir. Bu amaçla kullanılan yöntemler, temel olarak mekanik ve enzimatik ayrıştırma olmak üzere iki ana prensibe dayanır .

8.3.2.1. Mekanik Ayırıştırma

Doku bütünlüğünün, proteolitik enzimler kullanılmadan, tamamen fiziksel kuvvet uygulanarak bozulması işlemidir. İlk aşamada doku örnekleri, bisturi veya makas yardımıyla kıyılarak küçük parçalara ayrılır. Ardından bu parçalar, mekanik olarak ezilip uygun gözenek çapına sahip filtrelerden geçirilerek tek hücre süspansiyonu elde edilir (Cossarizza et al., 2017).

8.3.2.2.Enzimatik Ayırıştırma

Genellikle mekanik parçalama işlemini takiben veya bu işlemle eş zamanlı (kombine) olarak uygulanır. Temel amaç, hücre canlılığına ve bütünlüğüne zarar vermeden, ekstraselüler matris yapısını ve hücreler arası bağlantıları enzimler aracılığıyla hidrolize etmektir. Bu süreçte en sık tercih edilen ajanlar Tripsin ve Tip II Kollajenaz'dır. Literatürde yaygın olarak kullanılan diğer enzimler arasında ise Papain, Elastaz, Pronaz, Hiyalüronidaz ve Dispase yer almaktadır.

8.3.3. Fiksasyon ve Permeabilizasyon

Fiksasyon ve Permeabilizasyon: Akış sitometrisinde, hücre yüzeyinde bulunmayan intrasellüler moleküllerin (sitokinler, transkripsiyon faktörleri, fosfo-proteinler, nükleer DNA vb.) analizi için uygulanan iki temel kimyasal işlemidir .

- Fiksasyon (Sabitleme): Temel amacı, hücresel yapıları korumak, morfolojik bütünlüğü sağlamak ve proteinlerin konumlarını stabilize ederek "anlık metabolik durumlarını" dondurmaktır. Bu işlem için genellikle çapraz bağlayıcılar

(Formaldehit/Paraformaldehit) veya alkoller (Metanol/Etanol) kullanılır.

- Permeabilizasyon (Geçirgenleştirme): Antikorların hücre ve çekirdek zarından geçerek hedef moleküllere ulaşabilmesi için lipid membranın çözülerek geçirgenliğinin artırılması işlemidir. Bu amaçla hafif deterjanlar (Saponin), güçlü deterjanlar (Triton X-100) veya alkoller tercih edilir.

Fiksasyon ve permeabilizasyon işlemleri hücre canlılığını sonlandırır ve membran bütünlüğünü bozar. Bu nedenle, analiz sırasında ölü hücreleri artefaktlardan ayırt etmek için kullanılan "Fikse Edilebilir Canlılık Boyaları" (Fixable Viability Dyes), mutlak suretle bu kimyasal işlemlerden önce uygulanmalıdır (Krutzik, P. O., Nolan, G. P., 2003).

8.3.4. Bloklama

Akış sitometrik analizlerde, spesifik olmayan antikor bağlanmasından kaynaklanan yalancı pozitif sinyalleri önlemek amacıyla numunelere bloklama (blocking) işlemi uygulanmalıdır. İmmün boyamadan hemen önce yapılmalı ve tipik olarak hem spesifik olmayan antikor bağlanma etkileşimlerini hem de antikorların immün hücrelerdeki Fc reseptörlerine bağlanmasını ele almalıdır. Spesifik olmayan bağlanmanın bloklanması, numunenin sıgır serum albümini (BSA), protein içermeyen bir bloklayıcı veya normal bir hayvan serumu gibi bir protein çözeltisiyle inkübe edilmesiyle bloke edilir. Fc reseptör blokajı, yalnızca antijene özgü bağlanmanın gözlemlenmesini sağlar ve hedef spesifik antikor eklenmeden önce numunenin özel bir FcR bloke

edici ajanla (örneğin, Saflaştırılmış İnsan IgG-Fc Fragmenti, normal serum) inkübe edilmesini içerir (Andersen et al., 2016, Jamur, M. C., & Oliver, C. (2009))

8.3.5. Boyama

İmmünofenotipleme analizlerinin temelini oluşturan immünboyama metodolojisi, belirli epitoplara özgü monoklonal antikorların florokromlar veya kütle sitometrisi uygulamaları için ağır metal izotopları ile konjuge edilmesine dayanmaktadır. İşaretli antikorun hedef antijene bağlanmasını takiben, hücrenin lazer odağından geçişi sırasında meydana gelen floresan emisyonu veya kütle spektrometresi tabanlı metal tespiti, ilgili antijenin varlığını ve miktarını kantitatif olarak ortaya koymaktadır. Bu süreçte boyama stratejileri, hedef antijenin hücresel lokalizasyonuna göre iki ana grupta sınıflandırılır: Hücre yüzey boyaması, plazma membranının dış yüzeyinde bulunan CD3, CD4 veya CD19 gibi reseptörlerin canlı hücreler üzerinden doğrudan karakterizasyonuna olanak tanırken; hücre içi boyama, sitoplazma veya çekirdek içerisinde yer alan sitokinler ve transkripsiyon faktörlerinin (örneğin IFN- γ veya FoxP3) analizi için hücrelerin fiksasyon ve permeabilizasyon işlemlerinden geçirilmesini gerektirmektedir (Adan et al., 2017).

8.3.6. Yıkama

Akış sitometrisi protokollerinde, analiz güvenilirliğini sağlamak amacıyla stratejik yıkama adımları uygulanır. Bu işlemin temel amacı; hücresel artıkları ve besiyeri bileşenlerini uzaklaştırmanın yanı sıra, bağlanmamış (serbest) antikorları ortamdaki elimine etmektir. Böylece,

spesifik olmayan bağlanmadan kaynaklanabilecek arka plan sinyalleri ve yanıltıcı sonuçlar minimize edilir (Cossarizza et al., 2017)

8.4. Multicolor Flow Sitometri ve Veri Analizi

Çok renkli akış sitometrisi; spesifik hücresel alt popülasyonların tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla birden fazla floresan işaretleyicinin kullanıldığı, hızla gelişen bir teknolojidir. Bu teknoloji, saniyede on binlerce hücrenin analiz edilmesine ve ileri deneyler için hücre ayırma (sorting) yoluyla saf, canlı popülasyonların izole edilmesine olanak tanımaktadır (Maciorowski et al., 2017).

Bununla birlikte, geleneksel veri analizi; tipik olarak iki boyutlu saçılım (dot plot) veya kontur grafikleri üzerinden, parametrelerin 'sıralı manuel portlama' (sequential gating) yöntemiyle değerlendirilmesine dayanır. Bu yaklaşım, 3-4 renkli panellerin analizinde uygulanabilir olsa da; incelenen belirteç sayısı arttıkça süreç önemli ölçüde karmaşıklaşmaktadır. Yüksek boyutlu verilerdeki bu karmaşıklık, operatör kaynaklı varyasyonun artmasına (subjektivite) ve verilerin tekrarlanabilirliğinin azalmasına neden olmaktadır (O'Neill et al., 2013,).

Sonuç olarak; veri boyutluluğundaki bu hızlı artış, yüzlerce örneği otomatik olarak işleyebilen yüksek verimli robotik platformların gelişimiyle birleştiğinde; geleneksel yöntemlerin ötesine geçen, gelişmiş hesaplamalı analiz yöntemlerine duyulan ihtiyacı zorunlu kılmıştır (O'Neill et al., 2013,).

Akış sitometri veri analizini karakterize eden adımlar (Bashashati., Brinkman., 2009)

1. Veri ön işleme (Konpansasyon, dönüşüm, kalite kontrol ve normalizasyon)
2. Hücre popülasyonunun tanımlanması
3. Örnekler arası karşılaştırma
4. Yorumlama (keşif veya teşhis)

8.4.1. Veri Ön İşleme

Akış sitometrisi verileri, cihazdan alınan ham dijital sinyallerden biyolojik anlam ifade eden sonuçlara dönüştürülene kadar kapsamlı bir ön işleme sürecinden geçmelidir. Bu aşama, verideki teknik artefakt temizlenmesi, cihazlar arası varyasyonun giderilmesi ve verinin istatistiksel analizlere uygun hale getirilmesi için kritik olan dört ana adımı içerir: kompansasyon, kalite değerlendirmesi, normalizasyon ve dönüşüm. (O'Neill et al., 2013,)

8.4.1.1. Kompansasyon

Floresan tabanlı akış sitometrisinde, her florokromun emisyon spektrumu belirli bir dedektör için optimize edilmiş olsa da; yayılan ışık genellikle komşu dedektörlerin filtre aralıklarına da girer. 'Spektral örtüşme' veya 'spektral sızıntı' olarak adlandırılan bu fenomen, bir hücrenin gerçekte negatif olduğu bir belirteç için yanlış pozitif sinyal üretmesine neden olabilir (Roederer, 2002).

Kompansasyon, bu hatalı sinyalleri matematiksel yöntemlerle düzeltme işlemidir. Geleneksel yöntemlerde, her bir florokromun tüm kanallardaki sızıntı oranlarını tanımlayan bir 'Sızıntı Matrisi' (Spillover Matrix) oluşturulur. Lineer cebir kuralları çerçevesinde, ham veri matrisi bu sızıntı matrisinin tersi (inverse) ile çarpılarak, her kanal için düzeltilmiş 'saf' sinyal elde edilir (Hahne et al., 2009).

Modern spektral sitometrelerde ise bu süreç daha gelişmiş bir yaklaşımla ele alınır. Sinyaller, tam spektrumun referans kontroller kullanılarak matematiksel olarak ayrıştırıldığı 'Unmixing' (spektral ayrıştırma) algoritmaları ile işlenir. Bu yöntem, emisyon profilleri birbirine çok yakın olan florokromların dahi yüksek çözünürlükle ayırt edilmesine olanak tanır. Hesaplamalı analizlerde (örneğin R ortamında), kompansasyon işlemi genellikle flowCore ve flowUtils gibi özelleşmiş paketler aracılığıyla uygulanmaktadır (Hahne et al., 2009, Spidlen et al., 2008).

8.4.1.2. Kalite Kontrol

Veri toplama sürecinde tıkanıklıklar, akış hızı dalgalanmaları veya lazer istikrarsızlığı gibi teknik sorunlar veride yapay popülasyonların oluşmasına neden olabilir. Bu artefakt verilerin analizden çıkarılması, sonuçların doğruluğu için şarttır (Le Meur et al., 2008). Akış sitometrisi verilerindeki teknik hataların giderilmesi için geliştirilmiş çeşitli hesaplamalı araçlar mevcuttur. Bunlardan ilki olan QUALIFIER paketi; FlowJo gibi platformlarda oluşturulan manuel portlama (gating) şablonlarını temel alır ve bu şablonlardaki tanımlı

popölasyonlar üzerinde kalite kontrol analizleri gerçekleştirir (Finak et al., 2012).

Olay dölzeyindeki anormalliklerin otomatik tespiti ve veri setinden temizlenmesi için ise literatölde öne çıkan iki temel algoritma bulunmaktadır:

- flowAI: Veri kalitesini üç kritik parametre üzerinden değerlendirir: akış hızı kararlılığı, sinyal alım kalitesi ve dinamik aralık limitleri (Monaco et al., 2016).

- flowClean: Veri toplama (alım) süresi boyunca örnek içerisindeki floresan yoğunluk dalgalanmalarını izler ve zaman ekseninde meydana gelen istatistiksel sapmaları tespit ederek temizler (Fletez-Brant et al., 2016).

8.4.1.3. Normalizasyon

Çoklu örnek setlerinde, biyolojik farklılıklardan ziyade cihaz performansı veya pipetleme hataları gibi teknik varyasyonlardan kaynaklanan sapmaları elimine etmek amacıyla uygulanan kritik bir ön işleme adıımıdır. Bu prosedöl, veri setindeki 'teknik artefakt' baskılayarak, analizin yalnızca örnekler arasındaki gerçek ve anlamlı biyolojik varyasyonlara odaklanmasını sağlar (O'Neill et al., 2013,).

8.4.1.4. Dölüşöl

Akış sitometrisi (FCM) verilerinin doğru analizi; asimetrik dağılımlar, örtüşen popölasyonlar, sık görölün aykırı değerler ve varyansın floresan yoğunluğuna bağlı olarak arttığı veri yapısı nedeniyle oldukça karmaşıktır. Bu faktölrer, hem manuel hem de

otomatik kapılama (gating) süreçlerinin doğruluğunu ve sonraki analizlerin güvenilirliğini olumsuz etkiler (Finak et al., 2012).

Optimal bir dönüşüm süreci; hücre popülasyonlarının veri aralığının tamamında yüksek çözünürlükle ayrıştırılmasını sağlayan, görselleştirmeyi iyileştiren ve örnekler arası karşılaştırmayı standardize eden matematiksel bir algoritmadır (Finak et al., 2012).

Akış sitometrisi (FCM) verilerinin analizi için literatürde tanımlanmış birçok dönüşüm algoritması mevcuttur. Geleneksel logaritmik dönüşüm, yüksek floresan yoğunluğuna sahip popülasyonların varyansını stabilize etmede başarılıdır; ancak kompansasyon sonrası ortaya çıkabilen negatif veri değerlerini matematiksel olarak tanımlayamaz. Bu kısıtlılık, verilerin eksenler üzerinde sıkışmasına ve düşük yoğunluklu veya negatif popülasyonların çözünürlüğünün bozulmasına neden olur. Bu problemi aşmak için; sıfır noktası etrafında lineer, yüksek değerlerde ise logaritmik davranış sergileyen alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında Doğrusal-Logaritmik (LinLog), Çift Üstel (Logicle), Genelleştirilmiş Arcsinh ve Box-Cox dönüşümleri yer almaktadır. Bahsi geçen tüm bu gelişmiş algoritmalar, R tabanlı BioConductor flowCore paketi içerisinde uygulanabilmektedir (Finak et al., 2012).

8.4.2. Hücre Popülasyonlarının Tanımlanması

Akış sitometrik verilerinin analizinde kritik bir adım, daha ileri analiz için işlevsel ve fenotipik olarak homojen hücre grupları içeren çok boyutlu bölgelerin tanımlanmasıdır. Bu işleme “kapılama (gating/portlama)” denir (Montante., Brinkman., 2019) . Kapılama

yöntemleri iki ana kategoriye ayrılabilir: sıralı (Manuel) kapılama ve otomatik kapılama

8.4.2.1. Sıralı (Manuel) Kapılama

Sıralı kapılama temelli analiz, manuel olarak gerçekleştirilir ve bir veya iki boyutlu grafiklerin görsel incelemesine dayanır. Yüksek boyutlu veri setlerini çözümleyebilmek için, hiyerarşik bir düzen içinde 'ardışık portlama' stratejisi uygulanmalıdır. Araştırma grupları, sıralı kapılama analizleri için geleneksel olarak ticari yazılım paketlerini kullanmaktadır. Bu araçlar, kullanıcıların eksen çiftlerini (iki belirteç) sırasıyla seçip, hücre popülasyonları etrafına manuel sınırlar (kapılar) çizdiği ve analizi kademeli olarak daralttığı, yarı otomatik bir kapılama yöntemine olanak tanır. Bu süreçte kullanıcı, bir sonraki görselleştirmeyi yalnızca seçilen kapı içindeki hücrelerle sınırlandırarak, yinelemeli bir model oluşturur(Meehan et al., 2014, Montante., Brinkman., 2019) .

8.4.2.2. Otomatik Kapılama

Otomatik kapılama; hücre popülasyonlarının floresan yoğunluk dağılımlarının matematiksel olarak modellenmesi prensibine dayanır. Bu alanda geliştirilen algoritmaların performanslarını objektif olarak karşılaştırmak amacıyla, FlowCAP (Flow Cytometry: Critical Assessment of Population Identification Methods) projesi kapsamında çeşitli standart kıyaslama testleri yürütülmektedir (Aghaeepour et al., 2013). Otomatik kapılama yöntemleri, temel olarak iki farklı hesaplamalı yaklaşım ile gerçekleştirilir: Denetimsiz (Unsupervised) ve Denetimli (Supervised).

8.4.2.2.1. Denetimli Hücre Popülasyonunun Tanımlanması

Denetimli (gözetimli) analiz yöntemlerinde; algoritmanın eğitimi için operatörün, iki temel bileşeni içeren bir veri setine gereksinimi vardır:

Belirteç Ölçümleri: Her bir olay (hücre) için kaydedilen floresan sinyal değerleridir. Bu ölçümler, matematiksel modelin girdisini oluşturan bağımsız değişkenler olarak kabul edilir.

Hücre Tipi Etiket: Her bir olayla ilişkili olan ve olayın ait olduğu sınıfı gösteren tanımlayıcıdır. Aynı etiketi taşıyan tüm hücreler, tek bir homojen popülasyonu temsil eder. Hücre tipi, matematiksel modelin bağımlı değişkenini oluşturur (Bashashati., Brinkman., 2009).

OpenCyto: Manuel gating mantığını otomatize eden bir framework'tür. Kullanıcı bir kapı hiyerarşisi tanımlar ve algoritma bu hiyerarşiyi tüm örneklerle otomatik olarak uygular (Finak et al., 2012).

8.4.2.2.2. Denetimsiz Hücre Popülasyonunun Tanımlanması

Denetimsiz yaklaşımlarda, operatörün herhangi bir etikete veya referans olarak önceden tanımlanmış bir sınıfa ihtiyacı yoktur. Başka bir deyişle, bağımlı değişken yoktur.

Model tabanlı ve model tabanlı olmayan yaklaşımları içeren, denetimsiz algoritmalar kullanan bazı otomatik kapılama yöntemleri şunlardır:

flowMeans: K-means algoritmasını modifiye ederek Mahalanobis mesafesi temelli bir birleştirme süreci kullanır. Bu,

küresel olmayan (elipsoid veya konkav) popülasyonların daha doğru tanımlanmasını sağlar (Montante., Brinkman., 2019).

FlowSOM, yüksek boyutlu sitometri verilerini analiz etmek için kullanılan en hızlı ve popüler algoritmalarından biridir. Algoritma, hücreleri bir ızgara üzerindeki "düğümlere" (nodes) atayarak veriyi temsil eden bir harita oluşturur (Montante., Brinkman., 2019).

SPADE (Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events) algoritması, akış sitometri verilerinin, verilerdeki tüm boyutları yansıtan hiyerarşik olarak düzenlenmiş birçok kümeye bölünmesine olanak tanır. Kullanıcı, minimum yayılma ağacı görselleştirmesinden yararlanarak bilinen ve yeni hücre tiplerini tanımlayabilir ve etiketleyebilir (Montante., Brinkman., 2019)

8.4.3. Örnekler Arası Karşılaştırma

Bireysel örneklerde hücre popülasyonları tanımlandıktan sonra, bir sonraki adım, hücre popülasyonu özelliklerinin tüm örnek kümesiyle karşılaştırılabilmesi için örnekler arasında hücre popülasyonlarını eşleştirmektir. Bu, "popülasyon eşleştirme" algoritmaları ile gerçekleştirilir (Montante., Brinkman., 2019).

flowMatch, meta-kümeler ve şablon yapılarını kullanarak örnekler arası popülasyon eşleştirmesi yapan bir araçtır. Flowmap-RF ise örnekler arası popülasyon eşleştirmesi yapan başka bir araçtır, ancak hücre popülasyonlarını doğrudan Friedman-Rafsky (FR) test istatistiğini kullanarak karşılaştırır (Hsiao et al., 2016).

8.4.4. Yorumlama

Veri analizi sonuçlarının biyolojik veya klinik bir sonuca bağlanması, yorumlama aşamasını oluşturur. Bu süreçte ya bilinen hastalık modelleriyle karşılaştırma yapılır (Teşhis) ya da yeni hücre alt grupları aranır (Keşif) (O'Neill et al., 2013.).

flowType Algoritması: Yüksek boyutlu verilerdeki tüm olası fenotipleri (hücre alt kümelerini) otomatik olarak tarayarak, yalnızca klinik sonuçlarla istatistiksel olarak anlamlı ilişkiye sahip popülasyonları belirler. Algoritma, biyolojik sonuç üzerindeki etkisi zayıf olan belirteçleri sistematik olarak eleyerek; orijinal karmaşık veri setini, en kritik ve sade belirteç kombinasyonlarını içeren optimize edilmiş bir modele indirger (Montante., Brinkman., 2019).

8.5 İmmünofenotipleme (Immunophenotyping)

İmmünofenotiplendirme (hücrel fenotipik karakterizasyon); periferik kan, kemik iliği veya doku süspansiyonları gibi heterojen popülasyonlardaki hücre türlerinin, florokrom konjugeli monoklonal antikorlar aracılığıyla tanımlanması sürecidir. Bu süreçte hücreler, uluslararası standartlara sahip "Cluster of Differentiation" (CD) isimlendirme sistemiyle kodlanan spesifik yüzey veya hücre içi antijenlerine göre sınıflandırılmaktadır. Patolojik veya atipik bir hücre topluluğu saptandığında, ilgili popülasyonun immünofenotipik profilinin çıkarılması tanısal bir zorunluluktur. Bu profil, antijen taşıyan hücrelerin yüzdesi (%) ve antijen yoğunluğunu yansıtan Ortalama Floresan Şiddeti (MFI) verileriyle ifade edilir. MFI değerleri, hücre

üzerindeki mutlak antijen sayısının yanı sıra kullanılan florokromun kuantum verimliliğiyle de doğrudan ilişkilidir (Kalina., 2019)

Akış sitometrisi ile yapılan immünofenotiplemenin sunduğu temel avantajlar şunlardır:

1. Hücrelerin morfolojik özelliklerine (büyüklük - FSC ve granülarite - SSC) göre fiziksel sınıflandırma yapılabilmesi.
2. Ölü hücrelerin ve debrislerin analiz dışı tutularak veri saflığının artırılması.
3. Zayıf eksprese edilen (low-density) yüzey antijenlerinin yüksek hassasiyetle tespiti.
4. Çok renkli (multiparametrik) analizler sayesinde hücrelerin ontogenetik gelişim evrelerinin net bir şekilde belirlenmesi.
5. Aynı örnekte bulunabilen birden fazla hematolojik malignitenin veya bifenotipik hücre popülasyonlarının eş zamanlı teşhisi. (BD Biosciences, t.y.)

Klinik onkolojide, lösemi ve lenfoma tanısı için WHO (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlerine dayalı spesifik paneller kullanılır. Örneğin, B-hücreli kronik lenfositik lösemi (B-CLL) tanısı için lenfositlerin CD5, CD19, CD23 pozitif ve CD20, sIg zayıf pozitif olması karakteristiktir (Kala, P. S., Zubair, M., 2024).

Akış sitometrisi ile immünofenotipik karakterizasyon, standardize edilmiş bir operasyonel iş akışını takip ederek biyolojik örneklerden yüksek çözünürlüklü dijital verilere ulaşılmasını sağlar.

Bu süreç temel olarak beş ana basamaktan oluşmaktadır:

- **İşaretleme (Staining) ve İnkübasyon:** Numuneye, hedef antijenlere (CD4, CD8, CD45 vb.) özgü florokrom bağlı monoklonal antikorlar eklenir. Spesifik antijen-antikor bağlanmasının gerçekleşmesi için numune, ışık almayan ortamda kontrollü bir inkübe işlemine tabi tutulur.
- **Lizis ve Yıkama:** Tam kan örneklerinde analitik hassasiyeti artırmak adına eritrositler lizis solüsyonları ile parçalanır; ardından bağlanmamış serbest antikorlar yıkama (santrifüj) basamakları ile ortamdan uzaklaştırılır.
- **Veri Edinimi (Acquisition):** Hazırlanan hücre süspansiyonu cihazdan geçirilerek her bir hücrenin lazerle etkileşimi sonucu yayılan sinyaller dijital veri formunda kaydedilir.
- **Kapılama (Gating):** Analiz aşamasında, elde edilen ham veriler üzerinden spesifik hücre popülasyonları grafiksel olarak izole edilir (BD Biosciences, t.y.).

İmmünofenotiplendirme, hem araştırma hem de klinik tanı alanında "altın standart" bir metodoloji olarak kabul edilmektedir. Başlıca uygulama alanları şunlardır:

- **Hematolojik Malignitelerin Tanısı:** Lösemi ve lenfoma alt tiplerinin kesin teşhisinde ve sınıflandırılmasında birincil yöntemdir.

- **Bağıışıklık Yetmezliğı İzlemi:** HIV/AIDS gibi immün yetmezlik olgularında CD4+ T lenfosit mutlak sayımı ile hastalık evrelemesi ve tedavi takibi gerçekleştirilir.
- **Minimal Kalıntı Hastalık (MRD) Analizi:** Tedavi sonrası remisyonda olan hastalarda, nüks riskini öngörmek amacıyla vücutta kalan çok düşük yoğunluktaki malign hücrelerin tespiti sağlanır.
- **Hücre Alt Popölasyon Analizi:** İmmün yanıt süreçlerinde regölator T hücreleri veya bellek B hücreleri gibi spesifik alt grupların oran ve aktivasyon durumlarının belirlenmesinde kritik rol oynar.

8.5.1 Lenfosit Alt Grupları ve Tanısal Markörler

Hücre soylarını belirlemek için "lineage markers" adı verilen ana markörler kullanılır. Bu markörlerin kombinasyonu, kompleks numunelerdeki hücrelerin kimliğini ortaya koyar.

Hücre Tipi	Pozitif Markörler	Fonksiyonel Önem
T Lenfosit (Genel)	CD3+	TCR sinyal kompleksi
T Helper (Yardımcı)	CD3+, CD4+	MHC-II ile etkileşim
Sitotoksik T	CD3+, CD8+	MHC-I ile etkileşim, hücre öldürme
B Lenfosit	CD19+, CD20+	Antikor üretimi, antijen sunumu
NK Hücreleri	CD56+, CD16+, CD3-	Doğal öldürücü aktivite
Myeloid Hücreler	CD13+, CD33+, CD14+	Monosit/Makrofaj/Granölosit soyu

Kök Hücreler	CD34+, CD45 dim	Hematopoetik progenitör hücreler
--------------	-----------------	----------------------------------

Tablo 1. Hematopoetik Hücre Popülasyonlarının Tanımlanmasında Kullanılan Temel İmmünofenotipik Belirteçler ve Fonksiyonel Özellikleri (Cossarizza et al., 2017)

8.6. Flow Sitometrinin Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyolojide Kullanım Alanları

Akış sitometrisi, 1960'larda geliştirilmesinden bu yana immünoloji, hücre biyolojisi, onkoloji, tıbbi mikrobiyoloji, çevre mikrobiyolojisi ve gıda endüstrisi gibi çeşitli bilimsel alanlarda önemli atılımlar sağlayan güçlü, kantitatif, tek hücreli bir teknolojidir.

8.6.1 Mikrobiyolojide Flow Sitometri

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, bakteri ya da mantarların izolasyonu, identifikasyonu, antimikrobiyal tedavi seçeneklerinin sunulması ve bu işlemlerin raporlanması diğer klinik laboratuvarlara kıyasla nispeten yavaş olmaktadır. Hücre kültürlerinde virüs izolasyonu ve spesifik antikorların tespiti, viral enfeksiyonların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler hassas ve spesifiktir, ancak yine de virüs izolasyonu için gereken süre oldukça uzundur. Bunların yanında kan serumundan yapılan serolojik testlerin akut enfeksiyonları belirlemede yetersiz olması, acil antimikrobiyal tedavi gerektiren enfeksiyonlarda tedaviye başlama süresinin kısalmasının sağlanması açısından hızlı ve doğru tanı testlerine ihtiyaç duyulur. Bu bağlamda kültür gerektirmeyen ve antijenlerin varlığını veya konakçının spesifik bağışıklık yanıtını tespit eden prosedürler, tanı süresinin kısalması için

gereklidir. Akış sitometrisi, klinik örneklerde tek veya çoklu mikroorganizmaların kolay, güvenilir ve hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlamaktadır. Mikroorganizmalar, kendine özgü hücresel parametrelerine veya spesifik antikorlara veya oligonükleotidlere bağlı olarak kullanılabilen belirli florokromlar aracılığıyla identifiye edilebilir. Ayrıca akış sitometrisi, antimikrobiyal duyarlılığı ve ilaç sitotoksitesini hızlı ve doğru bir şekilde değerlendirmek için nicel prosedürlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Álvarez-Barrientos., 2000)

8.6.1.1 Bakteriyel Analiz ve VBNC Tespiti

Bu teknoloji, özellikle standart agar plaklarında üreme yeteneğini kaybetmiş ancak enfeksiyon potansiyelini koruyan 'Canlı Ama Kültüre Edilemeyen' (VBNC - Viable But Non-Culturable) bakterilerin saptanmasında, su kalitesi kontrolü ve gıda güvenliği açısından hayati bir rol oynamaktadır. Literatürde, NADPH ve flavin kaynaklı otofloresans verileri üzerinden metabolik durum tayini (Thorell) ile DNA, protein ve hücre içi pH analizleri gibi çok parametrelili yaklaşımların etkinliği gösterilmiştir. Ayrıca, Mason ve ark. (Mason et al., 1998) tarafından tanımlanan çift florokromlu boyama protokolleri sayesinde Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin ayrımı yapılabilmekte; etidyum bromür gibi florokromlar aracılığıyla kanda mikrobiyal saptama gerçekleştirilebilmektedir. Bu metodolojik çeşitlilik, mikroorganizmaların hem yapısal hem de fonksiyonel heterojenliğinin tek hücre düzeyinde karakterize edilmesini sağlamaktadır (Álvarez-Barrientos., 2000)

8.6.1.2 Antimikrobiyal İlaç Duyarlılığının Ölçülmesi

Akış sitometrisi (FCM), yavaş üreyen mikroorganizmaların, özellikle de *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin ilaç duyarlılık testlerinde (DST) geleneksel kültür yöntemlerine kıyasla devrim niteliğinde bir hız ve doğruluk sunmaktadır. Bu metodolojinin temelini, sitoplazmik esteraz aktivitesiyle hidrolize edilerek floresan özellik kazanan Floresan Diasetat (FDA) boyaması oluşturmaktadır. FDA tabanlı FCM analizleri, mikobakteriyel proliferasyonun beklenmesine gerek kalmaksızın, ilaca maruz bırakılan hücrelerdeki metabolik değişimleri 6 ila 24 saat gibi kısa sürelerde saptayabilmektedir. Yapılan çalışmalar; izoniazid, rifampin, etambutol ve siprofloksasin gibi temel antitüberküloz ajanlara karşı duyarlılığın klinik izolatlarda bir günden kısa sürede belirlenebildiğini kanıtlamıştır. Ayrıca, biyogüvenlik risklerini minimize etmek amacıyla geliştirilen paraformaldehit fiksasyon protokolleri, sonuç alma süresini (72 saate kadar) bir miktar uzatsa da, laboratuvar güvenliği ile diagnostik hızı optimize eden efektif bir modifikasyon olarak literatürdeki yerini almıştır

8.6.1.3. Paraziter Analizler

Akış sitometrisinin parazitoloji alanındaki ilk uygulamaları, *Physarum polycephalum myxamoebae*'nin hücre döngüsü ile DNA içeriklerinin analizi ve *Leishmania* membran antijenlerine özgü monoklonal antikorların karakterizasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Son yıllarda ise, özellikle *Plasmodium* gibi hücre içi parazitlerin tespiti için eritrositlerin çekirdeksiz yapısından (DNA içermemelerinden) faydalanan özgün metodolojiler geliştirilmiştir. Bu yaklaşıma göre,

konakçı eritrosit içerisinde konumlanan parazitin DNA'sı, nükleik asitlere spesifik florokromlar ile işaretlenmekte; böylece enfekte hücreler akış sitometrisi aracılığıyla yüksek hassasiyetle ayırt edilebilmektedir. Bu teknik, parazitemi düzeyinin kantitatif takibinde ve hücre içi patojenlerin biyolojik süreçlerinin incelenmesinde efektif bir çözüm sunmaktadır (Turner., 1981)

8.6.1.4 Viral Analizler

Akış sitometrisi, virüs-hücre etkileşimlerinin moleküler düzeyde incelenmesinde ve viral patogenezin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir metodolojidir. Bu teknik, klinik örneklerde enfekte hücrelerin doğrudan tespit edilmesinin yanı sıra, in vitro hücre kültürlerinde viral inokülasyon sonrası viral yükün kantitatif olarak belirlenmesine olanak tanır. Viral antijenlerin tespiti ve nicelendirilmesi sürecinde FCM, spesifik monoklonal antikorlar aracılığıyla hücre yüzeyindeki veya—fiksasyon ve permeabilizasyon protokolleri uygulanmak kaydıyla—hücre içindeki viral proteinleri yüksek hızda analiz edebilmektedir. Ayrıca, PCR ve RT-PCR gibi amplifikasyon tekniklerinin akış sitometrisi süreçlerine entegrasyonu (Flow-FISH gibi yöntemlerle), enfekte hücrelerdeki spesifik viral nükleik asitlerin (DNA veya RNA) son derece hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlamıştır. Bu hibrid yaklaşımlar, özellikle nadir görülen viral sekansların saptanmasında ve viral genomların tek hücre düzeyinde karakterizasyonunda mevcut en duyarlı yöntemler arasında yer almaktadır (Laffin, J., Lehman, J. M. 1994)

8.6.2. Serolojik Tanı

Akış sitometrisi tabanlı mikrosfer immün testleri (bead-based assays), patojenlerin ve onlara özgü antikorların tanımlanmasında; monoklonal antikorların özgüllüğünü, akış sitometrisinin yüksek analiz hızı ve multiparametrik ölçüm kapasitesiyle birleştirmektedir. Bu metodoloji, mikroorganizmaların doğrudan tespitinden ziyade, özellikle hasta serumlarındaki spesifik antikor yanıtlarının (IgM, IgG vb.) belirlenmesinde üstün bir analitik performans sergilemektedir. Her biri farklı bir floresan yoğunluğuna veya spektral imza koduna sahip olan mikrosferlerin kullanılması, tek bir reaksiyon kuyucuğunda çok sayıda farklı antijene karşı gelişen antikorların eş zamanlı olarak (multiplexing) taranmasına olanak tanır. Bu durum, geleneksel ELISA yöntemlerine kıyasla hem örnek miktarından tasarruf sağlamakta hem de tanı sürecini standardize ederek klinik laboratuvar verimliliğini artırmaktadır (Álvarez-Barrientos., 2000.).

8.6.3. Hücre Canlılığı ve Apoptoz Analizleri

Apoptotik hücrelerin tanımlanması ve apoptoz ile nekroz arasında ayırım yapılması için, hücre morfolojisindeki değişiklikleri, hücre yüzeyinde fosfatidilserin varlığını, mitokondriyal transmembran potansiyelinin çökmesini, DNA parçalanmasını ve kaspaz aktivasyonunu değerlendirmek amacıyla akış sitometrisi teknikleri uygulanmaktadır. Apoptoz sırasında hücre içerisinde meydana gelen morfolojik ve kromatin yoğunlaşmadaki değişiklikler lazer ışın saçılımı ile analiz edilebilir. Apoptozun erken safhalarında meydana gelen mitokondriyal transmembran potansiyelinin dağılması, bu

organel içindeki elektrokimyasal potansiyele duyarlı florokromlar kullanılarak ölçülebilir. Analiz edilen hücrelerin canlı olup olmadığının belirlenmesi, veri kalitesini doğrudan etkiler. Apoptoz sürecinin erken evrelerinden bir diğeri olan kaspaz aktivasyonu iki farklı şekilde tespit edilebilir. Aktif kaspazı karakterize eden epitopun immunositokimyasal tespiti yoluyla doğrudan olarak tespit edilebilir. Dolaylı olarak ise kaspaz-3 parçalama ürünü olan poli(ADP-riboz) polimerazın p85 fragmanının immunositokimyasal tespiti yoluyla ölçülebilir. Plazma zarının dış yüzeyinde fosfatidilserin açığa çıkması bir diğer apoptoz belirtisidir. Bu durum floresan işaretli anneksin V (anneksin V-FITC) bağlanması ile tespit edilebilir. Apoptozun bir diğer belirteci de, Transglutaminazın (TGase) aktivasyonudur. Transglutaminaz proteinleri çapraz bağlayarak onların immunojenik özelliklerini azaltan bir enzimdir (Darzynkiewicz et al., 2001, Pozarowski et al., 2003).

8.6.4. Hücre Ayırma (FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Akış sitometrisinin en ileri fonksiyonlarından biri olan hücre ayırma (cell sorting), tanımlanan spesifik hücre popülasyonlarının heterojen örneklerden fiziksel olarak izole edilmesine olanak tanır. Manyetik boncuk temelli saflaştırma yöntemlerinden farklı olarak hücre ayırıcılar, akış sitometrisinin sunduğu multiparametrik ve karmaşık fenotipik verilere dayanarak her türlü alt popülasyonu yüksek hassasiyetle ayırabilme kapasitesine sahiptir. Bu metodoloji; kök hücreler veya antijene özgü T hücreleri gibi nadir popülasyonların fonksiyonel çalışmalar, hücre kültürü veya tek hücre RNA dizileme

(RNA-seq) analizleri için saflaştırılmasında kritik bir rol oynamaktadır (Ibrahim, S.F, van den Engh, G., 2007). Günümüzde yaygın olarak kullanılan elektrostatik hücre ayırıcılar, piezoelektrik tahrikli damlacık üretimi prensibiyle çalışmaktadır. Bu sistemde, 70-130 μm genişliğindeki nozullardan geçen hücreler lazer tarafından sorgulandıktan sonra, akış yüksek frekanslı titreşimlerle düzenli damlacıklara bölünür. Hedef hücrenin lazer kesişim noktasından ayrılma anı hassasiyetle hesaplanarak, ilgili damlacığa pozitif veya negatif bir elektriksel yük verilir. Yüklenen bu damlacıklar, yüksek voltajlı elektrostatik sapma plakaları arasından geçerken yüklerine göre yönlendirilerek toplama tüplerine veya plakalarına yüksek saflıkta aktarılır (Telford, W. G., 2023)

8.6.5 Hücre Döngüsü ve DNA İçeriği Analizi

Akış sitometrisinde hücre döngüsü analizi, hücresel DNA içeriğinin kantitatif olarak saptanması ve hücre popülasyonlarının replikasyon fazlarına (G0/G1, S ve G2/M) göre karakterize edilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu metodolojinin başarısı; Propidyum İyodür (PI), DAPI veya Hoechst gibi florokromların DNA'ya "stokiyometrik" olarak bağlanmasına, yani yayılan floresan sinyal şiddetinin hücredeki toplam nükleik asit miktarı ile tam bir doğru orantı sergilemesine bağlıdır (Rieger, A.M., 2022).

Elde edilen DNA histogramlarında, diploid ($2n$) DNA içeriğine sahip G0/G1 fazındaki hücreler ilk ana tepeyi (1X yoğunluk) oluştururken; DNA replikasyonunu tamamlamış tetraploid ($4n$) yapıdaki G2/M fazı hücreleri, bu sinyalin tam iki katı yoğunlukta (2X)

ikinci bir tepe meydana getirir. Sentez (S) fazındaki hücreler ise DNA replikasyonunun devam etmesi nedeniyle bu iki tepe arasında ara bir dağılım sergiler. Verilerin hassas analizi için Watson Pragmatic veya Dean-Jett-Fox gibi matematiksel algoritmalar kullanılarak örtüşen faz yüzdeleri hesaplanmaktadır (Darzynkiewicz et al., 2001).

Analiz kalitesini belirleyen en kritik parametrelerden biri, G1 tepesinin Varyasyon Katsayısı (CV) değeridir; ideal bir ölçümde bu değerin %2-5 aralığında olması beklenir. Ayrıca, iki diploid hücrenin lazerden eş zamanlı geçerek tek bir tetraploid hücre gibi algılanmasıyla oluşan "doublet" hatasını önlemek amacıyla, sinyal alanının (Area) genişliğine (Width) veya yüksekliğine (Height) oranlandığı "Doublet Discrimination" protokolünün uygulanması zorunludur. Hücre döngüsünün sıkı denetim mekanizmaları ve kontrol noktaları (G1/S ve G2/M), DNA hasarını tespit ederek hücreyi ya onarıma ya da apoptoza yönlendirir; akış sitometrisi ise bu dinamik süreçlerin tek hücre düzeyinde yüksek doğrulukla izlenmesine olanak tanır (Darzynkiewicz et al., 2001).

8.6.6. Hücre İçi Kalsiyum Tespiti

Memeli hücrelerinde en yaygın ikincil haberci sistemlerinden biri olan hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu, akış sitometrisi (FC) aracılığıyla kinetik düzeyde analiz edilebilmektedir. Bu amaçla kullanılan florometrik göstergeler arasında, rasyometrik ölçüm imkanı sunan Indo-1 en yaygın tercih edilen moleküldür. Indo-1'in temel avantajı, kalsiyum iyonlarına bağlandığında emisyon spektrumunun yaklaşık 400 nm'den 475 nm'ye kaymasıdır. Bu spektral kayma

(rasyometrik analiz), hücre boyutu, boya yükleme verimliliği veya cihaz kararlılığından kaynaklanabilecek varyasyonlardan bağımsız, yüksek hassasiyetli ölçümler yapılmasına imkan tanır. Ayrıca bu metodoloji, analiz sürecinde canlı ve ölü hücrelerin eş zamanlı olarak ayırt edilmesine olanak sağlayarak sadece fonksiyonel popülasyonlar üzerinden veri eldesini mümkün kılmaktadır (Álvarez-Barrientos., 2000).

8.6.7. RNA-Flow Sitometri (PrimeFlow)

Moleküler biyolojideki en yenilikçi uygulamalardan biri olan RNA-flow (PrimeFlow), hücre içi RNA ekspresyonunu tek hücre düzeyinde ve protein belirteçleri ile eş zamanlı olarak ölçer (Soh, K. T., Wallace, P. K., 2017)

8.6.8.Kanser tespiti

Güncel klinik pratikte akış sitometrisi; morfolojik verileri immünofenotipik analizlerle birleştirerek lösemi tanısı, sınıflandırılması ve takibinde altın standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve akut miyeloid lösemi (AML) ayırımında, hücresel antijenlere özgü geniş bir monoklonal antikor paneli kullanılmaktadır. Bu süreçte, 'pan-lökosit' belirteci olan CD45 antijeninin ekspresyon düzeyi ile yan saçılım (SSC) özelliklerinin birlikte değerlendirildiği CD45/SSC blast kapılaması (gating), malign hücre popülasyonlarını normal hematopoetik hücrelerden ayırt etmek için temel bir stratejidir. Ayrıca, hematopoetik progenitör hücrelerin bir göstergesi olan CD34 ve miyeloid seriye özgü alt tiplerin belirlenmesinde kritik rol oynayan HLA-DR gibi belirteçler,

löseminin kesin tanısında ve immünofenotipik alt sınıflara ayrılmasında yüksek tanısal değer taşımaktadır. İmmüno floresans teknolojisindeki bu gelişmeler, akış sitometrisini lösemi tespiti ve minimal kalıntı hastalık (MRD) izleminde vazgeçilmez bir tanısal araç konumuna taşımıştır (Álvarez-Barrientos., 2000).

8.6.9. Fonksiyonel Analizler ve Sitokin Ölçümü

Akış sitometrisi, hücresel yüzey proteinlerinin tanımlanmasının yanı sıra hücrelerin aktivasyon kinetiklerini ve sentezledikleri efektör molekülleri analiz edebilen kapsamlı bir fonksiyonel inceleme aracıdır. Özellikle spesifik immün yanıtların karakterizasyonunda kritik rol oynayan sitokin üretimi (IFN- γ , IL-2, TNF- α), uyarılmış hücre popülasyonlarında gerçekleştirilen hücre içi boyama (intracellular staining) protokolleri ile kantitatif olarak belirlenmektedir. Bu deneysel süreçte, sentezlenen sitokinlerin hücre dışına sekresyonunu önlemek ve sitoplazmik birikimini sağlamak amacıyla Brefeldin A veya Monensin gibi protein transport inhibitörlerinin kullanımı zorunludur. Bu metodoloji, tek hücre düzeyinde hangi spesifik hücre alt gruplarının hangi sitokin profilini sergilediğini (Th1, Th2, Th17 vb.) yüksek bir hassasiyetle ortaya koyarak immün fonksiyonların derinlemesine analiz edilmesine olanak sağlamaktadır (Álvarez-Barrientos., 2000, Alan et al., 2017).

8.7. Akış Sitometrisinde Kalite Kontrol (QC) ve Standardizasyon Protokolleri

Akış sitometrik analizlerin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu; optimizasyon, kalibrasyon ve standardizasyon basamaklarından oluşan

kapsamlı bir kalite kontrol (QC) prosedürüne dayanmaktadır. Bu süreçler, cihazın optik, elektronik ve akışkan sistemlerindeki performans dalgalanmalarını minimize ederek verilerin laboratuvarlar arası karşılaştırılabilirliğini sağlar (Bio-Rad Laboratories, t.y.).

8.7.1. Cihaz Optimizasyonu ve Kalibrasyonu

Cihaz optimizasyonu; lazer zamanlaması (laser delay), lazer gücü, optik filtre verimliliği, amplifikatör doğrusallığı ve elektronik gürültü gibi kritik parametrelerin denetlenmesini kapsar. Kalibrasyon aşamasında ise fotomultiplikatör tüplerinin (PMT) dinamik aralığı ve foton yakalama verimliliği, "Rainbow beads" veya "Quantum TM Simply Cellular" gibi sert boyalı floresan boncuklar kullanılarak izlenir. Bu süreç, sinyallerin senkronizasyonunu sağlayan alan ölçekleme faktörü (ASF) gibi elektronik ayarların doğrulanması için temel teşkil eder (Lee, J., Scheuermann, R., 2008)

8.7.2. Günlük İzleme ve Levey-Jennings Analizleri

Cihazın optik hizalaması ve dedektör hassasiyeti günlük olarak floresan boncuklar aracılığıyla takip edilmelidir. Elde edilen verilerdeki sapmalar Levey-Jennings grafikleri üzerinde izlenerek, sistemin kararlılığı denetlenir.

Varyasyon Katsayısı (CV): Boncuk sinyallerindeki düşük CV değerleri, optik sistemin hassas bir şekilde hizalandığının göstergesidir.

Westgard Kuralları: QC verilerinin standart sapma (SD) dışına çıkması durumunda uygulanan bu kurallar, cihazın teknik bakıma veya

yeniden kalibrasyona ihtiyacı olup olmadığını belirlemek için kullanılan istatistiksel bir algoritmadır (Gonneau et al., 2021)

8.7.3. Kantitatif Standardizasyon: MESF ve ABC Birimleri

Farklı cihaz konfigürasyonları arasındaki varyasyonları elimine etmek için göreceli birimler (MFI) yerine mutlak standart birimler tercih edilir.

MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome): Floresan yoğunluğunu çözünür florokrom molekül sayısına eşdeğer hale getirerek birimler arası standardizasyon sağlar.

ABC (Antibody Binding Capacity): Özellikle CD34 gibi düşük yoğunluklu antijenlerin miktar tayininde kritik öneme sahip olan bu birim, hücre başına bağlanan antikor sayısını ifade eder (Wang et al., 2002).

8.7.4. Uluslararası Raporlama Standartları: MIFlowCyt ve MIATA

Bilimsel şeffaflığı ve veri paylaşımını standardize etmek amacıyla geliştirilen MIFlowCyt (Minimum Information about a Flow Cytometry Experiment) kontrol listesi; deney amacı, numune özellikleri, cihaz konfigürasyonu ve kapılama (gating) stratejilerinin raporlanmasını zorunlu kılar. Benzer şekilde MIATA, T hücresi immün izleme çalışmalarına özgü raporlama gerekliliklerini belirleyerek literatürdeki veri kalitesini güvence altına alır (Lee, J., Scheuermann, R., 2008)

SONUÇ

Akış sitometrisi; hücre fiziği, optik mühendisliği ve immünofloresan teknolojisinin sinerjik bir birleşimi olarak modern biyotıp ve klinik tanıda vazgeçilmez bir konuma yükselmiştir. Tek hücre düzeyinde sunduğu multiparametrik analiz kapasitesi, sadece yüzey fenotiplerinin tanımlanmasıyla sınırlı kalmayıp; hücre döngüsü kinetiği, hücre içi sinyal iletimi ve metabolik fonksiyonların dinamik olarak izlenmesine olanak tanımaktadır. Teknolojik ilerlemelerle birlikte gelişen yeni nesil polimer florokromlar ve spektral ayrıştırma yöntemleri, analiz hassasiyetini en üst düzeye çıkarırken; standartlaştırılmış kalite kontrol protokolleri ve uluslararası raporlama kriterleri (MIFlowCyt), elde edilen verilerin güvenilirliğini ve evrenselliğini güvence altına almaktadır. Lösemi tanısından mikrobiyolojik ilaç duyarlılık testlerine, nadir hücre izolasyonundan karmaşık immün fonksiyon analizlerine kadar uzanan geniş uygulama yelpazesıyla akış sitometrisi, hem temel araştırmalarda hem de kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında geleceğin diagnostik standartlarını belirlemeye devam edecektir.

KAYNAKÇA

Krutzik, P. O., & Nolan, G. P. (2003). Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 55(2), 61-70.

Laffin, J., & Lehman, J. M. (1994). Detection of intracellular virus and viral products. *Methods in cell biology*, 41, 543-557.

Le Meur, N., Rossini, A., Gasparetto, M., Smith, C., Brinkman, R. R., & Gentleman, R. (2007). Data quality assessment of ungated flow cytometry data in high throughput experiments. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(6), 393-403.

Lee, J., & Scheuermann, R. (2008, February). Minimum Information about a Flow Cytometry Experiment MIFlowCyt 1.0.

Macey MG. (2010). Principles of flow cytometry. *Flow cytometry: principles and applications* In: Macey MG, ed. Totowa (NJ): Humana Press, 1–15.

Maciorowski, Z., Chattopadhyay, P. K., & Jain, P. (2017). Basic multicolor flow cytometry. *Current protocols in immunology*, 117(1), 5-4.

Mason, D. J., Shanmuganathan, S., Mortimer, F. C., & Gant, V. A. (1998). A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 64(7), 2681-2685.

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

Meehan, S., Walther, G., Moore, W., Orlova, D., Meehan, C., Parks, D., ... & Herzenberg, L. A. (2014). AutoGate: automating analysis of flow cytometry data. *Immunologic research*, 58(2), 218-223.

Monaco, G., Chen, H., Poidinger, M., Chen, J., de Magalhães, J. P., & Larbi, A. (2016). flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data. *Bioinformatics*, 32(16), 2473-2480.

Montante, S., & Brinkman, R. R. (2019). Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. *International journal of laboratory hematology*, 41, 56-62.

O'Neill, K., Aghaeepour, N., Špidlen, J., & Brinkman, R. (2013). Flow cytometry bioinformatics. *PLoS computational biology*, 9(12), e1003365.

Pozarowski, P., Grabarek, J., & Darzynkiewicz, Z. (2003). Flow cytometry of apoptosis. *Current protocols in cell biology*, 21(1), 18-8.)

Reggeti F, Bienzle D. (2011). Flow cytometry in veterinary oncology. *Vet Pathol*, 48, 223–35.

Reichard, A., & Asosingh, K. (2019). Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry. *Cytometry Part A*, 95(2), 219-226.

Rieger, A.M. (2022). Flow Cytometry and Cell Cycle Analysis: An Overview. In: Wang, Z. (eds) *Cell-Cycle Synchronization. Methods in Molecular Biology*, vol 2579. Humana, New York, NY.

Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B., Fischer, R. (2023). Flow cytometry: the next revolution. *Cells*, 12(14), 1875.

Roederer, M. (2002). Compensation in flow cytometry. *Current protocols in cytometry*, 22(1), 1-14.

Shapiro HM. (2004). Lasers for flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*, 49, 1.1.9–1.17.

Soh, K. T., & Wallace, P. K. (2017). RNA flow cytometry using the branched DNA technique. In *Flow Cytometry Protocols* (pp. 49-77). New York, NY: Springer New York.

Spidlen, J., Leif, R. C., Moore, W., Roederer, M., & Brinkman, R. R. (2008). Gating-ML: XML-based gating descriptions in flow cytometry. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(12), 1151-1157.

Telford, W. G. (2023). Flow cytometry and cell sorting. *Frontiers in Medicine*, 10, 1287884.

Turner, H. M., Mohberg, J., & Goodman, E. M. (1981). A flow cytometry study of the cell cycle and of ploidy levels in *Physarum polycephalum myxamoebae* and plasmodia. *Microbios*, 32(127), 29-36.

Tzanoudaki, M., & Konsta, E. (2023). Basic Principles of Flow Cytometry. In *Intraoperative Flow Cytometry* (pp. 9-31). Cham: Springer International Publishing.

Wang, L., Gaigalas, A. K., Abbasi, F., Marti, G. E., Vogt, R. F., & Schwartz, A. (2002). Quantitating fluorescence intensity from fluorophores: practical use of MESF values. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, 107(4), 339.

Wilkerson MJ. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42, 53–71

BÖLÜM 9:

HÜCRE KÜLTÜRÜ VE FONKSİYONEL MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER

Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzurum, Türkiye

E-mail: ozgur.celebi@atauni.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Sümeyye BAŞER

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Erzincan, Türkiye

E-mail: sumeyye.baser@erzincan.edu.tr

GİRİŞ

Mikrobiyoloji ve hücresel biyoloji alanlarında yaşanan hızlı bilimsel ve teknolojik gelişmeler, mikroorganizmaların yalnızca varlıklarının değil, aynı zamanda konak hücrelerle olan etkileşimlerinin, patojenite mekanizmalarının ve biyolojik fonksiyonlarının çok yönlü olarak incelenmesini gerekli kılmıştır. Bu bağlamda hücre kültürü teknikleri ile fonksiyonel mikrobiyolojik analizler, modern deneysel araştırmaların vazgeçilmez araçları arasında yer almaktadır. İn vitro hücre kültürü sistemleri, mikroorganizmaların

konak hücreler üzerindeki etkilerinin kontrollü koşullar altında değerlendirilmesine olanak tanırken; fonksiyonel analizler, bu etkileşimlerin moleküler, hücresel ve fizyolojik sonuçlarını ortaya koymayı amaçlamaktadır. Hücre kültürü, primer hücreler veya sürekli hücre hatları kullanılarak hücrelerin laboratuvar ortamında kontrollü şekilde çoğaltılması ve sürdürülmesini ifade eder. Bu teknikler, enfeksiyon biyolojisi, ilaç geliştirme, toksisite testleri, aşı çalışmaları ve konak-patojen etkileşimlerinin aydınlatılması gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle bakteriyel, viral ve fungal patojenlerin hücre içi invazyon mekanizmaları, sitotoksik etkileri, immün yanıt üzerindeki düzenleyici rolleri ve hücresel sinyal yolları üzerindeki etkileri, hücre kültürü modelleri sayesinde detaylı biçimde incelenebilmektedir. Fonksiyonel mikrobiyolojik analizler ise mikroorganizmaların canlı sistemler üzerindeki biyolojik aktivitelerini değerlendirmeye yönelik deneysel yaklaşımları kapsamaktadır. Bu analizler; adezyon ve invazyon testleri, biyofilm oluşum analizleri, sitotoksisite ve apoptotik yanıt ölçümleri, hücresel canlılık testleri, oksidatif stres parametreleri ve inflamatuvar mediyatörlerin değerlendirilmesi gibi geniş bir yelpazeye sahiptir. Hücre kültürü temelli fonksiyonel testler, klasik mikrobiyolojik yöntemlerin ötesine geçerek mikroorganizmaların yalnızca tanımlanmasını değil, aynı zamanda patofizyolojik etkilerinin mekanistik düzeyde anlaşılmasını sağlamaktadır. Günümüzde antibiyotik direnci, yeni ve yeniden ortaya çıkan enfeksiyonlar, probiyotik ve postbiyotik uygulamalar ile mikrobiyota-konak ilişkileri gibi konular, hücre kültürü ve fonksiyonel analizlerin önemini daha da artırmıştır. Özellikle çok ilaca dirençli

patojenlerin hücresele düzeyde oluşturduğu hasarın belirlenmesi ve alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesi sürecinde bu yöntemler kritik rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, probiyotik mikroorganizmaların epitel hücreler üzerindeki koruyucu etkilerinin, bağışıklık sistemi modülasyonunun ve bariyer fonksiyonlarının değerlendirilmesi de hücre kültürü tabanlı fonksiyonel analizler aracılığıyla mümkün olmaktadır.

Bu kitap bölümünde, hücre kültürü tekniklerinin temel prensipleri ile fonksiyonel mikrobiyolojik analizlerin teorik altyapısı ve uygulama alanları bütüncül bir yaklaşımla ele alınacaktır. Ayrıca, deneysel tasarım, yöntem seçimi, sonuçların yorumlanması ve karşılaşılabilecek teknik sınırlılıklar üzerinde durularak, araştırmacılara ve öğrencilere yol gösterici bir kaynak sunulması amaçlanmaktadır. Böylece, hücre kültürü ve fonksiyonel mikrobiyolojik analizlerin, modern mikrobiyoloji ve biyomedikal araştırmalardaki yeri ve önemi kapsamlı bir şekilde ortaya konacaktır.

9.1. Hücre Kültürü Temelleri ve Laboratuvar Yönetimi

9.1.1. Hücre Kültüründe Sterilite Prensipleri ve Aseptik Çalışma Yaklaşımı

Hücre kültürü teknikleri, canlı hücrelerin fizyolojik bütünlüğünü ve fonksiyonel özelliklerini koruyarak laboratuvar koşullarında çoğaltılmasına olanak sağlayan ileri deneysel yaklaşımlardır (Mani, 2023a). Ancak bu tekniklerin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği, büyük ölçüde sterilite prensiplerine sıkı biçimde

uyulmasına bağılıdır. Hücre kültürü sistemleri, mikroorganizmalar için son derece elverişli bir büyüme ortamı sunduğundan, minimal düzeydeki kontaminasyon dahi hücre proliferasyonunun bozulmasına, metabolik profillerin değişmesine ve deneysel sonuçların geçersiz hale gelmesine neden olabilmektedir (Philippeos, Hughes, Dhawan, & Mitry, 2012). Aseptik teknik, hücre kültürü çalışmalarının temelini oluşturur ve hücrelerin çevresel mikroorganizmalardan korunmasını amaçlayan tüm uygulamaları kapsar. Bu yaklaşım; kişisel hijyen, laboratuvar alanının düzenlenmesi, ekipmanların sterilizasyonu, reaktiflerin doğru şekilde kullanımı ve çalışma akışının planlanması gibi çok sayıda bileşeni içerir (Afify & Seno, 2023). Özellikle bakteriler, mayalar, küf mantarları ve mikoplazmalar, hücre kültürlerinde en sık karşılaşılan kontaminantlardır. Mikoplazmalar, hücre duvarından yoksun olmaları ve düşük boyutları nedeniyle rutin mikroskopik incelemelerde fark edilmeden kültürlerde uzun süre varlığını sürdürebilir ve hücresel gen ekspresyonunu, protein sentezini ve sinyal yollarını ciddi biçimde etkileyebilir. Sterilite prensiplerinin uygulanmasında temel kurallardan biri, çalışma alanına yalnızca gerekli materyallerin alınması ve gereksiz hareketlerden kaçınılmasıdır (Weiskirchen, Schröder, Buhl, & Weiskirchen, 2023). Pipetleme işlemleri sırasında aerosol oluşumunun minimize edilmesi, kapakların mümkün olan en kısa sürede açık tutulması ve kullanılan sarf malzemelerinin tek kullanımlık olması esastır. Ayrıca, hücre kültürü yapılan laboratuvarlarda yiyecek ve içecek bulundurulması kesinlikle yasaklanmalı, laboratuvar önlüğü ve eldiven kullanımı standart hale getirilmelidir (Jain, Gulati, Mittal, & Mani, 2023).

9.1.2. Biyogüvenlik Kabini (BSL): Yapısı, Çalışma Prensipleri ve Doğru Kullanımı

Biyogüvenlik kabinleri (Biological Safety Cabinet, BSL), hücre kültürü çalışmalarında hem operatörü hem de kültür materyalini korumayı amaçlayan birincil mühendislik kontrol sistemleridir. Günümüzde hücre kültürü uygulamalarında en yaygın kullanılan kabinler Sınıf II BSL'lerdir. Bu kabinler, HEPA (High Efficiency Particulate Air) filtrelerden geçirilen hava akımı sayesinde partikül, bakteri ve fungal sporların çalışma alanına girişini engeller (Pasrija & Kumari, 2025).

Sınıf II BSL'lerde hava, üstten aşağıya doğru laminar akım şeklinde hareket eder ve çalışma yüzeyindeki partiküllerin kontrollü biçimde uzaklaştırılmasını sağlar. Aynı zamanda, kabinin ön açıklığından içeri giren hava da filtrelenerek hem kullanıcının hem de ortamın korunması hedeflenir. Bu özellik, Sınıf II BSL'leri hücre kültürü, viral çalışmalar ve rekombinant DNA uygulamaları için uygun hale getirir (W. Gao et al., 2024).

BSL kullanımı sırasında dikkat edilmesi gereken temel kurallar şunlardır:

- Kabin çalışmaya başlamadan önce en az 10–15 dakika çalışır durumda bırakılmalıdır.
- Çalışma yüzeyi deney öncesi ve sonrası %70 etanol veya uygun bir dezenfektan ile silinmelidir.

- Hava akışını bozacak büyük ekipmanlar veya gereksiz materyaller kabin içine yerleştirilmemelidir.
- Çalışma alanı “temizden kirliye” doğru organize edilmeli, kontamine materyaller kabinin arka veya yan bölgelerinde tutulmalıdır (Obayori & Salam, 2023).

BSL’lerin düzenli bakım ve validasyonu, laboratuvar yönetiminin ayrılmaz bir parçasıdır. HEPA filtrelerin periyodik olarak test edilmesi, hava akış hızlarının kontrolü ve UV lambalarının etkinliğinin değerlendirilmesi, kabinin biyogüvenlik standartlarına uygunluğunu garanti altına alır (Pasrija & Kumari, 2025).

9.1.3. Hücre Kültürü Besiyerleri: Temel Bileşenler ve Seçim Kriterleri

Hücre kültürü besiyerleri, hücrelerin in vitro ortamda yaşamlarını sürdürebilmeleri ve fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gerekli olan tüm besin öğelerini içerir (Price, 2017). Bu ortamlar; inorganik tuzlar, amino asitler, vitaminler, karbonhidratlar, yağ asitleri ve pH düzenleyici tampon sistemlerden oluşur. Kullanılan besiyerinin bileşimi, hücre tipine ve deneysel amaca göre belirlenmelidir. DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium), yüksek amino asit ve vitamin içeriği ile birçok adherent hücre hattı için tercih edilen bir ortamdır (Mani, 2023b). Düşük ve yüksek glukozlu formları, hücrelerin metabolik ihtiyaçlarına göre esneklik sağlar (Lavrentieva, 2018). RPMI-1640 ise özellikle lenfositler, monositler ve bazı tümör hücre hatları için optimize edilmiştir. Bu ortam, fosfat

tampon sistemi sayesinde CO₂ inkübatörlerinde stabil pH sağlar (Whitford, Lundgren, & Fairbank, 2018). Besiyerlerine sıklıkla fetal bovin serum (FBS) eklenir. FBS; büyüme faktörleri, hormonlar, bağlanma proteinleri ve iz elementler açısından zengindir ve hücre adezyonu ile proliferasyonunu destekler (Karnieli et al., 2017). Genellikle %5–10 oranında kullanılır; ancak serum konsantrasyonu hücre hattına özgü olarak optimize edilmelidir. Serumun lotlar arası değişkenliği deneysel sonuçları etkileyebileceğinden, aynı lot serumun uzun süreli çalışmalarda kullanılması önerilir. Antibiyotik ve antifungal ajanlar (ör. penisilin, streptomisin, amfoterisin B), kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla sıklıkla besiyerlerine eklenir. Bununla birlikte, antibiyotiklerin sürekli kullanımı gizli kontaminasyonları maskeleyebileceği için, iyi aseptik uygulamaların yerine geçmemelidir (Geraghty et al., 2014; D. Y. Lee et al., 2022).

9.1.4. Hücre Dondurma (Kriyoprezervasyon): Temel İlkeler ve Uygulama

Kriyoprezervasyon, hücrelerin uzun süreli saklanması ve biyolojik özelliklerinin korunmasını sağlayan temel bir tekniktir. Bu yöntem, hücre bankalarının oluşturulması ve deneysel sürekliliğin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir (Wang, Wang, & Zhao, 2023). Hücre dondurma sürecinde temel amaç, hücre içi buz kristali oluşumunu minimize ederek membran bütünlüğünü korumaktır. Bu amaçla en yaygın kullanılan kriyoprotektan dimetil sülfoksit (DMSO)'dur (Wang et al., 2023). DMSO, hücre zarından kolaylıkla geçerek suyun kristalleşmesini engeller. Tipik bir dondurma ortamı,

%90 serum ve %10 DMSO içerecek şekilde hazırlanır (Arav, 2022). Hücreler logaritmik büyüme fazında toplanmalı, santrifüjle pelletlenmeli ve kriyoprotektif ortamda süspanse edilmelidir (Weng, 2023). Dondurma işlemi kontrollü hızda gerçekleştirilmelidir. İdeal soğutma hızı yaklaşık $-1\text{ }^{\circ}\text{C/dakika}$ dır. Bu hız, programlanabilir dondurucular veya izopropanol içeren kontrollü dondurma kapları kullanılarak sağlanabilir. İlk aşamada hücreler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilir, ardından uzun süreli depolama için sıvı azot tanklarına aktarılır (Aarattuthodi et al., 2025; Agarwal & Singh, 2023).

9.1.5. Hücre Çözme Protokolleri ve Canlılık Optimizasyonu

Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi, kriyoprezervasyon kadar hassas bir işlemdir. Hücreler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra hızla $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ su banyosunda çözülmelidir. Bu hızlı çözme, buz kristallerinin yeniden oluşmasını engeller. Çözme sonrası DMSO'nun hücreler üzerindeki toksik etkilerini azaltmak için hücre süspansiyonu uygun kültür ortamı ile seyreltilmeli ve düşük hızlı santrifüj ile yıkanmalıdır. Canlılık oranının yüksek tutulabilmesi için çözme sonrası hücreler uygun yoğunlukta ekilmeli, inkübatör koşulları ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, %5 CO_2 , %95 nem) dikkatle sağlanmalıdır. İlk 24 saat boyunca ortam değişimi yapılmaması, hücrelerin yüzeye tutunmasını ve stres yanıtının azalmasını destekler (Larsson & Parris, 2023; Petiti, Revel, & Divieto, 2024).

Sonuç olarak hücre kültürü temelleri ve laboratuvar yönetimi, yalnızca teknik bilgi değil, aynı zamanda disiplinli bir çalışma kültürü gerektirir.

Sterilite prensiplerine uyum, uygun besiyeri seçimi ve doğru kriyoprezervasyon uygulamaları; güvenilir, tekrarlanabilir ve bilimsel açıdan geçerli sonuçların elde edilmesini sağlar. Bu nedenle hücre kültürü, mikrobiyoloji ve biyomedikal araştırmaların merkezinde yer alan stratejik bir yöntem olarak değerlendirilmelidir.

9.2. Hücre Hatları ve Karakterizasyon

9.2.1. Hücre Hatlarının Tanımlanması ve Sınıflandırılması

Hücre kültürü, bilimsel araştırmanın temelini oluşturan in vitro modellerin geliştirilmesini sağlar. Bu modellerin güvenilirliği, hücre kaynağının niteliğine ve karakterizasyonunun doğruluğuna bağlıdır (Isidan et al., 2022). Hücre hatları genel olarak iki ana kategoriye ayrılır: primer hücre kültürleri ve ölümsüzleştirilmiş (immortalized) hücre hatları (Onódi et al., 2022). Primer hücre kültürleri, canlı organizmadan izole edilen doku veya hücre süspansiyonlarının doğrudan kültürüdür. Bu hücreler, dokuya özgü fenotipik ve genetik özellikleri korur; bu nedenle in vivo koşullara yakın fizyolojik cevap verirler. Ancak primer hücrelerin bölünme kapasitesi sınırlıdır ve kültürde belirli bir pasajdan sonra senesans (irreversible hücre döngüsü durması) gösterirler. Bu sınırlama, araştırmacılar için hem avantaj (gerçek doku davranışlarına daha yakın modeller) hem de dezavantaj (sınırlı proliferasyon) oluşturur (Zheng, Liu, Yang, & Milman Krentsis, 2024). Öte yandan, ölümsüzleştirilmiş hücre hatları, genetik modifikasyon, viral onkogen ekspresyonu veya spontan değişim yoluyla proliferasyon yeteneğini sürekli hale getirmiş hücrelerdir (Ripandelli, van Oijen, & Robinson, 2024). Bu hücreler laboratuvar

koşullarında uzun süre korunabilir ve çok sayıda pasajdan sonra bile proliferatif kapasitesini büyük ölçüde korur. Bu özellik, uzun süreli deneyler ve yüksek tekrarlanabilirlik gerektiren çalışmalar için avantaj sağlar (Goswami, Yashwanth, Trudeau, & Lakra, 2022). Bununla birlikte, immortalize hücre hatları, uzun süreli pasaj süreçlerinde genetik ve fenotipik farklılıklar geliştirebilir; bu nedenle orijinal doku fenotipini temsil etme kapasiteleri primer hücrelere göre sınırlı olabilir (Wells et al., 2024). Ölümsüzleştirme süreci, çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Bu yöntemler arasında viral onkogenlerin (ör. SV40 T-antijeni) ekspresyonu, telomeraz (hTERT) aktivasyonunun artırılması ve genetik değişikliklerle hücre döngüsünün kontrol noktalarının manipülasyonu yer alır (Moya et al., 2023). Söz konusu manipülasyonlar, hücrenin proliferasyon kapasitesini uzatırken aynı zamanda hücre kimliğinin korunup korunmadığının da doğrulanmasını gerekli kılar (Sadanandan et al., 2024).

9.2.2. Primer Kültürlerin Özellikleri ve Uygulama Alanları

Primer hücre kültürleri, biyomedikal araştırmalarda gerçek doku davranışlarını modellemek için vazgeçilmez araçlardır. Bu hücreler, genellikle doku örneklerinden mekanik veya enzimatik ayırma ile izole edilir ve uygun besiyerinde çoğaltılır. Primer hücrelerin en önemli avantajı, doku özgün fenotipi ve fonksiyonel profilini büyük ölçüde korumalarıdır (Zheng et al., 2024). Bu nedenle ilaç toksisitesi, doku rejenerasyonu ve doku spesifik fonksiyonların incelenmesi gibi uygulamalarda tercih edilirler. Ancak bu hücrelerin kültür ömrü sınırlıdır; “Hayflick limiti” olarak tanımlanan olguda

hücreler çoğaldıkça telomerler kısalır ve sonunda senesans evresine girerler. Bu fenomen, primer hücrelerde doğal yaşlanma süreçlerinin modellenmesine olanak sağlar, ancak uzun süreli deneyler için zorluk teşkil eder. Başarılı primer kültür oluşturma, hücre izole edilen dokunun kalitesi, ayırıştırma prosedürleri ve kültür koşullarının optimize edilmesine dayanır (Antonov et al., 1986; Sugihara, Yonemitsu, Miyabara, & Yun, 1986).

9.2.3. Immortalized Hücre Hatlarının Avantajları ve Sınırlılıkları

Immortalized hücre hatları, bilimsel çalışmaların standardizasyonu ve tekrarlanabilirliğini artıran güçlü araçlardır. Bu hücre hatlarının avantajları arasında sürekli proliferasyon, genetik stabilite analizi kolaylığı ve ticari olarak geniş çapta temin edilebilme özellikleri yer alır. Özellikle farmakolojik testler, moleküler mekanizma çalışmaları ve yüksek verimli ekranlamalar için sıklıkla immortalized hatlar tercih edilir (Voloshin, Tyurin-Kuzmin, Karagyaur, Akopyan, & Kulebyakin, 2023). Bununla birlikte, bu hücre hatlarının fenotipik ve genetik profilleri, dokuya özgü özelliklerin kaybına neden olabilir ve elde edilen sonuçların klinik translatörlüğünü sınırlayabilir. Uzun süreli pasaj sonrası genetik sapmaların ortaya çıkması, bazı hatlarda anormal proliferasyon veya transformasyon özelliklerinin görülmesi gibi sorunlar literatürde rapor edilmiştir. Bu nedenle hücre hatlarının kullanıldığı her araştırmada, kimlik doğrulama ve karakterizasyon kontrolleri kritik önem taşır (Soice & Johnston, 2021; Voloshin et al., 2023).

9.2.4. Hücre Sayımı: Hemositometre ile Nicel Analiz

Hücre sayımı, kültürlerin büyüme dinamiklerini değerlendirmek, uygun seeding yoğunluğunu belirlemek ve deneysel koşulları standartlaştırmak için kritik bir adımdır (Jindal & Singh, 2023). En yaygın kullanılan yöntemlerden biri hemositometre ile manuel hücre sayımıdır. Hemositometre, belirlenmiş bir hacimdeki hücrelerin mikroskop altında sayılmasına olanak verir ve her bölmedeki hücre sayısından toplam hücre yoğunluğu hesaplanır (Y.-W. Chen & Chiang, 2024). Hücreler genellikle trypan blue gibi canlılık boyaları ile boyanarak canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesi sağlanır. Canlı hücreler boyayı dışarıda bırakırken membranı hasarlı ölü hücreler boyayı alır. Bu ayırım, toplam hücre sayımının yanı sıra kültürdeki canlı hücre oranının değerlendirilmesine de olanak tanır. Dikkatli pipetleme, eşit örnekleme ve belirlenmiş sayım kurallarına uyum, sayımın doğruluğunu artırır (Lapsina, Riond, Hofmann-Lehmann, & Stirn, 2024).

9.2.5. Pasaj İşlemleri ve Tripsinizasyon

Karmaşık hücre kültürü deneylerinde hücrelerin pasajlanması (subculturing), kültürlerde sürekli sağlıklı proliferasyonun sürdürülmesi için zorunludur. Pasajlama, hücre yoğunluğu belirli bir eşik değerin üzerine çıktığında veya konfluens (yüzey kaplanma) seviyesine ulaştığında gerçekleştirilir (Yu, Zhang, & Wu, 2024). Sıklıkla kullanılan bir yöntem, enzimatik detachment (ayırma) olup en yaygın uygulama tripsinizasyondur. Tripsin, hücreler arasındaki

adezyon proteinlerini çıkaran proteolitik bir enzimdir ve hücrelerin kültür yüzeyinden ayrılmasını sağlar (Tsukamoto, Kawasaki, Vemuri, Umezawa, & Akutsu, 2024). Tripsinizasyon işleminden önce ortamdan serum içeriği uzaklaştırılır, tripsin uygulandıktan sonra hücrelerin serbest kalması beklenir ve ardından inhibitörler (ör. serum) ile enzim etkisi durdurulur. Bu adımın dikkatli izlenmesi, aşırı enzimatik stresten kaçınmayı ve hücre viabilitesinin korunmasını sağlar (R.-H. Chen, Zhu, Zhang, Wang, & Li, 2020; Vrtačník, Kos, Bustin, Marc, & Ostanek, 2014).

9.2.6. Mikoplazma Kontaminasyonu: Kaynaklar ve Önemi

Mikoplazma kontaminasyonu, hücre kültürü laboratuvarlarında yaygın görülen ve deney sonuçlarını ciddi biçimde bozabilen bir problemdir (Drexler & Uphoff, 2002). Mikoplazmalar, zarlı olmayan, çok küçük prokaryotik organizmalardır ve rutin mikroskopik inceleme ile kolayca fark edilmezler. Hücre kültürlerindeki mikoplazma kontaminasyonu, hücre proliferasyonunu, DNA sentezini, protein ekspresyon profilini ve hücre metabolizmasını etkileyerek yanıltıcı sonuçlara neden olabilir (Nikfarjam & Farzaneh, 2012). Hücre kültürlerindeki mikoplazma türleri arasında *Mycoplasma orale*, *M. hyorhina*, *M. arginini*, *M. fermentans* ve *Acholeplasma laidlawii* gibi türler sık rastlanır. Bu türlerin varlığı genellikle kültürlerde direkt gözlemlenemez ancak mikrobiyolojik ve moleküler tekniklerle tespit edilebilir (Leonovich, 2026; Uphoff & Drexler, 2005).

9.2.7. Moleküler Yöntemlerle Mikoplazma Tespiti (PCR ve qPCR)

Mikoplazma kontaminasyonunun tanısında PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve gerçek zamanlı qPCR yöntemleri altın standart olarak kabul edilir (Satta et al., 2017). Bu moleküler teknikler, mikoplazma türlerine özgü 16S rRNA gen bölgesi gibi korunmuş genetik hedeflere yönelik primerlerle çalışır ve yüksek özgüllük ve duyarlılık sağlar. Konvansiyonel PCR’da hedef DNA amplifikasyonu ile kontaminasyonun varlığı belirlenirken, qPCR’da amplifikasyon sırasında kullanılan floresan prob sinyalleri sayesinde hem varlık hem de miktar bilgisi elde edilebilir (Carrillo-Ávila et al., 2023). Bir çalışmada, qPCR ve PCR yöntemlerinin mikoplazmayı tespit etmede diğer biyokimyasal yöntemlere göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir (Dos Santos, Lespinasse, Bonnet, & Basmaciogullari, 2025; Fernández-Huerta et al., 2019). Mikoplazma kontaminasyonu tespitinde moleküler tekniklerin yanı sıra biyokimyasal ve immunolojik yöntemler de kullanılabilir. Bunlar arasında mikoplazmanın spesifik metabolik ürünlerinin tespiti veya antikor bazlı tespitler yer alır (Andrés-Lasheras et al., 2020). Ancak bu yöntemler genellikle moleküler yaklaşımlarla karşılaştırıldığında daha düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (R. Yin et al., 2025).

9.2.8. Karakterizasyonun Önemi ve Hücre Hattı Doğrulama

Hücre hatlarının kimlik doğrulaması, özellikle immortalized hatların kullanıldığı çalışmalarda kritik öneme sahiptir. Yanlış tanımlanmış veya çapraz kontaminasyon geçirmiş hücre hatları,

bilimsel verilerin geçerliliğini ciddi biçimde zayıflatır. Bu nedenle hücre hatlarının genetik profillemesi, STR (Short Tandem Repeat) analizleri gibi yöntemlerle düzenli doğrulaması literatürde önerilmektedir (Langdon, 2004b; Reid, 2011).

Sonuç olarak hücre hatları ve karakterizasyon, modern biyomedikal araştırmaların temel taşlarından biridir. Primer kültürler ve immortalized hücre hatları arasındaki seçim, araştırmanın amacına ve gereksinimlerine göre yapılmalıdır. Hücre sayımı, pasaj prosedürleri ve mikoplazma kontaminasyonu gibi temel laboratuvar teknikleri, doğru bir araştırma altyapısı oluşturur. Moleküler tespit yöntemlerinin kullanımı ve hücre kimliğinin düzenli doğrulanması, kaliteli ve tekrarlanabilir bilimsel sonuçlar elde edilmesine katkı sağlar.

9.3. Hücre Kültüründe Mikrobiyolojik Analiz Stratejileri

Hücre kültürü tabanlı mikrobiyolojik analizler, bakterilerin konakçı hücrelerle etkileşimlerini moleküler ve hücresel düzeyde çözümlemek için vazgeçilmez yöntemlerdir (Lagier et al., 2015). Patojenlerin ilk olarak hücre yüzeyine yapışması (adezyon), ardından konak hücre içine girişleri (invazyon) ve nihayetinde konak hücre içinde sağkalım ve çoğalma süreçleri, enfeksiyon biyolojisinin temel adımlarını oluşturur. Bu süreçlerin doğru ölçümü hem patogenez mekanizmalarının anlaşılmasına hem de yeni anti-enfeksiyon stratejilerin geliştirilmesine olanak tanır (Langdon, 2004a; Lloréns-Rico, Simcock, Huys, & Raes, 2022). Bu bölümde, bu üç temel

stratejinin teorik temelleri, deneysel uygulamaları, avantajları ve sınırlılıkları ele alınacaktır.

9.3.1. Bakteriye Adezyon ve İnvasion Testleri: Konakçı Hücreye Bağlanma ve Giriş Mekanizmalarının Ölçülmesi

Adezyonun Biyolojik Önemi

Bakteriyel adezyon, patojenin konakçı yüzey reseptörlerine spesifik yapışma organelleri (fimbrialar, adhesinler) veya moleküler etkileşimler aracılığıyla bağlanmasını ifade eder. Adezyon, invazyondan önce gelen zorunlu bir adımdır; çünkü bakterinin konakçı hücre yüzeyine stabil şekilde tutunmaması durumunda endositoz veya aktif giriş gerçekleştirmesi mümkün olmaz. Adezyon süreçleri, bakteri-konakçı etkileşiminin başlangıcını ve immün savunma sisteminin modülasyonunu tetikleyen ilk sinyalleri oluşturur. Bu bağlamda, adezyon analizleri patogeneze çalışmalarının temelini oluşturur (Bastounis, Radhakrishnan, Prinz, & Theriot, 2022; Kemper & Hensel, 2023).

Standart Adezyon Test Protokolleri

Standart adezyon testlerinde, insan hücre hattı (örneğin epitel hücreleri) kültüre edilir ve belirli bir MOI (multiplicity of infection) kullanılarak bakteri ile enfekte edilir (An & Friedman, 1997). Kültür ortamında enfeksiyon süresi sonunda, hücreler birkaç kez yıkanarak temas etmemiş bakteriler uzaklaştırılır; kalan bakteriler ya floresan mikroskobu ile görüntülenir ya da hücre yüzeyine bağlı bakteri sayısı kantitatif olarak belirlenir. Alternatif yaklaşımlar arasında akış

sitometrisi bazlı adezyon analizleri de bulunmaktadır. Bu yöntemlerde bakteri floresan ile işaretlenir ve konakçı hücrelere bağlanan bakteri yüzdesi hızlı ve niceliksel olarak ölçülebilir. Böylece invazyon öncesi adezyon fenomeni daha hassas biçimde değerlendirilir (Vesterlund, Palta, Karp, & Ouwehand, 2005).

İnvazyon Testlerinin Yapısı

Adezyona kıyasla invazyon testleri, bakterilerin konak hücre içine girişini ölçmek için geliştirilmiştir. Bu testlerde bakteri-hücre etkileşimi, hücre yüzeyine bağlanan bakterilerin hücre içine alınması ile tanımlanır. Bu adım, bakteri ve hücre arasındaki moleküler etkileşimleri ortaya koyar ve; örneğin *Shigella*, *Salmonella* veya *Listeria* gibi patojenlerde belirli invazyon faktörlerinin rolünü değerlendirmek için kritik öneme sahiptir (Kramer et al., 2013; Mareel, 1983; Renault et al., 2022). Konvansiyonel invazyon analizleri laboratuvar mikroskobu ile sınırlı kalmasına rağmen, konfokal mikroskopi ve yüksek içerikli görüntüleme analizleri bakterilerin tek hücre düzeyinde adezyon-invazyon kinetiklerini ortaya koyar. Bu yaklaşımlar, antikor tedavilerinin veya genetik modifikasyonların bakteriyel bağlanma ve giriş üzerindeki etkilerini değerlendirmede güçlüdür (Kramer et al., 2013).

9.3.2. Gentamisin Koruma Testi (Gentamicin Protection Assay)

Gentamisin koruma testi, ekstrasellüler bakterilerin öldürülmesi yoluyla intrasellüler bakterilerin kantifikasyonuna olanak sağlayan

klasik bir hücre kültürü tabanlı protokoldür. Bu yöntem, aminoglikozid sınıfı antibiyotik gentamisin'in eukaryotik hücre membranı içindeki penetrasyonunun sınırlı olması temelinden yola çıkar; böylece hücre içine invaze olmuş bakteriler, antibiyotiğe maruz kalmadan hayatta kalır ve sayılabilir hale gelirler (Hamad, Skeldon, & Valvano, 2010; Kim, Chaurasia, Batool, Ko, & Kim, 2019).

Metodoloji Detayları

Klasik protokol, konak hücre hattının enfekte edilmesi ile başlar. Belirlenen enfeksiyon süresi sonunda hücreler yıkanarak serbest bakteriler uzaklaştırılır. Ardından ortam gentamisin ile desteklenir, böylece ekstrasellüler bakteri popülasyonu selektif olarak elimine edilir. Gentamisin bozulmuş hücre membrallarından yavaşça geçebilse bile, hücre içi bakterilerin öldürülmesini minimuma indirir. Daha sonra hücre lizatı elde edilir ve invaze olmuş bakteriler seri seyreltme ve besiyeri üzerine plaklama ile kantitatif olarak sayılır (Dirks & Quinlan, 2014; Kim et al., 2019).

Avantajlar ve Limitasyonlar

Gentamisin koruma analizi, invazyon yeteneğinin değerlendirilmesinde nispeten basit, reproducible ve niceliksel bir yöntem sağlar. Bununla birlikte, gentamisin'in hücre içi penetrasyonunun bazı koşullarda daha yüksek olabileceği ve bu durumun içsel bakterileri etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır; bu nedenle antibiyotik konsantrasyonu ve

inkübasyon süreleri dikkatle optimize edilmelidir. Bu protokolün sınırlamalarından biri, içeriği yalnızca “korunmuş bakteri” sayısını ölçmesi ve bu sayının bakteriyel invazyon dışında replikasyon ile değişebilmesidir. Bu nedenle daha uzun süreli invazyon ve replikasyon çalışmalarında bu yöntem tek başına yeterli olmayabilir ve tamamlayıcı analizler gerektirebilir (Dirks & Quinlan, 2014; Hamad et al., 2010).

9.3.3. İntrasellüler Replikasyon: Hücre İçi Sağkalım ve Çoğalma Dinamikleri

Bir bakteri hücre içine girdikten sonra, patojenin hayatta kalması ve çoğalması, enfeksiyonun ilerlemesi açısından kritik öneme sahiptir. Hücre içi replikasyon, hem bakteriyel virülans faktörlerine hem de konak hücre yanıt mekanizmalarına bağlıdır. Bu süreçler yalnızca invazyonun ölçümü ile sınırlı kalmayıp, ayrıca bakterinin konak envazyon sonrası metabolik uyum yeteneğini de anlamamızı sağlar (Hu, Ling, & Ren, 2022).

İntrasellüler Çoğalma Analizleri

İntrasellüler replikasyon çalışmaları genellikle gentamisin koruma testini takiben yapılır. Belirli zaman noktalarında (örneğin 2, 6, 12, 24 saatler) hücre içindeki bakteri sayıları ölçülür ve bu sayımlar Hücre İçi Bakteri Sayısı (CIBS) trendleri ile karşılaştırılır. Bu yaklaşım, patojenin hücre içine girişten sonra multiplike olup olmadığını veya sessiz bir şekilde uzun süre hayatta kalmayı tercih ettiğini ortaya koyabilir (Jia et al., 2024; Maure, Robino, & Van der Henst, 2023).

Moleküler ve Görüntüleme Teknikleri

İntrasellüler replikasyon dinamiklerini incelemek için floresan protein ifadesi, konfokal mikroskopi ve canlı hücre görüntüleme gibi moleküler teknikler de kullanılır. Bu teknikler, hücre içi bakteri lokalizasyonu, vakuol içi veya sitozol içi çoğalma gibi ayrıntılı patojen yaşam döngüsü adımlarını incelemeye imkân tanır (Schorr, Mathies, Elinav, & Puschhof, 2023).

9.3.4. Uygulama Alanları ve Metodolojide İnovasyonlar

Hücre kültürü tabanlı bakteriyel adezyon-invazyon analizleri hem temel patogeneze araştırmalarında hem de yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde kullanılır. Bu analizler antikor veya küçük moleküllerin bakteriyel tutunma veya hücre içi yayılım üzerindeki etkisini de değerlendirmek için güçlü araçlardır. İlaveten görüntüleme tabanlı yüksek içerikli yaklaşımlar, bireysel hücre düzeyinde veriler sağlayarak geleneksel kültür yöntemlerinin ötesine geçer (Dsouza, Dinesh, & Sharma, 2024; Flemming et al., 2025).

Sonuç olarak hücre kültürü tabanlı mikrobiyolojik analiz stratejileri, bakterilerin konak hücrelerle etkileşimini fonksiyonel düzeyde değerlendirmek için hayati öneme sahiptir. Adezyon testleri bakteriyel bağlanma mekanizmalarını, gentamisin koruma testi invazyon kapasitesini ve intrasellüler replikasyon analizleri ise konak hücre içi çoğalma yeteneğini ortaya koyar. Bu yöntemlerin kombine kullanımı, patogeneze mekanizmalarının ayrıntılı çözümlemesini sağlar

ve hem temel bilim hem klinik mikrobiyoloji alanlarında güçlü bir araç seti oluşturur.

9.4. Viral Analizler ve Sitopatojenik Etki (CPE)

Viral enfeksiyonların *in vitro* modellenmesi hem viral patogenezin incelenmesi hem de antiviral ilaç ve aşı geliştirme süreçlerinde merkezi bir role sahiptir. Bu modeller, viral parçacıkların hücre monolayerleri üzerindeki etkilerini ölçmek, virüs izolasyonu yapmak ve viral replikasyon dinamiklerini kantitatif olarak belirlemek için kullanılır (Céspedes-Tenorio & Arias-Arias, 2023). Özellikle sitopatojenik etki (CPE-cytopathic effect) olarak adlandırılan hücresel değişimler, viral enfeksiyonun varlığını ve ilerlemesini göstermek üzere sık başvurulan bir fenotipik göstergedir. Bir viral partikülün konakçı hücreye girişinden sonra hücre morfolojisinde oluşan değişiklikler, CPE olarak adlandırılır ve bu etki *in vitro* virüs üretimi, enfeksiyon dozunun belirlenmesi ve antiviral testler için temel bir ölçüttür (Abed & Boivin, 2009). CPE ile gözlemlenen hücresel bulgular arasında hücre yuvarlanması, detachment, vakuolizasyon ve nükleer parçalanma gibi fenotipik değişimler yer alır. Bu etkiler, hücre kültürü deneylerinde mikroskopik olarak izlenebilir ve viral enfektivite titerinin belirlenmesine temel sağlar (Onakpoya et al., 2022).

Bu bölümde virüs izolasyonu, doku kültürü enfektif dozu (TCID₅₀) hesaplama yöntemleri ve plak deneyleri yoluyla viral titrasyon gibi geleneksel ama bilimsel olarak geçerliliği yüksek analiz stratejileri ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

9.4.1. Virüs İzolasyonu ve Hücre Kültürü Modelleri

Virüs izolasyonu, klinik veya çevresel örneklerden aktif viral ajanların *in vitro* çoğaltılması işlemidir. Bu işlem genellikle duyarlı hücre hattına sahip kültürlerde gerçekleştirilir ve virüsün konakçı hücreleri infekte etmesi ile CPE gözlemlenir (Mautner et al., 2022). İzolasyon için seçilecek hücre hattı, virus türüne özgü tropizme uygun olmalıdır; örneğin Vero E6 hücreleri SARS-CoV-2 gibi koronavirüsler için sıklıkla kullanılırken, BHK-21 veya MDCK hücreleri farklı RNA virüsleri için tercih edilir. İzolasyon sürecinde, klinik örnekler öncelikle santrifüj edilir ve süpernatant elde edilir (Goswami et al., 2022). Bu viral fraksiyon, hücre monolayerine inoküle edilir ve belirli bir süre inkübe edilir. Süre sonunda CPE varlığı mikroskopla değerlendirilir; pozitif CPE, başarılı viral izolasyonun klasik göstergesidir. Bu süreçte ortamın sterilliği, hücre sağlığı ve uygun inkübasyon koşulları (37 °C, %5 CO₂ gibi) deneyin başarısı için kritik önemdedir (Laposova, Oveckova, & Tomaskova, 2017).

9.4.2. Sitopatojenik Etki (CPE)

Sitopatojenik etki, viral enfeksiyonun *in vitro* hücrelerde oluşturduğu morfolojik ve fizyolojik değişikliklerin genel tanımıdır (Agol, 2012). Bu etkiler ışık mikroskobu ile incelenebilir ve viral enfeksiyon dozunun belirlenmesinde niceliksel bir parametre olarak kullanılabilir. CPE gözlemi, virüsün hücrenin metabolizmasını bozduğu ve viral çoğalma için hücre kaynaklarını ele geçirdiğinin göstergesidir. CPE tipik olarak enfekte hücrelerin yuvarlanması,

detache olması veya vakuolizasyon gibi karakteristik morfolojik değişiklikler şeklinde ortaya çıkar. Bu değişimler, viral replikasyonun kinetiği ile yakından ilişkilidir ve enfeksiyonun *in vitro* seyri boyunca revize edilen analizlerde önemli bir parametre olarak değerlendirilir (Akkutay-Yoldar et al., 2025; Ng, Mok, & Chu, 2022).

9.4.3. Doku Kültürü Enfektif Dozu: TCID50 Mevzuatı, Protokoller ve Hesaplama

Doku kültürü enfektif dozu (TCID50) terimi, bir viral stokta hücre kültürü sisteminde enfeksiyon oluşturan partiküllerin sayısını istatistiksel olarak belirler. Spesifik olarak, TCID50, viral inokülasyon sonunda 50 % hücre monolayeri enfekte eden seri dilüsyon dozunu ifade eder. Bu değer, viral enfektivite titerinin bir göstergesi ve çok sayıda laboratuvar tarafından viral yükün kantifikasyonunda kullanılır. TCID50, klasik bir uç nokta seyreltilmiş dilüsyon assay'idir ve CPE bazlı tespit yöntemlerine dayanır (Baid, Chiok, & Banerjee, 2024).

Protokol Adımları

1. Hücre Tek Tabakalarının Hazırlanması: Uygun hücre hattı (ör. Vero, MDCK) uygun hücre yoğunluğunda bir plaka veya kültür tüpüne ekilir ve monolayer oluşturuluncaya kadar inkübe edilir.
2. Seri Dilüsyon: Viral stok, seri olarak 10-luk dilüsyonlara hazırlanır. Her dilüsyon belirli sayıda kuyulara inoküle edilir.

3. İnkübasyon ve CPE Değerlendirmesi: Viral inokülasyon sonrası hücreler belirli süre inkübe edilir ve CPE varlığı mikroskopla günlük olarak değerlendirilir.
4. Endpoint Hesaplama: Hücrelerin yarısının (50 %) CPE gösterdiği en yüksek seri dilüsyon, TCID₅₀ değeri olarak kaydedilir. Hesaplamalarda Reed-Muench veya Karber gibi istatistiksel yaklaşımlar kullanılabilir (Zapata-Cardona et al., 2022).

TCID₅₀ yöntemi, özellikle CPE gözlemi ve hücre hattı uyumu gibi öznel kriterlere dayandığı için dikkatli deneysel uygulama gerektirir. Bununla birlikte, geliştirilmiş alternatifler olarak TCID₅₀-ELISA, immunoperoksidaz veya qPCR tabanlı okuma sistemleri gibi yöntemler daha objektif okuma sağlar ve bakteri/virüs replikasyon kinetiğini daha hassas biçimde kantitatif hale getirir (Bullen, Davis, & Looney, 2022; Hochdorfer, Businger, Hotter, Seifried, & Solzin, 2022).

9.4.4. Plak Deneyi ile Viral Titrasyon: Altın Standart Yaklaşım

Plak deneyi, viral parçacıkların enfektif kapasitesini plak oluşturan birim (PFU) cinsinden ölçen klasik bir titrasyon yöntemidir. Bu yöntem, hücre monolayeri üzerinde her bir enfektif virüs partikülünün lokalize bir plağa yol açması prensibine dayanır. Oluşan her plak, başlangıç viral stoktaki bir enfektif virüs partikülünün lokal çoğalma odak alanını temsil eder (Vaidya, 2023).

Deneyisel Uygulama

1. Seri Seyreltme: Viral stok örneği logaritmik seri dilüsyonlara hazırlanır ve hücre monolayerine eklenir.
2. Overlay Uygulaması: Virüsün yayılımını lokalize hale getirmek için agar veya benzeri yarı katı bir medium eklenir. Bu kaplamalar, viral partiküllerin hücreler üzerinde difüzyonunu sınırlandırır.
3. İnkübasyon Süresi: Belirli süre inkübasyon sonrası (örneğin 48–72 saat), hücre monolayeri formalinle fiks edilir ve kristal viyole veya benzeri bir boya ile lekelenir.
4. Plak Sayımı: Oluşan plaklar mikroskop altında sayılır ve viral titer PFU/mL cinsinden hesaplanır (Bhatt et al., 2022; Navarro-Forero, Dsouza, & Yang, 2023).

Plak deneyi *in vitro* viral titrasyonun “altın standardı” olarak kabul edilir çünkü PFU sayısı doğrudan enfektif virionların işlevsel kapasitesini gösterir. Bu yöntem, farklı virüs suşlarının karşılaştırmalı titrasyonunda ve antiviral ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesinde de geniş uygulama alanına sahiptir (Neupane & Bai, 2023).

9.4.5. TCID₅₀ ve PFU Karşılaştırması

TCID₅₀ ve plak deneyleri her ikisi de *in vitro* viral yükün kantifikasyonunu sağlar; ancak metodolojik yaklaşımları ve sonuç birimleri farklıdır. Plak testi PFU/mL birimi ile doğrudan enfektif virion sayısını verirken, TCID₅₀ istatistiksel bir doz yanıt hesaplaması sağlar. Araştırmalar, TCID₅₀ ve PFU değerleri arasında korelasyon bulunduğunu ancak farklı virüs suşlarında varyasyon gösterebildiğini

bildirmektedir; örneğin bazı SARS-CoV-2 varyantlarında PFU ve TCID50 arasında log farkı rapor edilmiştir. Bu sonuç, her iki yöntemin de avantaj ve sınırlılıklarının deneysel bağlama göre değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Bacher, Lali, Steiner, & Jungbauer, 2024; Hochdorfer et al., 2022).

9.4.6. CPE Temelli İnkübasyon ve Analizlerin Klinik & Araştırma Uygulamaları

Viral titrasyon teknikleri, yalnızca temel patogenezi çalışmaları için değil aynı zamanda antiviral ajan testleri, aşılama stratejisi değerlendirmeleri ve klinik örneklerde enfektivitenin belirlenmesi için de yaygın olarak kullanılır. CPE gözlemi, bu tür uygulamalarda hızlı ve doğrudan bir gösterge sağlar; ayrıca, antiviral etkinlik testleri hücre kültürlerinde virüsün yol açtığı CPE'deki değişiklik üzerinden log azalma değerleriyle kantitatif olarak raporlanır (J. H. Lee, Lee, Kim, Yi, & Lee, 2013; Yuan et al., 2024).

Sonuç olarak viral analiz stratejileri, *in vitro* çalışmalarda virüs izolasyonu, titer belirleme, replikasyon dinamikleri ve antiviral ajan değerlendirmeleri için vazgeçilmez araçlardır. TCID50 ve plak deneyleri, enfektif virion sayısının ve virüsün hücre kültürü üzerindeki etkisinin kantitatif olarak ölçülmesini sağlar. Her iki yöntem de güçlü ve yaygın olarak kabul görmüş protokollerdir; ancak seçim, virüs türü, hücre hattı, CPE özellikleri ve deneysel hedeflere göre optimize edilmelidir.

9.5. Konakçı-Patojen Etkileşiminin Ölçülmesi

Konakçı-patojen etkileşimleri, enfeksiyon sürecinin hem mekanistik hem de klinik boyutlarını anlamak için kritik öneme sahiptir. Bu etkileşimler, patojenin sitotoksik etkilerinden konak hücrelerin immün yanıtına kadar geniş bir fenotipik spektrumu kapsar. Hücre kültürü modellerinde ölçülen bu etkiler, sitotoksisite, sitokin salınım profilleri ve hücre ölümü gibi parametrelerle kantitatif hale getirilebilir (Sen, Nayak, & De, 2016). Bu bölüm, hücre hasarı ve immün yanıtın ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemleri akademik bir perspektifle inceler ve her bir metodun patogenez araştırmalarında nasıl konumlandığını açıklar.

9.5.1. Sitotoksisite Analizleri: MTT, XTT ve LDH Salınım Testleri

Sitotoksisite analizleri, konak hücre kültürlerinde patojen etkisini veya bir bileşiğin toksik potansiyelini değerlendirmede yaygın olarak kullanılan *in vitro* yöntemlerdir. Bu testler genellikle hücre canlılığını veya hücre membran bütünlüğünü ölçen biyokimyasal ve metabolik göstergeler üzerinden çalışır ve patojenin hücresel metabolizmayı nasıl bozduğunu kantitatif olarak ortaya koyar. Popüler sitotoksisite yöntemleri arasında MTT, XTT ve LDH salınım testleri yer alır; bu yöntemlerin her biri hücre canlılığını farklı biyolojik parametrelerle değerlendirir (Mani & Swargiary, 2023).

MTT ve XTT Assay'leri

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi, hücresel metabolik aktiviteyi ölçen kolorimetrik bir tekniktir. Canlı hücreler, tetrazolyum tuzlarını NAD(P)H-bağımlı oksidoreduktaz enzimleri aracılığıyla mor formazan kristallerine dönüştürür; bu ürün daha sonra çözülerek absorbans ölçümüne tabi tutulur. Absorbans seviyesindeki azalma, hücresel metabolizmanın bozulduğunu ve dolayısıyla sitotoksik etkinin arttığını gösterir. XTT ise benzer bir mekanizmaya sahip alternatif bir tetrazolyum tuzudur ve daha yüksek duyarlılık ile dinamik aralığa sahiptir. Bu yöntemlerin avantajları arasında yüksek tekrarlanabilirlik, kolay yürütülebilirlik ve çok sayıda örneğin aynı anda analiz edilebilmesi yer alır. Ancak, bu testler hücrenin metabolik aktivitesinin dolaylı bir gösterimini sağladığından, metabolik modifikasyonlar hücre canlılığındaki gerçek değişimin bazı yönlerini maskeleyebilir. Bu nedenle MTT/XTT sonuçları genellikle diğer sitotoksikite parametreleri ile yorumlanır (Mani & Swargiary, 2023).

LDH Salınım Testi

Laktat Dehidrogenaz (LDH) salınım testi, hücre membran bütünlüğünü doğrudan ölçen bir biyokimyasal yaklaşımdır. Normalde sitoplazmada bulunan LDH enzimi, hücre membranı zarar gördüğünde dış ortama salınır. Kültür ortamındaki LDH aktivitesi, hücre hasarının bir göstergesi olarak spektrofotometrik veya floresan yöntemlerle ölçülür. LDH assay'leri, membran hasarını doğrudan tespit edebilmesi açısından özellikle nekrotik hücre ölümünün değerlendirilmesinde güçlüdür. LDH ölçümü; cerrahi doku kültürü çalışmalarında,

enfeksiyon modeli deneylerinde veya kimyasal-patolojik etkenlerin sitotoksik etkilerinin incelendiği durumlarda standart bir metod olarak kullanılır. Membran bütünlüğünün bozulması, hücrenin ölüm sürecinin kaçınılmaz bir belirtisidir ve bu test sitotoksisiteyi doğrudan yansıtır (Parhamifar, Andersen, & Moghimi, 2019; Specian et al., 2016).

Yorum ve Deney Tasarımı

MTT/XTT ve LDH analizleri birlikte kullanıldığında, hücre canlılığı ve membran bütünlüğü hakkında kapsamlı bir tablo sağlar. Örneğin, patojenle enfekte edilen kültürlerde metabolik aktivite azalırken LDH salınımı artabilir; bu, hücre ölümünün hem metabolik hem de membran düzeyindeki yansımalarını ortaya koyar. Sitotoksik etki, zaman-doz eğrileri, kontrol ve deney grubunun karşılaştırmalı analizleri ile ortaya konmalıdır; ayrıca sonuçların istatistiksel anlamlılığı uygun testlerle değerlendirilmelidir (Anil, K. Sweety, Joseph, & Vikas, 2023; Mani & Swargiary, 2023).

9.5.2. Enflamatuvar Yanıt Ölçümü: Sitokin Salınımının ELISA ve qPCR ile Analizi

Sitokinlerin Rolü

Konakçı bağışıklık yanıtı, enfeksiyonun ilk dönemlerinde hızla aktive olur ve çeşitli pro-inflamatuvar sitokinler salgılanır. Özellikle İnterlökin-6 (IL-6) ve Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) gibi moleküller, inflamasyonun geniş çapta değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak kullanılırlar. Bu sitokinler, enfekte hücrelerin patojen yüküne veya

bağışıklık tetikleyicilerine yanıt olarak bağışıklık hücreleri tarafından salgılanır ve sistemik yanıtın önemli göstergeleridir (Peinnequin et al., 2004).

ELISA ile Sitokin Ölçümü

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), sitokinler gibi küçük proteinlerin kültür süpernatantı veya hücre lizatı içindeki konsantrasyonlarını yüksek duyarlılık ve özgüllükle ölçmek için kullanılan immunolojik bir yöntemdir. Sitokinlere özgü antikorlar kullanılarak yapılan ELISA analizlerinde, standart eğriler üzerinden IL-6 ve TNF- α düzeyleri kantitatif olarak belirlenir. Bu yöntem, özellikle patojenle enfekte edilmiş hücre kültürlerinde inflamatuvar yanıtın şiddetini değerlendirmek için sıkça tercih edilir ve sonuçlar pg/mL düzeyinde raporlanır. ELISA'nın avantajı, yüksek özgüllük ve nispeten düşük arka plan sinyali ile doğru ölçümlere olanak vermesidir. Aynı anda birçok sitokin paneli de değerlendirilebilir; böylece pro- ve anti-inflamatuvar profiller bütünüyle analiz edilebilir (Fakharian, Sadeghi, Pouresmaeili, Soleimani, & Yadegar, 2024; Zhang et al., 2025).

qPCR Tabanlı Sitokin Analizi

Gerçek zamanlı qPCR (quantitative PCR), sitokin gen ekspresyonunun ölçümünde kullanılan bir moleküler tekniktir. mRNA seviyeleri üzerinden inflamatuvar yanıtın transkripsiyonel düzeyde analizini sağlar. Sitokin genlerinin (örneğin IL-6, TNF- α) qPCR ile ölçülmesi, biyobelirteçlerin sadece salınımı değil, aynı zamanda

düzenlenme mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılmasını da mümkün kılar. Bu yaklaşım, sitokin üretimini yöneten sinyal yollarının aktivitesinin değerlendirilmesine yardımcı olur ve sonuçlar gen ifade seviyeleri olarak raporlanır (Aghamohammad et al., 2022; Giulietti et al., 2001).

9.5.3. Apoptoz ve Nekroz: Floresan Boyamalar ile Tespiti

Hücre Ölümü Modlarının Tanımlanması

Konakçı hücreler, patojen etkileşimi sonucu farklı biçimlerde ölüm yollarına yönlendirilebilir. Apoptoz, programlanmış hücre ölümü mekanizmasıdır ve karakteristik olarak nükleer kondensasyon, DNA fragmantasyonu ve hücre membranında “blebbing” ile ilişkilidir. Nekroz ise genellikle akut membran hasarı ve içeriğin çevreye salınması ile tanımlanan pasif bir ölüm modudur. Bu iki ölüm türü, enfeksiyonun patogenezi ve bağışıklık yanıtı üzerindeki etkileri bakımından farklı implicasyonlara sahiptir (Alshehade, Almoustafa, Alshawsh, & Chik, 2024; M. Gao et al., 2022).

Floresan Boyama Yaklaşımları

Apoptoz ve nekrozun *in vitro* hücre kültürlerinde tespiti için çeşitli floresan boyalar kullanılır. Örneğin:

- Annexin V-FITC / Propidium Iodide (PI) kombinasyonu: Annexin V, hücre membranında dışa çıkan fosfatidilserini bağlarken (erken apoptoz göstergesi), PI sadece membranı

bozulmuş nekrotik veya geç apoptoz hücrelerine girer. Böylece hücre popülasyonları ayrışabilir.

- Caspase aktiviteleri için floresan bağlanan probe'lar, apoptoz sürecinin aktivasyonunu doğrudan gösterir.

Bu tür floresan boyamalar, akış sitometrisi veya konfokal mikroskopisi ile analiz edilebilir; bu durum hem niceliksel hem de görsel fenotipik ayrım sağlar. Floresan sinyaller, apoptoz-nekroz oranlarını belirlemek üzere grafiksel olarak raporlanabilir (Kari et al., 2022; Krysko, Vanden Berghe, D'Herde, & Vandenabeele, 2008; Vanden Berghe et al., 2013).

Sonuç olarak konakçı-patojen etkileşiminin ölçülmesi, *in vitro* modellenmiş enfeksiyon sistemlerinde multidisipliner analizler gerektiren bir süreçtir. Sitotoksikite analizleri (MTT, XTT, LDH), hücre metabolizması ve membran bütünlüğü üzerine hızlı ve kantitatif bilgiler verir. Sitokin analizleri (ELISA, qPCR), inflamatuvar yanıtın moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesini sağlar. Floresan boyamalar ise hücre ölüm modlarının incelenmesinde kritik ayrıntılar sunar. Bu yöntemlerin birbirini tamamlayıcı biçimde kullanılması, konakçı-patojen etkileşiminin mekanistik ve fonksiyonel çözümlemesini mümkün kılar.

9.6. İleri Model Sistemleri

Geleneksel iki boyutlu (2D) hücre kültürü sistemleri, konakçı-patojen etkileşimleri hakkındaki temel bilgileri sağlayan ilk araçlar

olmuş olsalar da, birçok fizyolojik özelliği yeniden oluşturmakta yetersiz kalırlar. Bunun başlıca nedenleri arasında monokültürlerin doku mimarisindeki hücresel heterojenliği, üç boyutlu (3D) mikroçevreyi ve multi-hücreli etkileşimleri yansıtamaması yer alır. Bu sınırlılık, enfeksiyon biyolojisi, ilaç cevabı ve bağışıklık yanıtı gibi süreçlerin *in vivo* benzeri şekilde anlaşılmasını zorlaştırır. Bu nedenle, yüksek düzeyde biyolojik gerçekçiliğe sahip co-culture sistemleri ve 3D kültür ile organoid modelleri geliştirilmiştir; bu modeller, çok hücreli doku mimarisini ve konakçı-patojen dinamiklerini daha doğru şekilde taklit eder (Jiang, Luo, Huang, Liu, & Li, 2022; Kay & Wren, 2009). Bu bölümde, öncelikle birlikte kültür (co-culture) modellerinin tanımı ve enfeksiyon araştırmalarındaki uygulamaları; ardından organoidler ve diğer 3D kültür tekniklerinin yapısı, avantajları ve sınırlılıkları ele alınacaktır.

9.6.1. Birlikte Kültür (Co-Culture) Modelleri: Teorik Altyapı ve Uygulamalar

Birlikte kültür (co-culture) sistemleri, birden fazla hücre tipinin aynı ortamda eşzamanlı olarak yetiştirilmesini ifade eder. Bu modeller, farklı hücre tiplerinin heterotipik etkileşimlerini, kimyasal sinyalleşmeyi, hücre-hücre mekaniğini ve mikroçevresel bağlamdaki iletişimi yeniden oluşturmak üzere tasarlanır (Picot, Shibasaki, Meacock, & Mitri, 2023). Co-culture yaklaşımları; basit iki hücre tipini içeren sistemlerden kompleks multi-hücreli mimariye kadar geniş bir yelpazede uygulanabilir. Mikrobiyoloji bağlamında co-culture sistemleri, konakçı hücreler ile mikroorganizmaların (bakteri, virüs

veya mantar) aynı *in vitro* ortamda etkileştirilmesini sağlar. Bu tür sistemler, klasik tek tip hücre kültürlerine kıyasla patojenlerin invazyon davranışını, bağışıklık yanıtını ve inflamatuvar süreçleri daha gerçekçi şekilde yansıtır (K. W. Lee et al., 2023). Örneğin, *Staphylococcus aureus* ile 3D ko-culture pleura modeli geliştirildiğinde, enfeksiyonun sitotoksik etkileri, hücreler arası sıkı bağlantıların bozulması ve pro-inflamatuvar sitokin üretimindeki artış gibi farklı hayatta kalma ve patogeneze göstergeleri gözlemlenebilmiştir (Jung, Kim, Kim, Hwang, & Lee, 2025). Bu modelde LDH salınımı ve sitokin değişimleri ELISA ile kantitatif olarak ölçülmüştür ve bu bulguların klasik 2D modellerle karşılaştırıldığında daha yüksek biyolojik geçerlilik gösterdiği rapor edilmiştir (Jung et al., 2025; Kurow et al., 2023).

Co-Culture Sistemlerinin Avantajları

Co-culture modelleri, aşağıdaki avantajları sağlar:

- Hücresel heterojenliğin yeniden oluşturulması: Örneğin epitel hücreleri ile fibroblast, endotel veya bağışıklık hücrelerinin birlikte kültüründe hücre-hücre sinyalleşmesi ve mikromimari daha gerçekçi şekilde değerlendirilir.
- Mikroçevresel sinyalleşme: Birlikte kültürde hücreler arası büyüme faktörleri, immün cevap düzenleyicileri ve metabolitler doğal olarak etkileşime girer.

- Enfeksiyon modelleri: Patojen yayılımı, bariyer fonksiyonu bozulması veya inflamasyon dinamikleri dış ortam ve hücresel bağlamda daha doğru şekilde ölçülebilir (Yao et al., 2024; Zhao et al., 2022).

Co-Culture Teknikleri

Co-culture sistemleri mikrobiyoloji araştırmalarında farklı formatlarda uygulanır:

1. Matriks-gömülü co-culture: Hücreler ve mikro organizmalar ECM (ekstraselüler matriks) içinde birlikte büyütülür.
2. Transwell ve mikroakışkan çip sistemleri: Bir hücre tipi üst bölmede, diğeri alt bölmede olmak üzere ayrılır; ancak kemotaksis, sinyal molekülleri gibi faktörler geçirgen membran üzerinden etkileşir.
3. Mikroenjeksiyon: Özellikle organoidlerde mikroorganizmaların lumen içine doğrudan enjekte edilerek iç yüzeyle temas etmeleri sağlanır (Guo, Xi, & Lu, 2024).

Her tekniğin tasarımı, enfeksiyonun modellenme amacına göre optimize edilir; örneğin epitel bariyerine yönelik çalışmalar laminar akışlı mikrofluidik çiplerde yürütülebilirken, sistemik hücresel yanıtlar için Matrigel tabanlı ko-culture tercih edilebilir (Thuan, Tatipamula, Canh, & Van Giang, 2022).

9.6.2. Üç Boyutlu (3D) Kültür ve Organoid Sistemleri

3D Hücre Kültürünün Gerekliliği

2D monolayerlerde hücreler tek düzlemde birbirleriyle sınırlı temas kurar, doğal doku yapısının üç boyutlu mimarisi yeniden oluşturulamaz. Bu nedenle, 3D kültür sistemleri hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini, difüzyon gradyanlarını ve gerçek doku mimarisini taklit etmek üzere geliştirilmiştir. Üç boyutlu modeller *in vivo* doku davranışını daha doğru şekilde yansıtır ve enfeksiyon dinamikleri, mikroçevresel regülasyon ve patojen yayılımını daha iyi değerlendirir (Ramírez-Flores, Perdomo, Gallego-López, & Knoll, 2022).

Organoidler: Köken, Tanım ve Özellikler

Organoidler, kök hücre veya doku-özgü progenitör hücrelerin kendi kendine organize olarak 3D yapılarda farklılaşması ile meydana gelen mini-organ benzeri yapılar olarak tanımlanır. Bu yapıların temel özellikleri şunlardır:

- Doku-özgü hücre tiplerini içerirler
- Öz-organize olurlar
- *In vivo* doku mimarisini taklit ederler
- Fizyolojik fonksiyonel özellikler gösterirler

Organoidlerde hücreler matrigel veya benzeri ECM benzeri bir ortam içinde büyür ve zaman içinde kendi kendini organize eden

mikromimari yapılar oluşturur. Bu yapılar, organ benzeri bir polarite, apikal-bazal yüzey ayrımı ve doku-özgü diferansiyasyon profili gösterir (Varan & Unal, 2023).

Organoidlerin Enfeksiyon Araştırmalarındaki Rolü

Organoidler, özellikle gastrointestinal, solunum ve sinir sistemi dokuları için mikro ortamı taklit eden modeller olarak enfeksiyon biyolojisinde hızla yaygınlaşmıştır. Örneğin, *Helicobacter pylori* gibi patojenlerin gastrik organoidlere mikroenjeksiyonu ile konak epitel reaksiyonları ayrıntılı olarak incelenebilmekte; böylece patojen-konakçı etkileşim mekanizmaları moleküler düzeyde açığa çıkarılmaktadır (Y. Yin, Xu, & Steinway, 2023).

Organoidlerin bir diğer önemli uygulaması, patojenlerin epitel bariyerini geçiş yollarının incelenmesidir. Apikal veya bazal uygulamayla enfeksiyon, hücreler arası etkileşimin farklı yönleriyle incelenebilir; bu sayede patojenler tarafından tetiklenen sinyal yolları ve inflamatuvar yanıtlardaki heterojenlik saptanabilir.

3D organoid modellerinin avantajları;

- Fizyolojik doku mimarisi: Gerçek doku hiyerarşisini içerir.
- Hücresel heterojenite: Birden fazla hücre tipini barındırabilir.
- Klinik geçerlilik: İnsan-özgü patojen modelleri oluşturabilir (Dutta & Clevers, 2017).

Ancak organoid modellerin bazı sınırlılıkları da vardır. Örneğin, çoğu modelde bağışıklık hücreleri doğal olarak mevcut değildir, bu durum ek component olarak co-culture gerektirebilir; bu, organoidler ile bağışıklık hücrelerini birlikte kültürleme stratejilerinin geliştirilmesini motive etmektedir (Sun, 2017).

9.6.3. Co-Culture ve Organoid Sistemlerinin Birleşimi: Yeni Nesil Modelleme

Mikrop-Organoid Co-Culture

Modern *in vitro* enfeksiyon modellerinde, organoidlerle patojenlerin birlikte kültürlenmesi mikro ortamdaki etkileşimleri daha yüksek gerçeklikle incelemeyi sağlar. Bu modeller hem hücre mimarisi hem de patojen dinamikleri açısından çok boyutlu veri sağlar. Bu tür sistemlerde mikroorganizmaların organoid içine veya çevresine uygulanması farklı enfeksiyon süreçlerini modelleyebilir ve bağışıklık yanıtını tetikleyen mekanizmalar değerlendirilebilir. Bir avantajı, organoid ve patojenin doğrudan veya ECM içinde etkileşime sokulmasıyla *in vivo* benzeri enfeksiyon senaryolarının modellenenbilmesidir. Patoloji ve immün yanıt ölçümleri, gen ekspresyon analizleri ve sitokin profilleri ile bu modellerde çalışılabilir (Dutta & Clevers, 2017).

Co-Culture Sistemlerinin Klinik ve Araştırma Kullanımı

Organoid ve co-culture yaklaşımları aşağıdaki alanlarda önemli uygulamalara sahiptir:

- Mikrobiyal patogeneze mekanizmalarının diseksiyonu
- Antiviral ve antibakteriyel tedavi stratejilerinin test edilmesi
- Konakçı inflamacı yanıtın modellenmesi
- Personalize medicine için hasta-özü modellerin geliştirilmesi (Temkin, Carlson, Stubbendieck, Currie, & Stubbendieck, 2019)

9.6.4. Teknik Zorluklar ve Gelecek Perspektifler

Yine de ileri model sistemlerinde bazı sınırlılıklar vardır:

- Organoidlerin vaskülarizasyon, immün komponent entegrasyonu ve mikrobiyota bileşenlerinin eklenmesi teknik zorluklar yaratır.
- Tüm organ sistemlerini tam anlamıyla temsil eden multi-organ modellerin geliştirilmesi halen araştırma aşamasındadır.
- Uzun süreli enfeksiyon modellerinde stabilite ve fenotip korunması sağlanmalıdır.

Gelecekte, mikroakışkan tabanlı çip-üstü modeller, biyobaskı teknikleri ve hibrit sistemler organoidler ile ko-culture yaklaşımlarını entegre ederek daha yüksek düzeyde organizasyon ve doku heterojenliği sunacaktır (Lagier et al., 2015).

Sonuç olarak Co-culture ve 3D kültür & organoid modelleri, klasik 2D hücre kültürü limitlerini aşarak enfeksiyon biyolojisi ve konakçı-patojen etkileşimlerini moleküler, hücresel ve doku-

ölçeğinde incelemek için güçlü araçlar sunar. Bu ileri sistemler, daha yüksek biyolojik geçerlilik ve *in vivo* ile tutarlılık sağlar ve hem temel bilim hem translasyonel araştırmalar için vazgeçilmezdir.

9.7. İn Vitro İlaç ve Toksisite Taramaları

İlaç geliştirme süreçlerinde *in vitro* hücre kültürü tabanlı toksisite ve etkinlik testleri, klinik adayların erken aşamada eleme ve optimizasyonunda kritik rol oynar. Yeni antimikrobiyal bileşiklerin hem hedef mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği hem de konak hücreler üzerindeki olası toksik etkileri, farmasötik araştırmaların kalite ve güvenlik parametrelerinin başında gelir. Bu çalışmalar, moleküler düzeyde etkinlik ve yan etki profillerinin sistematik olarak değerlendirilmesini sağlar ve *in vivo* çalışmalara ilerlemeden önce yüksek veri yoğunluğuna sahip sonuçlar üretir. Ayrıca, modern yüksek verimli tarama (High-Throughput Screening, HTS) teknolojileri çok sayıda bileşiğin eş zamanlı değerlendirilmesine imkân sağlayarak ilaç keşfi süreçlerini hızlandırır (Dutka, Nyholm, & Petersen, 1983; Inman, Warris, & Bignell, 2025).

9.7.1. Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite testleri, potansiyel ilaç adaylarının hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendiren ölçüm yöntemleridir. Hücreler, ilaçlara maruz bırakıldığında metabolik aktivite, membran bütünlüğü veya proliferatif kapasite gibi parametrelerde değişimler gösterebilir ve bunlar *in vitro* yöntemlerle kantitatif olarak ölçülebilir. Bu testler hem

toksik yan etkinin şiddetini belirlemede hem de seçicilik indekslerinin hesaplanmasında referans olarak kullanılır. Sitotoksosite değerlendirmesi aynı zamanda klinik aşamada ortaya çıkabilecek advers reaksiyonların erken tahminini destekler (Knap, Jaško, Maciak, Ślęzak-Prochazka, & Kazek-Kęsik, 2025; Turgeon et al., 2003).

MTT/XTT ve Alternatif Renkimetri Analizleri

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür) ve XTT benzeri tetrazolyum esaslı testler, hücre metabolik aktivitesi üzerinden canlılık ölçümü yapar. Metabolik enzimler tetrazolyum tuzlarını indirger ve renkli formazan ürünleri oluşturur; absorbans ölçümü ile hücre canlılığı değerlendirilir. Bu metodların avantajı, yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek verimli formatlara uygunluk olmasıdır. Bu testler toksisite ve inhibisyon çalışmalarında başlangıç veri sağlar ve genellikle IC50 (yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu) gibi parametrelerin belirlenmesinde kullanılır. LDH (laktat dehidrogenaz) serbest bırakımı gibi membran bütünlüğüne dayalı testler ise hücre ölümünü göstermek açısından faydalı olup, tetrazolyum testlerini tamamlayıcı bilgi sağlar (Mani & Swargiary, 2023).

ATP, Rezazurin ve Diğer Ölçütler

ATP içeriğini ölçen biyoluminesans tabanlı testler, hücre sayısı ile doğrudan ilişkili sinyal üretir ve HTS ile uyumlu güçlü bir canlılık parametresi sağlar. Rezazurin esaslı testler ise metabolik aktivite

ölçümü ile hem bakteri hem de memeli hücre modellerinde etkinlik ve toksisiteyi değerlendirmek için kullanılabilir; düşük toksisiteye sahip olması uzun süreli çalışmalar için uygundur (Van den Driessche, Rigole, Brackman, & Coenye, 2014).

9.7.2. Yeni Antimikrobiyal Ajanların Etkinlik ve Sitotoksosite Profiline Belirlenmesi

Etkinlik ve Seçicilik İndeksleri

Yeni antimikrobiyal bileşiklerin değerlendirilmesinde etkinlik indekslerinin hesaplanması zaruridir. Bir bileşiğin mikrobiyal hedefe karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) yanında, insan hücrelerinde gösterdiği toksisite derecesi hesaba katılarak seçicilik indeksi (selectivity index, SI) hesaplanır. SI, konakçı hücre toksisitesinin bakteriyel inhibisyon gücüne oranını ifade eder; yüksek değerler yüksek seçiciliğe işaret eder. Bu yaklaşım, aday moleküllerin güvenliğini ve tedavi potansiyelini bir arada değerlendirmede standartlaştırılmış bir ölçüttür (Belete, Ozkan, Kalaiselvan, & Willcox, 2025; Breijyeh & Karaman, 2023).

Farmasötik Etkinlik ve Toksisite Dengesi

Etkin antimikrobiyal aktivite ile kabul edilebilir toksisite arasında bir denge kurmak, hem moleküler optimizasyon hem de klinik aday seçiminde başlıca hedeflerden biridir. Literatürde HTS ile bulunan bileşiklerin ardından hem bakteriyel potansiyel hem de insan hücre sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar, bazı bileşiklerin güçlü

antimikrobiyal aktivite sergilediğini ancak aynı zamanda insan hücrelerinde yüksek sitotoksosite gösterdiğini raporlamıştır; bu durum, aday bileşiklerin modifikasyonunu gerekli kılarak tedavi potansiyelini sınırlamıştır (Gimenez-Bastida, Martinez Carreras, Moya-Pérez, & Laparra Llopis, 2018).

9.7.3. Yüksek Verimli Tarama (HTS) Sistemleri

HTS'nin Rolü ve Teknolojik Bileşenleri

Yüksek verimli tarama (HTS), çok sayıda kimyasal bileşiğin konak hücre ve mikroorganizma modellerinde aynı anda değerlendirilmesini sağlayan sistematik bir yaklaşımdır. 96, 384 veya 1536 kuyucuklu mikropate formatları, robotik sıvı transferi, otomatik görüntüleme ve çok parametrelili analiz sistemleri ile çalışarak büyük veri setleri üretir. HTS, ilaç keşfi süreçlerinde hem etkinlik potansiyeli yüksek molekülleri tanımlamada hem de toksisite risk profillerini hızlıca elimine etmede kritik rol oynar (Sarnaik, Liu, Nielsen, & Varman, 2020).

Fenotipik HTS ve Moleküler HTS

Fenotipik HTS, hücre ölümü, morfolojik değişim veya floresan/biyoluminesans sinyaller gibi fenotipik çıktılara dayalı taramaları ifade eder ve mikroorganizmayla ilişkili fenotipik etkileri yakından izler. Moleküler HTS ise hedefe özgü enzim inhibisyonu veya reseptör bağlanması gibi belirli biyokimyasal etkileşimleri ölçekleyerek değerlendirir. Her iki yaklaşım da farmasötik araştırmalarda eş zamanlı

kullanılarak potansiyel adayların daha doğru seçimini sağlar (Zeng, Guo, Xu, Chen, & Zhou, 2020).

Yüksek İçerikli ve Çok Parametrelili Tarama Yaklaşımları

Güncel çalışmalarda HTS çok parametrelili fenotipik veri elde etmek için biyobilgisayar ve görüntüleme analizi ile entegre edilmektedir. Bu yaklaşımlar, hücre morfolojisi, hücre siklusu, apoptotik ve nekrotik yanıt gibi çoklu parametreyi tek seferde izleyerek toksisite ve etkinlik profillerini daha zengin şekilde sunar. Bu stratejiler, artık ilaç adaylarının çok yönlü etkilerini değerlendirmek için standart hale gelmektedir (Quijada, Hernández, & Rodríguez-Lázaro, 2020).

9.7.4. HTS'nin Uygulama Adımları ve Protokoller

Hazırlık ve Enstalasyon

HTS'ye uygun hücre modelleri seçilmeden önce hücre adaptasyonun doğrulanması, kültür koşullarının optimize edilmesi ve uç değer kontrollerin belirlenmesi gereklidir. Hücreler uygun yoğunlukta mikropate kuyularına ekilir; otomatik pipetleme sistemleri, test edilecek konsantrasyon dizilerini hazırlar. Ardından, kontrol ve test bileşikler ile inkübasyon gerçekleştirilir (Leavell, Singh, & Kaufmann-Malaga, 2020).

Veri Toplama ve Analizi

HTS sonrası veriler elektrometrik, floresan veya biyolüminesans okuyucular aracılığıyla toplanır. Yazılımsal analizler sinyal gürültüsünü ayırarak pozitif hitleri belirler ve istatistiksel güvenilirliği sağlar (Bennke et al., 2016).

9.7.5. Verilerin Yorumlanması, Zorluklar ve Geleceğe Yönelik Stratejiler

Faz I ve II’de Toksisite Öngörüsü

HTS sonuçları ile elde edilen toksisite profilleri, aday moleküllerin daha ileri aşamalarda *in vivo* çalışmalar için risklerini öngörmeye yardımcı olur. Ancak klasik *in vitro* modellerin tüm farmakokinetik ve metabolik süreçleri yansıtamaması, *in vivo* geçerliliği sınırlayabilir; bu nedenle *in vitro* hücre kültürü verileri *in silico* modellerle birlikte analiz edilerek daha doğru öngörüler yapılmaktadır (Thiericke, 2003).

HTS’de False-Positive/Fale-Negative Problemleri

HTS süreçlerinde kontrol stratejileri, pozitif ve negatif kontrollerin uygun şekilde yerleştirilmesi, teknik ve biyolojik tekrarlamalar ile false-positive veya false-negative sonuçların minimize edilmesi stratejik önemlidir. Ayrıca birden fazla assay tipinin pekiştirilmesi daha güvenilir veriler sağlar (Campana, Robles García, Rühli, & Tuross, 2014).

Sonuç olarak *in vitro* ilaç ve toksisite taramaları, yeni antimikrobiyal bileşiklerin değerlendirilmesinde temel bir bilimsel gerekliliktir. Sitotoksisite testleri, hücre canlılığı ve toksik etki profillerini niceliksel olarak ölçerken, HTS sistemleri çok sayıda bileşiğin hızlı, sistematik ve tekrarlanabilir biçimde analizini olanaklı kılar. Bu yaklaşımlar, modern ilaç keşfi ve farmasötik gelişim süreçlerinde hem etkinlik hem güvenlik parametrelerinin bütünleşik değerlendirilmesi için vazgeçilmez araçlardır.

KAYNAKÇA

- Aarattuthodi, S., Kang, D., Gupta, S. K., Chen, P., Redel, B., Matuha, M., . . . Sinha, A. K. (2025). Cryopreservation of biological materials: applications and economic perspectives. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. doi:10.1007/s11626-025-01027-0
- Abed, Y., & Boivin, G. (2009). Molecular Characterization of Viruses from Clinical Respiratory Samples Producing Unidentified Cytopathic Effects in Cell Culture. *Viruses*, 1(2), 84-90. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1999-4915/1/2/84>
- Afify, S. M., & Seno, M. (2023). Culture of Cells: Basic Principles. In *Methods in Cancer Stem Cell Biology* (pp. 23-32). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Agarwal, V., & Singh, M. (2023). Cryopreservation of Cell Lines. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 147-161). Cham: Springer International Publishing.
- Aghamohammad, S., Sepehr, A., Miri, S. T., Najafi, S., Rohani, M., & Pourshafiea, M. R. (2022). The effects of the probiotic cocktail on modulation of the NF-kB and JAK/STAT signaling pathways involved in the inflammatory response in bowel disease model. *BMC Immunology*, 23(1), 8. doi:10.1186/s12865-022-00484-6
- Agol, V. I. (2012). Cytopathic effects: virus-modulated manifestations of innate immunity? *Trends in Microbiology*, 20(12), 570-576. doi:10.1016/j.tim.2012.09.003
- Akkutay-Yoldar, Z., Yoldar, M. T., Akkaş, Y. B., Şurak, S., Garip, F., Turan, O., . . . Ünver, B. (2025). A web-based artificial

- intelligence system for label-free virus classification and detection of cytopathic effects. *Scientific reports*, 15(1), 5904. doi:10.1038/s41598-025-89639-0
- Alshehade, S. A., Almoustafa, H. A., Alshawsh, M. A., & Chik, Z. (2024). Flow cytometry-based quantitative analysis of cellular protein expression in apoptosis subpopulations: A protocol. *Heliyon*, 10(13). doi:10.1016/j.heliyon.2024.e33665
- An, Y. H., & Friedman, R. J. (1997). Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods*, 30(2), 141-152. doi:https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00058-4
- Andrés-Lasheras, S., Zaheer, R., Ha, R., Lee, C., Jelinski, M., & McAllister, T. A. (2020). A direct qPCR screening approach to improve the efficiency of *Mycoplasma bovis* isolation in the frame of a broad surveillance study. *Journal of Microbiological Methods*, 169, 105805. doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105805
- Anil, S., K. Sweet, V., Joseph, B., & Vikas, B. (2023). Cytotoxicity and Cell Viability Assessment of Biomaterials. In S. Anil & M. A. Mansour (Eds.), *Cytotoxicity - Understanding Cellular Damage and Response*. London: IntechOpen.
- Antonov, A. S., Nikolaeva, M. A., Klueva, T. S., Romanov, Y. A., Babaev, V. R., Bystrevskaya, V. B., . . . Smirnov, V. N. (1986). Primary culture of endothelial cells from atherosclerotic human aorta: Part 1. Identification, morphological and ultrastructural characteristics of two endothelial cell subpopulations.

- Atherosclerosis*, 59(1), 1-19. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9150\(86\)90027-4](https://doi.org/10.1016/0021-9150(86)90027-4)
- Arav, A. (2022). Cryopreservation by Directional Freezing and Vitrification Focusing on Large Tissues and Organs. *Cells*, 11(7), 1072. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/7/1072>
- Bacher, J., Lali, N., Steiner, F., & Jungbauer, A. (2024). Cytokines as fast indicator of infectious virus titer during process development. *Journal of Biotechnology*, 383, 55-63. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.01.016>
- Baid, K., Chiok, K. R., & Banerjee, A. (2024). Median Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀) Assay to Determine Infectivity of Cytopathic Viruses. In A. Thakur (Ed.), *Intracellular Pathogens: Methods and Protocols* (pp. 117-123). New York, NY: Springer US.
- Bastounis, E. E., Radhakrishnan, P., Prinz, C. K., & Theriot, J. A. (2022). Mechanical Forces Govern Interactions of Host Cells with Intracellular Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(2), e00094-00020. doi:[doi:10.1128/mmbr.00094-20](https://doi.org/10.1128/mmbr.00094-20)
- Belete, B. B., Ozkan, J., Kalaiselvan, P., & Willcox, M. (2025). Clinical Potential of Essential Oils: Cytotoxicity, Selectivity Index, and Efficacy for Combating Gram-Positive ESKAPE Pathogens. *Molecules*, 30(19), 3873. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1420-3049/30/19/3873>

- Bennke, C. M., Reintjes, G., Schattenhofer, M., Ellrott, A., Wulf, J., Zeder, M., & Fuchs, B. M. (2016). Modification of a High-Throughput Automatic Microbial Cell Enumeration System for Shipboard Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3289-3296. doi:doi:10.1128/AEM.03931-15
- Bhatt, M., Einstein, C., Kiran, Fayaz, A., Rai, V., Karki, M., . . . Rajak, K. K. (2022). Methods for Quantification of Viruses. In R. Deb, A. K. Yadav, S. Rajkhowa, & Y. S. Malik (Eds.), *Protocols for the Diagnosis of Pig Viral Diseases* (pp. 31-47). New York, NY: Springer US.
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2023). Design and Synthesis of Novel Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, 12(3), 628. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/3/628>
- Bullen, C. K., Davis, S. L., & Looney, M. M. (2022). Quantification of Infectious SARS-CoV-2 by the 50% Tissue Culture Infectious Dose Endpoint Dilution Assay. In J. J. H. Chu, B. A. Ahidjo, & C. K. Mok (Eds.), *SARS-CoV-2: Methods and Protocols* (pp. 131-146). New York, NY: Springer US.
- Campana, M. G., Robles García, N., Rühli, F. J., & Tuross, N. (2014). False positives complicate ancient pathogen identifications using high-throughput shotgun sequencing. *BMC Research Notes*, 7(1), 111. doi:10.1186/1756-0500-7-111
- Carrillo-Ávila, J. A., de la Fuente, A., Aguilar-Quesada, R., Ligeró, G., del Río-Ortiz, J. M., & Catalina, P. (2023). Development and Evaluation of a New qPCR Assay for the Detection of Mycoplasma in Cell Cultures. *Current Issues in Molecular*

- Biology*, 45(8), 6903-6915. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1467-3045/45/8/435>
- Céspedes-Tenorio, D., & Arias-Arias, J. L. (2023). The Virus-Induced Cytopathic Effect. In S. Vijayakrishnan, Y. Jiu, & J. R. Harris (Eds.), *Virus Infected Cells* (pp. 197-210). Cham: Springer International Publishing.
- Chen, R.-H., Zhu, J., Zhang, R.-Z., Wang, S.-Y., & Li, Y. (2020). The tolerance of human epidermal cells to trypsinization in vitro. *Cell and Tissue Banking*, 21(2), 257-264. doi:10.1007/s10561-020-09818-3
- Chen, Y.-W., & Chiang, P.-J. (2024). An automated approach for hemocytometer cell counting based on image-processing method. *Measurement*, 234, 114894. doi:<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2024.114894>
- Dirks, B. P., & Quinlan, J. J. (2014). Development of a modified gentamicin protection assay to investigate the interaction between *Campylobacter jejuni* and *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010. *Experimental Parasitology*, 140, 39-43. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.012>
- Dos Santos, S., Lespinasse, E., Bonnet, B., & Basmaciogullari, S. (2025). Simple, specific, rapid, and pharmacopoeia-compliant qPCR approach for the detection of mycoplasma in biopharmaceuticals. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 33(3). doi:10.1016/j.omtm.2025.101572
- Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination,

- prevention. *Cytotechnology*, 39(2), 75-90.
doi:10.1023/A:1022913015916
- Dsouza, F. P., Dinesh, S., & Sharma, S. (2024). Understanding the intricacies of microbial biofilm formation and its endurance in chronic infections: a key to advancing biofilm-targeted therapeutic strategies. *Archives of Microbiology*, 206(2), 85.
doi:10.1007/s00203-023-03802-7
- Dutka, B. J., Nyholm, N., & Petersen, J. (1983). Comparison of several microbiological toxicity screening tests. *Water Research*, 17(10), 1363-1368. doi:https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90265-8
- Dutta, D., & Clevers, H. (2017). Organoid culture systems to study host–pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology*, 48, 15-22. doi:https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.012
- Fakharian, F., Sadeghi, A., Pouresmaeili, F., Soleimani, N., & Yadegar, A. (2024). Anti-inflammatory effects of extracellular vesicles and cell-free supernatant derived from *Lactobacillus crispatus* strain RIGLD-1 on *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in gastric epithelial cells in vitro. *Folia Microbiologica*, 69(4), 927-939. doi:10.1007/s12223-024-01138-3
- Fernández-Huerta, M., Bodiyaabadu, K., Esperalba, J., Bradshaw, C. S., Serra-Pladevall, J., Garland, S. M., . . . Murray, G. L. (2019). Multicenter Clinical Evaluation of a Novel Multiplex Real-Time PCR (qPCR) Assay for Detection of Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Journal of Clinical*

- Microbiology*, 57(11), 10.1128/jcm.00886-00819.
doi:doi:10.1128/jcm.00886-19
- Flemming, H.-C., van Hullebusch, E. D., Little, B. J., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., . . . Wuertz, S. (2025). Microbial extracellular polymeric substances in the environment, technology and medicine. *Nature Reviews Microbiology*, 23(2), 87-105. doi:10.1038/s41579-024-01098-y
- Gao, M., Zhu, H., Guo, J., Lei, Y., Sun, W., & Lin, H. (2022). Tannic acid through ROS/TNF- α /TNFR 1 antagonizes atrazine induced apoptosis, programmed necrosis and immune dysfunction of grass carp hepatocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 131, 312-322. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.062
- Gao, W., Wu, Z., Zuo, K., Xiang, Q., Zhang, L., Chen, X., . . . Liu, H. (2024). From Biosafety to National Security: The Evolution and Challenges of Biosafety Laboratories. *Laboratories*, 1(3), 158-173. Retrieved from https://www.mdpi.com/2813-8856/1/3/13
- Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., . . . Vias, M. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*, 111(6), 1021-1046. doi:10.1038/bjc.2014.166
- Gimenez-Bastida, J. A., Martinez Carreras, L., Moya-Pérez, A., & Laparra Llopis, J. M. (2018). Pharmacological Efficacy/Toxicity of Drugs: A Comprehensive Update About the Dynamic Interplay of Microbes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(3), 778-784. doi:https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.10.031

- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2001). An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, 25(4), 386-401. doi:<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>
- Goswami, M., Yashwanth, B. S., Trudeau, V., & Lakra, W. S. (2022). Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. *Molecular Biology Reports*, 49(3), 2393-2411. doi:[10.1007/s11033-021-06997-4](https://doi.org/10.1007/s11033-021-06997-4)
- Guo, L., Xi, B., & Lu, L. (2024). Strategies to enhance production of metabolites in microbial co-culture systems. *Bioresource Technology*, 406, 131049. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131049>
- Hamad, M. A., Skeldon, A. M., & Valvano, M. A. (2010). Construction of Aminoglycoside-Sensitive *Burkholderia cenocepacia* Strains for Use in Studies of Intracellular Bacteria with the Gentamicin Protection Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3170-3176. doi:[10.1128/AEM.03024-09](https://doi.org/10.1128/AEM.03024-09)
- Hochdorfer, D., Businger, R., Hotter, D., Seifried, C., & Solzin, J. (2022). Automated, label-free TCID₅₀ assay to determine the infectious titer of virus-based therapeutics. *Journal of Virological Methods*, 299, 114318. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114318>
- Hu, M., Ling, Z., & Ren, X. (2022). Extracellular matrix dynamics: tracking in biological systems and their implications. *Journal of*

Biological Engineering, 16(1), 13. doi:10.1186/s13036-022-00292-x

- Inman, R., Warris, A., & Bignell, E. (2025). A novel pan-fungal screening platform for antifungal drug discovery: proof of principle study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 69(5), e01328-01324. doi:doi:10.1128/aac.01328-24
- Isidan, A., Yenigun, A., Soma, D., Aksu, E., Lopez, K., Park, Y., . . . Ekser, B. (2022). Development and Characterization of Human Primary Cholangiocarcinoma Cell Lines. *The American Journal of Pathology*, 192(9), 1200-1217. doi:https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.05.007
- Jain, A., Gulati, A., Mittal, K. R., & Mani, S. (2023). Cell Culture Laboratory. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 11-52). Cham: Springer International Publishing.
- Jia, S., Diao, Y., Li, Y., Zhang, J., Han, H., Li, G., & Pei, Y. (2024). Microbiological interpretation of weak ultrasound enhanced biological wastewater treatment – using *Escherichia coli* degrading glucose as model system. *Bioresource Technology*, 403, 130873. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130873
- Jiang, Y., Luo, J., Huang, D., Liu, Y., & Li, D.-d. (2022). Machine Learning Advances in Microbiology: A Review of Methods and Applications. *Frontiers in Microbiology*, Volume 13 - 2022. doi:10.3389/fmicb.2022.925454

- Jindal, D., & Singh, M. (2023). Counting of Cells. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 131-145). Cham: Springer International Publishing.
- Jung, S.-Y., Kim, K. H., Kim, J. S., Hwang, B.-H., & Lee, C.-S. (2025). A Co-culture of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in a Monodisperse Droplet to Investigate Microbial Interaction at Defined Microenvironment. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 42(10), 2355-2371. doi:10.1007/s11814-025-00476-3
- Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O., & Kandhavelu, M. (2022). Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*, 27(7), 482-508. doi:10.1007/s10495-022-01735-y
- Karnieli, O., Friedner, O. M., Allickson, J. G., Zhang, N., Jung, S., Fiorentini, D., . . . Karnieli, O. (2017). A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy*, 19(2), 155-169. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.11.011
- Kay, E., & Wren, B. W. (2009). Recent advances in systems microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 577-581. doi:https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.08.007
- Kemper, L., & Hensel, A. (2023). *Campylobacter jejuni*: targeting host cells, adhesion, invasion, and survival. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(9), 2725-2754. doi:10.1007/s00253-023-12456-w

- Kim, J.-H., Chaurasia, A. K., Batool, N., Ko, K. S., & Kim, K. K. (2019). Alternative Enzyme Protection Assay To Overcome the Drawbacks of the Gentamicin Protection Assay for Measuring Entry and Intracellular Survival of Staphylococci. *Infection and Immunity*, 87(5), 10.1128/iai.00119-00119. doi:doi:10.1128/iai.00119-19
- Knap, H., Jaśko, W., Maciak, W., Ślęzak-Prochazka, I., & Kazek-Kęsik, A. (2025). Microbiological and biological analysis of polymer-oxide coatings formed on dental implants enriched with clindamycin. *Materials Chemistry and Physics*, 344, 131059. doi:https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2025.131059
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752(1), 10-24. doi:https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221. doi:https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001
- Kurow, O., Nuwayhid, R., Stock, P., Steinert, M., Langer, S., Krämer, S., & Metelmann, I. B. (2023). Organotypic 3D Co-Culture of Human Pleura as a Novel In Vitro Model of Staphylococcus aureus Infection and Biofilm Development. *Bioengineering*, 10(5), 537. Retrieved from https://www.mdpi.com/2306-5354/10/5/537

- Lagier, J.-C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 208-236. doi:doi:10.1128/cmr.00110-14
- Langdon, S. P. (2004a). Cell Culture Contamination. In S. P. Langdon (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 309-317). Totowa, NJ: Humana Press.
- Langdon, S. P. (2004b). Characterization and Authentication of Cancer Cell Lines. In S. P. Langdon (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 33-42). Totowa, NJ: Humana Press.
- Laposova, K., Oveckova, I., & Tomaskova, J. (2017). A simple method for isolation of cell-associated viral particles from cell culture. *Journal of Virological Methods*, 249, 194-196. doi:https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.014
- Lapsina, S., Riond, B., Hofmann-Lehmann, R., & Stirn, M. (2024). Comparison of Sysmex XN-V body fluid mode and deep-learning-based quantification with manual techniques for total nucleated cell count and differential count for equine bronchoalveolar lavage samples. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 48. doi:10.1186/s12917-024-03884-5
- Larsson, P., & Parris, T. Z. (2023). Optimization of Cell Viability Assays for Drug Sensitivity Screens. In O. Friedrich & D. F. Gilbert (Eds.), *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* (pp. 287-302). New York, NY: Springer US.

- Lavrentieva, A. (2018). Essentials in Cell Culture. In C. Kasper, V. Charwat, & A. Lavrentieva (Eds.), *Cell Culture Technology* (pp. 23-48). Cham: Springer International Publishing.
- Leavell, M. D., Singh, A. H., & Kaufmann-Malaga, B. B. (2020). High-throughput screening for improved microbial cell factories, perspective and promise. *Current Opinion in Biotechnology*, 62, 22-28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.07.002>
- Lee, D. Y., Lee, S. Y., Yun, S. H., Jeong, J. W., Kim, J. H., Kim, H. W., . . . Hur, S. J. (2022). Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Sci Anim Resour*, 42(5), 775-799. doi:10.5851/kosfa.2022.e46
- Lee, J. H., Lee, G.-C., Kim, J. I., Yi, H. A., & Lee, C. H. (2013). Development of a new cell culture-based method and optimized protocol for the detection of enteric viruses. *Journal of Virological Methods*, 191(1), 16-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.03.019>
- Lee, K. W., Shin, J. S., Lee, C. M., Han, H. Y., O, Y., Kim, H. W., & Cho, T. J. (2023). Gut-on-a-Chip for the Analysis of Bacteria–Bacteria Interactions in Gut Microbial Community: What Would Be Needed for Bacterial Co-Culture Study to Explore the Diet–Microbiota Relationship? *Nutrients*, 15(5), 1131. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/5/1131>
- Leonovich, O. (2026). Mycoplasma Contamination of Primary Cell Cultures. In J. Hahne (Ed.), *Cell Culture Technologies - Primary Cell Isolation, Growth and Analysis*. London: IntechOpen.

- Lloréns-Rico, V., Simcock, J. A., Huys, G. R. B., & Raes, J. (2022). Single-cell approaches in human microbiome research. *Cell*, 185(15), 2725-2738. doi:10.1016/j.cell.2022.06.040
- Mani, S. (2023a). Managing Sterility in Animal Cell Culture Laboratory. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 65-75). Cham: Springer International Publishing.
- Mani, S. (2023b). Properties of Cultured Cells and Selection of Culture Media. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 89-97). Cham: Springer International Publishing.
- Mani, S., & Swargiary, G. (2023). In Vitro Cytotoxicity Analysis: MTT/XTT, Trypan Blue Exclusion. In *Animal Cell Culture: Principles and Practice* (pp. 267-284). Cham: Springer International Publishing.
- Mareel, M. M. (1983). Invasion in vitro. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2(2), 201-218. doi:10.1007/BF00048970
- Maure, A., Robino, E., & Van der Henst, C. (2023). The intracellular life of *Acinetobacter baumannii*. *Trends in Microbiology*, 31(12), 1238-1250. doi:10.1016/j.tim.2023.06.007
- Mautner, L., Hoyos, M., Dangel, A., Berger, C., Ehrhardt, A., & Baiker, A. (2022). Replication kinetics and infectivity of SARS-CoV-2 variants of concern in common cell culture models. *Virology Journal*, 19(1), 76. doi:10.1186/s12985-022-01802-5
- Moya, L., Walpole, C., Rae, F., Srinivasan, S., Seim, I., Lai, J., . . . Batra, J. (2023). Characterisation of cell lines derived from prostate cancer patients with localised disease. *Prostate Cancer and*

Prostatic Diseases, 26(3), 614-624. doi:10.1038/s41391-023-00679-x

- Navarro-Forero, S., Dsouza, L., & Yang, Z. (2023). MVA titration by plaque assay using crystal violet staining in DF-1 cells. *One Health Advances*, 1(1), 28. doi:10.1186/s44280-023-00031-x
- Neupane, B., & Bai, F. (2023). Quantification of West Nile Virus by Plaque-Forming Assay. In F. Bai (Ed.), *West Nile Virus: Methods and Protocols* (pp. 9-14). New York, NY: Springer US.
- Ng, Y. L., Mok, C. K., & Chu, J. J. H. (2022). Cytopathic Effect (CPE) (Cytopathic effects (CPE))-Based Drug Screening Assay (Drug screening assay for SARS-CoV-2). In J. J. H. Chu, B. A. Ahidjo, & C. K. Mok (Eds.), *SARS-CoV-2: Methods and Protocols* (pp. 379-391). New York, NY: Springer US.
- Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell J*, 13(4), 203-212.
- Obayori, O. S., & Salam, L. B. (2023). Chapter 10 - Control of bioaerosols, biosafety, and biosecurity. In M. O. Ilori, O. S. Obayori, & L. B. Salam (Eds.), *Aeromicrobiology* (pp. 243-266): Academic Press.
- Onakpoya, I. J., Heneghan, C. J., Spencer, E. A., Brassey, J., Rosca, E. C., Maltoni, S., . . . Jefferson, T. (2022). Viral cultures for assessing fomite transmission of SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hospital Infection*, 130, 63-94. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.09.007

- Onódi, Z., Visnovitz, T., Kiss, B., Hambalkó, S., Koncz, A., Ágg, B., . . . Varga, Z. V. (2022). Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 165, 19-30. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.12.007>
- Parhamifar, L., Andersen, H., & Moghimi, S. M. (2019). Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. In M. Ogris & H. Sami (Eds.), *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery: Methods and Protocols* (pp. 291-299). New York, NY: Springer New York.
- Pasrija, R., & Kumari, D. (2025). Introduction to BSL-2 Facilities. In *Protocols for Studying Pathogenic Fungi* (pp. 1-25). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarençon, D., . . . Multon, E. (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunology*, 5(1), 3. doi:10.1186/1471-2172-5-3
- Petiti, J., Revel, L., & Divieto, C. (2024). Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. *Biosensors*, 14(4), 156. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2079-6374/14/4/156>
- Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R. (2012). Introduction to Cell Culture. In R. R. Mitry & R. D. Hughes

- (Eds.), *Human Cell Culture Protocols* (pp. 1-13). Totowa, NJ: Humana Press.
- Picot, A., Shibasaki, S., Meacock, O. J., & Mitri, S. (2023). Microbial interactions in theory and practice: when are measurements compatible with models? *Current Opinion in Microbiology*, 75, 102354. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102354>
- Price, P. J. (2017). Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 53(8), 673-681. doi:10.1007/s11626-017-0186-6
- Quijada, N. M., Hernández, M., & Rodríguez-Lázaro, D. (2020). Chapter Seven - High-throughput sequencing and food microbiology. In F. Toldrá (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 91, pp. 275-300): Academic Press.
- Ramírez-Flores, C. J., Perdomo, A. M. T., Gallego-López, G. M., & Knoll, L. J. (2022). Transcending Dimensions in Apicomplexan Research: from Two-Dimensional to Three-Dimensional *In Vitro* Cultures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(2), e00025-00022. doi:[doi:10.1128/mmbr.00025-22](https://doi.org/10.1128/mmbr.00025-22)
- Reid, Y. A. (2011). Characterization and Authentication of Cancer Cell Lines: An Overview. In I. A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 35-43). Totowa, NJ: Humana Press.
- Renault, D., Hess, M. C. M., Braschi, J., Cuthbert, R. N., Sperandii, M. G., Bazzichetto, M., . . . Massol, F. (2022). Advancing biological invasion hypothesis testing using functional diversity indices.

- Science of The Total Environment*, 834, 155102.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155102>
- Ripandelli, R. A. A., van Oijen, A. M., & Robinson, A. (2024). Single-Cell Microfluidics: A Primer for Microbiologists. *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(42), 10311-10328.
doi:10.1021/acs.jpcc.4c02746
- Sadanandan, B., Murali Krishna, P., Kumari, M., Vijayalakshmi, V., Nagabhushana, B. M., Vangala, S., . . . Megala, V. (2024). Zinc oxide nanoparticles exhibit anti-cancer activity against human cell lines. *Journal of Molecular Structure*, 1305, 137723.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.137723>
- Sarnaik, A., Liu, A., Nielsen, D., & Varman, A. M. (2020). High-throughput screening for efficient microbial biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 141-150.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.019>
- Satta, E., Nanni, I. M., Contaldo, N., Collina, M., Poveda, J. B., Ramírez, A. S., & Bertaccini, A. (2017). General phytoplasma detection by a q-PCR method using mycoplasma primers. *Molecular and Cellular Probes*, 35, 1-7.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.05.008>
- Schorr, L., Mathies, M., Elinav, E., & Puschhof, J. (2023). Intracellular bacteria in cancer—prospects and debates. *npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 76. doi:10.1038/s41522-023-00446-9
- Sen, R., Nayak, L., & De, R. K. (2016). A review on host–pathogen interactions: classification and prediction. *European Journal of*

- Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(10), 1581-1599. doi:10.1007/s10096-016-2716-7
- Soice, E., & Johnston, J. (2021). Immortalizing Cells for Human Consumption. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11660. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11660>
- Specian, A. F. L., Serpeloni, J. M., Tuttis, K., Ribeiro, D. L., Cilião, H. L., Varanda, E. A., . . . Cólus, I. M. S. (2016). LDH, proliferation curves and cell cycle analysis are the most suitable assays to identify and characterize new phytotherapeutic compounds. *Cytotechnology*, 68(6), 2729-2744. doi:10.1007/s10616-016-9998-6
- Sugihara, H., Yonemitsu, N., Miyabara, S., & Yun, K. (1986). Primary cultures of unilocular fat cells: Characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation*, 31(1), 42-49. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1986.tb00381.x>
- Sun, J. (2017). Intestinal organoid as an in vitro model in studying host-microbial interactions. *Frontiers in Biology*, 12(2), 94-102. doi:10.1007/s11515-017-1444-4
- Temkin, M. I., Carlson, C. M., Stubbendieck, A. L., Currie, C. R., & Stubbendieck, R. M. (2019). High Throughput Co-culture Assays for the Investigation of Microbial Interactions. *J Vis Exp*(152). doi:10.3791/60275
- Thiericke, R. (2003). High-throughput screening technologies. In A. Hillisch & R. Hilgenfeld (Eds.), *Modern Methods of Drug Discovery* (pp. 71-85). Basel: Birkhäuser Basel.

- Thuan, N. H., Tatipamula, V. B., Canh, N. X., & Van Giang, N. (2022). Recent advances in microbial co-culture for production of value-added compounds. *3 Biotech*, *12*(5), 115. doi:10.1007/s13205-022-03177-4
- Tsukamoto, M., Kawasaki, T., Vemuri, M. C., Umezawa, A., & Akutsu, H. (2024). A passage-free, simplified, and scalable novel method for iPSC generation in three-dimensional culture. *Regenerative Therapy*, *27*, 39-47. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reth.2024.02.005>
- Turgeon, D. K., Novicki, T. J., Quick, J., Carlson, L., Miller, P., Ulness, B., . . . Fritsche, T. R. (2003). Six Rapid Tests for Direct Detection of *Clostridium difficile* and Its Toxins in Fecal Samples Compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(2), 667-670. doi:doi:10.1128/jcm.41.2.667-670.2003
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2005). Detection of Mycoplasma Contaminations. In C. D. Helgason & C. L. Miller (Eds.), *Basic Cell Culture Protocols* (pp. 13-23). Totowa, NJ: Humana Press.
- Vaidya, S. R. (2023). Immuno-Colorimetric Neutralization Test: A Surrogate for Widely Used Plaque Reduction Neutralization Tests in Public Health Virology. *Viruses*, *15*(4), 939. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/4/939>
- Van den Driessche, F., Rigole, P., Brackman, G., & Coenye, T. (2014). Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *Journal of Microbiological*

- Methods*, 98, 31-34.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.011>
- Vanden Berghe, T., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N., & Vandenabeele, P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*, 61(2), 117-129.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.02.011>
- Varan, G., & Unal, S. (2023). Three-Dimensional Cell Culture Methods in Infectious Diseases and Vaccine Research. *Future Pharmacology*, 3(1), 48-60. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2673-9879/3/1/4>
- Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., & Ouwehand, A. C. (2005). Measurement of bacterial adhesion—in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60(2), 225-233. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.09.013>
- Voloshin, N., Tyurin-Kuzmin, P., Karagyaur, M., Akopyan, Z., & Kulebyakin, K. (2023). Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12716. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/16/12716>
- Vrtačnik, P., Kos, Š., Bustin, S. A., Marc, J., & Ostanek, B. (2014). Influence of trypsinization and alternative procedures for cell preparation before RNA extraction on RNA integrity. *Analytical Biochemistry*, 463, 38-44.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.06.017>

- Wang, X., Wang, E., & Zhao, G. (2023). Advanced cryopreservation engineering strategies: the critical step to utilize stem cell products. *Cell Regeneration*, 12(1), 28. doi:10.1186/s13619-023-00173-8
- Weiskirchen, S., Schröder, S. K., Buhl, E. M., & Weiskirchen, R. (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*, 12(5), 682. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/5/682>
- Wells, C. A., Guhr, A., Bairoch, A., Chen, Y., Hu, M., Löser, P., . . . Kurtz, A. (2024). Guidelines for managing and using the digital phenotypes of pluripotent stem cell lines. *Stem Cell Reports*, 19(10), 1369-1378. doi:10.1016/j.stemcr.2024.08.009
- Weng, L. (2023). Cell Therapy Drug Product Development: Technical Considerations and Challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(10), 2615-2620. doi:<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.08.001>
- Whitford, W. G., Lundgren, M., & Fairbank, A. (2018). Chapter 8 - Cell Culture Media in Bioprocessing. In G. Jagschies, E. Lindskog, K. Łacki, & P. Galliher (Eds.), *Biopharmaceutical Processing* (pp. 147-162): Elsevier.
- Yao, J., Mei, Y., Yuan, B., Zheng, F., Wang, Z., & Chen, J. (2024). Microbial co-culture mediated by intercellular nanotubes during DMAC degradation: Microbial interaction, communication mode, and degradation mechanism. *Environmental Research*, 241, 117613. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117613>

- Yin, R., Gan, L., Li, S., Zhao, H., Wei, Y., Wang, J., . . . Yu, Y. (2025). Development and validation of universal PCR, basic ERA, and qPCR assays targeting the 16S-23S rRNA intergenic spacer region for Mycoplasma detection. *Microbial Pathogenesis*, 205, 107669. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107669>
- Yin, Y., Xu, L., & Steinway, S. N. (2023). Editorial: 3D organoid and organ-on-a-chip and their applications for virology and antiviral research. *Frontiers in Microbiology, Volume 14 - 2023*. doi:10.3389/fmicb.2023.1266136
- Yu, Y., Zhang, J., & Wu, H. (2024). Optimizing Mouse Primary Lens Epithelial Cell Culture: A Comprehensive Guide to Trypsinization. *J Vis Exp*(208). doi:10.3791/65912
- Yuan, Y., Wang, T., Sims, J., Le, K., Undey, C., & Oruklu, E. (2024). Cytopathic Effect Detection and Clonal Selection using Deep Learning. *Pharmaceutical Research*, 41(8), 1659-1669. doi:10.1007/s11095-024-03749-4
- Zapata-Cardona, M. I., Flórez-Álvarez, L., Gómez-Gallego, D. M., Moncada-Díaz, M. J., Hernandez, J. C., Díaz, F., . . . Zapata, W. (2022). Comparison among plaque assay, tissue culture infectious dose (TCID₅₀) and real-time RT-PCR for SARS-CoV-2 variants quantification. *Iran J Microbiol*, 14(3), 291-299. doi:10.18502/ijm.v14i3.9758
- Zeng, W., Guo, L., Xu, S., Chen, J., & Zhou, J. (2020). High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 38(8), 888-906. doi:10.1016/j.tibtech.2020.01.001

- Zhang, K., Zhang, R., Zhang, Y., Zhang, M., Su, H., Zhao, F., . . . Zhang, Y. (2025). Regulation of LPS-Induced Inflammatory Responses in Bovine Mammary Epithelial Cells via TLR4-Mediated NF- κ B and MAPK Signaling Pathways by Lactoferrin. *Life*, 15(1), 69. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-1729/15/1/69>
- Zhao, S., Li, F., Yang, F., Ma, Q., Liu, L., Huang, Z., . . . Gu, P. (2022). Microbial production of valuable chemicals by modular co-culture strategy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 6. doi:10.1007/s11274-022-03447-6
- Zheng, Y., Liu, W.-H., Yang, B., & Milman Krentsis, I. (2024). Primer on fibroblast growth factor 7 (FGF 7). *Differentiation*, 139, 100801. doi:<https://doi.org/10.1016/j.diff.2024.100801>

