

Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Ayhan ATASEVER¹, Ali Sefa MENDİL², Ali GÜNGÖR^{3*}

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı

³Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, Osmaniye

¹<https://orcid.org/0000-0002-6327-1604>

²<https://orcid.org/0000-0003-2722-3290>

³<https://orcid.org/0009-0008-7985-0986>

*Sorumlu yazar: aligungor@osmaniye.edu.tr

Derleme

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 08.01.2025

Kabul tarihi: 05.02.2025

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler

İmmunohistokimya

İmmunofloresans

Western blot

İn situ hibridizasyon

ÖZ

Bu derleme makale, patoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan moleküler yöntemler hakkında bilgi vermek amacıyla yazılmıştır. İmmunohistokimyasal (IHC) ve immunofloresans (IF) boyama teknikleri, hücrelerde ve dokularda bulunan spesifik proteinleri ve molekülleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. IHC, antijenlerin spesifik antikorlarla etkileşimiyle hücrelerdeki proteinlerin görsel olarak tespit edilmesini sağlar. IF boyama ise benzer şekilde floresan etiketli antikorlar kullanarak proteinlerin yerini belirler. Her iki yöntem de antijen-antikor etkileşimleri sayesinde protein ekspresyonunun belirlenmesine yardımcı olur. Western Blot (WB) yöntemi, hücre ve doku örneklerinden proteinlerin ayrılmasını ve tanımlanmasını sağlar. Bu yöntem, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasına ve ardından hedef proteinelere karşı antikorlarla işaretlenmesine dayanır. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi, DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan temel bir tekniktir. *In Situ* Hibridizasyon (ISH) ise hücrelerdeki nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemlerin her biri, biyolojik örneklerin detaylı incelenmesinde önemli araçlar olarak kullanılır ve hücre analizlerinden genetik incelemelere kadar geniş bir yelpazede uygulama alanı bulur.

Molecular Methods Used in Pathology Laboratories

Reviews

Article History:

Received: 08.01.2025

Accepted: 05.02.2025

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Immunohistochemistry

Immunofluorescence

Western blotting

In situ hybridization

ABSTRACT

This review article is written to provide information about the molecular techniques frequently used in pathology laboratories. Immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) staining techniques are commonly used to detect specific proteins and molecules found in cells and tissues. IHC allows the visual detection of proteins in cells through the interaction of antigens with specific antibodies. Similarly, IF staining uses fluorescently labeled antibodies to determine the location of proteins. Both methods help in identifying protein expression through antigen-antibody interactions. The Western Blot (WB) technique enables the separation and identification of proteins from cell and tissue samples. This method relies on separating proteins according to their molecular weight, followed by labeling the target proteins with antibodies. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a fundamental technique used for DNA amplification. *In Situ* Hybridization (ISH) is a technique that enables the detection of nucleic acid sequences in cells. Each of these methods serves as

Giriş

Moleküler patoloji, gen ifadesini morfolojiyle karşılaştırarak uygulamaya çalışan bir alandır ve çok sayıda hedefin doğruluğunu teyit etmek için gen ifadesi analizlerini kullanır (Sterchi ve Astbury, 2013). Patoloji alanında kullanılan immunohistokimya, *in situ* hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Western blot ve dizileme yöntemleri, moleküler değişikliklerin tespiti için yaygın olarak başvurulan tekniklerdendir (Netto ve ark., 2003; Mahmood ve Yang, 2012; Sarioğlu, 2021). Moleküler patoloji teknikleri; Tüberküloz, HIV, hepatit B gibi birçok bulaşıcı hastalığın tanı ve tedavi rejimlerinin izlenmesinde klinik laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Netterwald, 2006). Bu moleküler teknikler, hastalığın fenotipini değerlendirmeksizin doku analizi ve doğrudan tanıya ulaşmamızı sağlayan güçlü yöntemlerdir. RNA veya DNA düzeyindeki anormallikleri tespit etmeye olanak tanır. Yüksek hassasiyet ve özgüllük özellikleri taşıyan bu teknikler, günümüzde neoplastik hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları ve genetik hastalıkların kimlik tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ergin, 2004).

Bu derlemede, patoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler arasında yer alan immunohistokimyasal ve immunofloresans boyama, Western Blot, PCR ve *in situ* hibridizasyon teknikleri hakkında kapsamlı bilgi sunulması amaçlanmıştır.

1. İmmunohistokimyasal ve İmmunfloresans Boyama

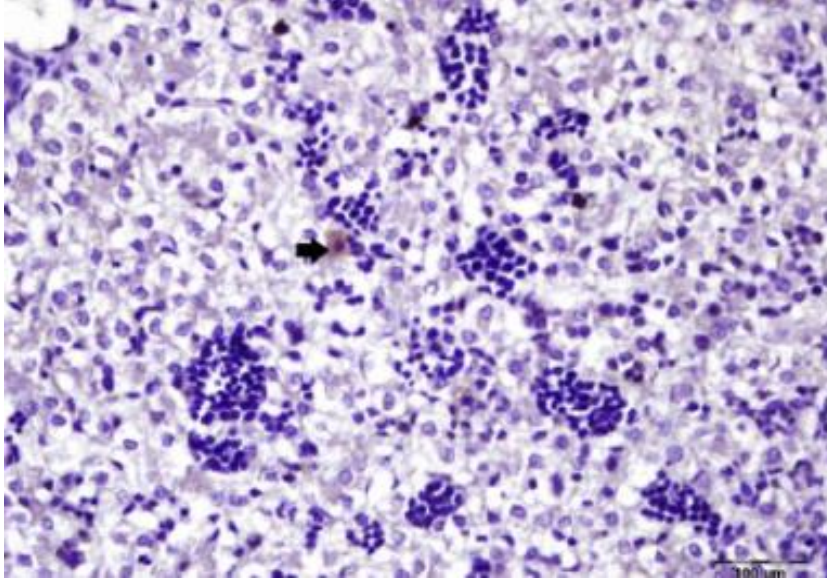
İmmunohistokimyasal (IHC) ve İmmunfloresans (IF) boyama hücrede veya dokuda bulunan bazı endojen ve eksojen maddelerin çeşitli kimyasal yollarla tepkimeye sokularak bulunduğu dokuda görünür hale getirilmesi amacıyla yapılmaktadır (Demir, 2001; Rosai, 2004). Hücre ve dokuda yer alan protein, aminoasit, karbonhidrat, lipid, enzim ve pigmentler bu boyama yöntemiyle histolojik kesitler alınarak gösterilmektedir (Mills, 1992). Bu maddeler dışında IHC ve IF boyamada hücre ve dokuda yer alan antijenik yapıların epitop bölgelerine özgü spesifik antikörlerin bağlanması sonucu hücre ve dokuda görünür hale getirilmesi esasına dayanmaktadır (Korgun, 2001; Weiss ve Görg, 2008).

Hücre ve dokulardan salınan protein ekspresyonunun şiddetini belirlemek ve dokudaki varlığını kanıtlamak için kullanılan güçlü tekniklerdir (Crowe ve Yue, 2019). IHC ve IF boyama teknikleri direkt yöntem ve indirekt yöntem şeklinde uygulanmaktadır. Direkt yöntem hücre ve dokuda bulunan proteinin spesifik primer antikör ile bağlanması sonucu gerçekleşmektedir.

İndirekt yöntemde ise dokuda ekspre edilen antijenin primer antikor ile işaretlendikten sonra sekonder antikor kullanılarak primer antikora bağlanması esasına dayanmaktadır. Direkt yöntem indirekt yöntemle göre daha az duyarlılığa sahip olduğu için indirekt yöntem daha yaygın kullanılmaktadır. Genel olarak hem IHC hem de IF yöntemde indirekt yöntemler kullanılmaktadır (Eugenio, 1998).

1.1. İmmunohistokimyasal (IHC) Boyama Prosedürü

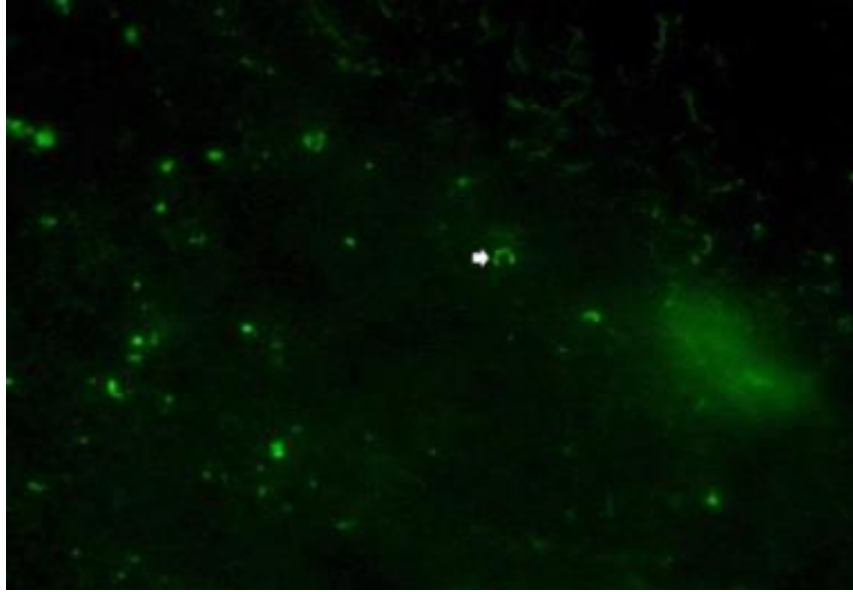
Dokulara deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemi için ksilol-alkol serilerinden geçirilerek distile su ile yıkanır. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesi önlemek için %3'lük Hidrojen Peroksit'de 10 dakika bekletilir. Bu prosedürde dahil olmak üzere her basamaktan sonra Fosfat buffer solüsyonunda (PBS) yıkanır. 10 mM citrate buffer solüsyonunda 10 dakika boyunca mikrodalga fırında kaynatılır. Kesitlerin üzerine bloking solüsyonunun dökülür ve 10 dakika beklenir. Primer antikor ile inkubasyona bırakılır (İnkubasyon süresi üretici firmaya göre değişmektedir). Biotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika inkubasyona bırakılır. Streptavidin antikor ile tekrar 30 dakika inkubasyona bırakılır. DAB substrat+ DAB (Diaminobenzidine) Kromojen solüsyonu ile renklendirme yapılır. Daha sonrasında Hematoksilin ile zıt boyama yapılarak çeşme suyunda yıkama işlemine alınır. Son olarak kesitler alkol-ksilol serilerinden de geçirilerek, etellan damlatılıp mikroskopta altında incelenir (Anonim, 2024b).



Şekil 1. IHC boyama yöntemi ile *T. Gondii*'nin keçi karaciğerinde gösterimi(ok), (100µm), (Özkaraca ve ark., 2016).

1.2. İmmunfloresans (IF) Boyama Prosedürü

Dokulara deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemi için ksilol-alkol serilerinden geçirilerek su ile yıkanır. Kesitler mikrodalga fırında 10 mM sodium citrate buffer (pH 6,0) ile 10 dakika kaynatılır. Distile su ile 5 dakika yıkanır. Kesitler içerisinde %3 H₂O₂'de bulunan metanol'de 15 dakika bekletilir. 5 dakika süreyle 2 kere yıkanır. Kesitler içerisinde %0,4 Triton X-100 (PBS-T) ve %1'lik normal goat serum bulunan PBS ile 10'ar dakika 2 kere yıkanır. %5 normal goat serum bulunan PBS-T ile oda ısısında 30 dk bekletilir. Primer antikor ile inkubasyona bırakılır (İnkubasyon süresi üretici firmaya göre değişmektedir). PBS ile yıkanır. %1 normal goat serum bulunan PBS-T ile 10'ar dakika süreyle 2 kere yıkanır. FITC bağlı bu sekonder antikorlar içerisinde %1 normal goat serum bulunan PBS-T ile uygun oranda dilüe edilerek oda ısısında 1,5 saat inkube edilir. Tekrar %1 normal goat serum bulunan PBS-T ile 10' ar dakika süreyle 2 kere yıkanır. DAPI damlatılarak mikroskopta incelenir (Anonim, 2024a).



Şekil 2. IF boyama yöntemi ile *T. Gondii*'nin koyun dalağında gösterimi(ok), (100µm), (Özkaraca ve ark., 2016).

2. Western Blot (WB) Yöntemi

Western Blot (WB) yöntemi hücre ve ya dokularda meydana gelen yapısal proteinleri belirlemek amacıyla uygulanan yaygın bir yöntemdir (Brianna, 2017). Dokularda yer alan karmaşık proteinlerin belirlenmesi, moleküler ağırlıklarına göre ayrılması, membrana transfer edilmesi ve istenilen primer ve sekonder antikorlarla işaretlenmesi esasına dayanmaktadır (Hubálek, 2009). Bu yöntem dokuda yer alan hedef proteinlerin varlığını, moleküler ağırlığını, karmaşık proteinlerin yapısını ve modifikasyonunu belirlemek için rutin olarak

kullanılmaktadır (Lin ve ark., 1985; Kurien ve Scofield, 2006; Bio-Rad Laboratories, 2011). Western blot yöntemi örneklerin hazırlanması, protein miktar tayini ve denatürasyonu, jel elektroforezi ile proteinlerin yürütülmesi, Proteinlerin membrana transferi ve Blokasyon, Primer ve Sekonder antikorla inkübasyon, görüntüleme ve analiz gibi aşamalardan oluşmaktadır (Sean ve ark., 2013).

2.1. Örneklerin Hazırlanması

Dokudaki proteinleri homojen hale getirebilmek için öncelikle bir doku parçalayıcısı olarak bilinen Tissue Lyser ile dokular küçük parçalara ayrılmaktadır (Angell ve ark., 2004; Wilson ve ark., 2007). Daha küçük parçalara ayrılan dokular hücre ve doku lizisi için RIPA (Radio Immun Precipitation Assay) adı verilen lizis tampon çözeltisinde proteaz inhibitörleri ile birlikte çözünerek örnekler hazırlanmaktadır (Cordwell, 2008; Weiss ve Görg, 2008).

2.2. Protein Miktar Tayini ve Denatürasyonu

Hazırlanan örneklerde protein miktarlarını belirlemek için Bradford veya BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemleri kullanılmaktadır. BCA yöntemi spektrumu daha geniş olması ve Bradford yöntemine göre daha güvenilir sonuç vermesi sebebiyle daha çok tercih edilmektedir. BCA yönteminde örneklerdeki total protein miktarları ölçülmekte ve hesaplanmaktadır (Friedenauer ve Berlet, 1989; Walker, 1994). Protein miktarları hesaplanan örnekler protein denatürasyonunu sağlamak için içerisinde β -merkaptoetanol, gliserol, bromfenol mavisi, Tris-HCl (Trisaminomethane- Hydrochloric acid) ve SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) içeren bir yükleme tampon çözelti hazırlanır ve örneklerdeki proteinler denatüre olarak büyüklüklerine göre ayrılmaktadır (Hnasko ve Hnasko, 2015).

2.3. Jel elektroforezi ile Proteinlerin Yürütülmesi

Western Blot yönteminde jel elektroforezi için PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) yöntemi kullanılmaktadır. PAGE yöntemi yükleme ve yürütme jellerinden meydana gelmektedir. Kit halinde satılan bu jellerin içerisine APS (ammonium Persulfate), TEMED (Tetra Methyl Ethylene Diamine) ve Akrilamid gibi çözeltiler eklenerek polimerizasyon sağlanmaktadır. Oluşan örnekler içerisinde yürütme tampon çözeltisi (Tris+ SDS+ Distile su) bulunan Western Blot jel elektroforez tankına protein belirteciyle (β -actin, β -tubulin veya GAPDH) beraber kuyucuklara yüklenerek belirli sıcaklık, zaman ve voltajda yürütme işlemi gerçekleştirilmektedir. Yürütmedeki amaç negatif yüke sahip olan denatüre

proteinlerin uygulanan pozitif yüklü voltaj sayesinde yavaşlaması ve pozitif yöne doğru ilerlemesi esasına dayanır (Mahmood ve Yang, 2012).

2.4. Proteinlerin Membrana Transferi ve Blokasyon

Blotlama membranı için genellikle Nitroselülöz ve PVDF (Polyvinylidene fluoride) membranlar kullanılmaktadır. Nitroselülöz membranlar hassas ve yırtılmaya daha yatkın oldukları için PVDF membran daha çok tercih edilmektedir. Kullanılan PVDF membran ve filtre kağıtları membrana transfer öncesinde transfer tampon çözeltisi içerisinde (Tris+ Glisin+ Metanol+ Distile su) inkübe edilir. Transfer işlemi yarı-ıslak yöntemle gerçekleştirilmektedir. Jelde yer alan yürütülen proteinler yarı-ıslak transfer sistemi için kullanılan cihaza uygun şekilde (alt kısımda filtre kağıdı, üzerine PVDF membran, membran üzerinde proteinler yürütülen jel ve üst kısımda filtre kağıdı) koyularak belirli süre, sıcaklık ve voltajda transfer işlemi gerçekleştirilmektedir. Transfer işleminden sonra primer antikorun hedef proteine bağlanması için ve nonspesifik bağlanmayı engellemek için blokasyon işlemi uygulanmaktadır. Blokasyon için yağsız süt tozu veya BSA (Bovine Serum Albumin) tercih edilmektedir. Transfer edilen membran daha önceden hazırlanmış PBS-T (Photphate Buffered Saline- Twenn 20), yağsız süt tozu veya BSA ile oluşturulan çözeltide inkübe edilerek blokasyon işlemi gerçekleştirilmektedir (Kurien ve Scofield, 2006).

2.5. Primer ve Sekonder Antikorla İnkübasyon

Primer ve sekonder antikor üretici firmanın önerdiği konsantrasyonda ve uygun dilüsyonda hazırlanmalıdır. İstenilen proteini işaretlemek amacıyla membrana uygun dilüsyonda hazırlanan primer antikor üretici firmanın önerdiği şekilde membranda inkübe edilerek antikorun hedef proteine bağlanması gerçekleştirilmektedir. İnkübasyondan sonra membran PBS ile yıkanır ve primer antikora bağlanması için HRP (Horseradish Peroksidaz) ile konjuge sekonder antikor üretici firmanın önerdiği şekilde inkübe edilmektedir (Sandhu ve ark., 1991; Dubitsky ve ark., 2002; Alegria-Schaffer ve ark., 2009).

2.6. Western Blot Prosedürü

2.6.1. Çözelti ve Tamponların Hazırlanması

a) Lizis Tampon Çözeltisi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM Sodyum Klorür, 1% Nonidet P-40 (NP-40) or 0,1% Triton X-100 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% sodium dodecyl sulphate (SDS) 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, Proteaz İnhibitörü tablet (Roche)

b) Yükleme Tampon Çözeltisi; 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0,004% Bromfeneol mavisi, 0.125 M Tris-HCl, (pH 6,8 olmalı)

ç) Yürütme Tampon Çözeltisi; 25 mM Tris, 190 mM glycine 0,1% SDS

d) Transfer Tampon Çözeltisi; 25 mM Tris, 190 mM glycine, 20% methanol, (80kD ağırlığından daha büyük proteinler için ekstra olarak 0,1%.SDS ilave edilmeli)

e) Twenn-20 ve Tamponlu Tris Tampon Çözeltisi; 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl 0,1% Tween 20

f) Bloklama Tampon Çözeltisi; 3% bovine serum albumin (BSA) in TBST

g) SDS-Jel Tampon Çözeltisi; 20 ml 10% SDS, 12,5 ml 0,5 M Tris HCl, (pH 6,8), 67, 5 ml ultra saf su, 0.8 ml 2-mercaptoethanol

2.6.2. Örneklerin Hazırlanması (Hücre Kültürü)

Hücre kültürü tabağını buza yerleştirin ve hücreleri, buzlu ortamda Tris tamponlu tuz (TBS) ile yıkayın. TBS ortamı uzaklaştırılır ve soğuk RIPA tamponu (100 mM tabak başına 1 ml) eklenir. Yapışan hücreler, soğuk bir plastik hücre kazıyıcı kullanarak tabaktan kazınır ve hücre süspansiyonu, önceden soğutulmuş bir mikrosantrifüj tüpüne yavaşça aktarılır. Tüp, 4°C'de 30 dakika boyunca sabit çalkalamaya bırakılır. 16.000 x g'de 20 dakika santrifüj edilir. Santrifüj tüpü nazikçe çıkarılır ve buz üzerine konulur. Bir protein testi yapmak için küçük bir hacimde (10–20 µl) lizat alınır. Her hücre lizati için protein konsantrasyonu belirlenir. Her numuneden 20 µg alınır ve eşit hacimde 2x Laemmli numune tamponu eklenir. Her hücre lizati, numune tamponunda 95°C'de 5 dakika kaynatılır. 16.000 x g'de 1 dakika mikrosantrifüjde santrifüj edilir.

2.7. Protein Ayırma ve Jel Elektroforezi

Moleküler ağırlık belirteçleri mini (8 x 6,7 cm) veya orta (13,3 x 8,7 cm) ölçekli SDS-PAGE jel kuyucuklarına eşit miktarda protein (20 µg) yüklenir. Jeli, 50 V'da 5 dakika çalıştırın. Çalışmayı yaklaşık 1 saat içinde bitirmek için voltajı 100-150 V'a yükseltin.

2.8. Protein Jelden Membrana Aktarılması

Jel, 10-15 dakika boyunca 1x transfer tamponunda bekletilir. Transfer kaseti monte edilir ve kasette hava kabarcığı kalmadığından emin olunmalıdır. Ayrıca, blot katot üzerinde ve jel anot üzerinde olmalıdır. Kaset, transfer tankına yerleştirilir ve tanka bir buz bloğu konulur. Soğuk odada 10 mA sabit akımda bir gece aktarılır (Alternatif olarak transfer, 30 dakika ile 2

saat arasında 100 V'da yapılabilir, ancak yöntemin farklı boyutlardaki proteinler için optimize edilmesi gerekmektedir).

2.9. Antikor İnkübasyonu

Membranı suyla kısa bir süre durulayın ve transfer kalitesini kontrol etmek için Ponceau S solüsyonuyla boyayın. Ponceau S solüsyonu, TBS-T ile üç kez yıkanarak durulanır. 1 saat boyunca oda sıcaklığında TBS-T içinde %3 BSA kullanarak blokasyon yapılır. Hedef proteine karşı primer antikor çözeltisi, 4°C'de gece boyunca inkübe edilir (Antikorum tutunma olasılığına bağlı olarak oda sıcaklığında 1-3 saat inkübasyon yapılabilir). Blot, 3-5 kez TBS-T ile 5 dakika boyunca yıkanır. HRP-konjuge sekonder antikor çözeltisiyle 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. Blot, 3-5 kez TBS-T ile 5 dakika boyunca yıkanır.

2.10. Görüntüleme ve Veri Analizi

Üreticinin önerilerine göre kemilüminesan substrat, membrana uygulanır. Kemilüminesan sinyalleri, CCD kamera tabanlı bir görüntüleyici tarafından görüntülenir. Hedef proteinlerin bant yoğunluğu, görüntü analiz yazılımı kullanılarak değerlendirilir ve bant yoğunlukları, moleküler ağırlıklarına göre detaylı olarak inceleme altına alınmaktadır (Anonim, 2024c).

3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu yöntemin ismi, DNA Polimeraz enzimi kullanılarak DNA'nın bir parçasını in vitro olarak çoğaltılmasından almaktadır. PCR yönteminde birkaç farklı düzenlemeyle üretilen DNA'nın çoğaltılmış milyonlarca kopyası arasından, istenilen kısma ait DNA parçasının bir ya da birkaç kopyasını elde edilmesi mümkündür (Bottore ve ark., 2003). Bu yöntemde kan, deri, saç, tükürük, virüs, bakteri gibi ajanlar olmak üzere farklı tipteki materyaller DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır. PCR için gerekli olan yeterli miktarda DNA miktarının elde edilmesi ve elde edilen kopya DNA ürünlerinin analiz edilmesi laboratuvar yöntemleri ile sağlanır. Bu nedenle PCR hassas bir yöntemdir (Gabrilyan ve Avashia, 2013). Yöntemin uygulanmasında 'Termal Cycler' cihazı kullanılmaktadır. Termal Cycler belirli bir sıraya sahip DNA içeren örneğinin ısıtılması ve soğutulması üzerine kurulu bir sistemdir. Bu sistem; DNA'nın erime sıcaklığına gelerek, DNA replikasyon enzimleri için ısıtma ve soğutma reaksiyonlarının tekrar tekrar uygulanması, ısıya dayanıklı DNA Polimeraz enzimi, primer dizi ve dNTP (Deoxynucleoside triphosphate) karışımı kullanılmasına dayanır. İşlem sonunda, milyonlarca kopya DNA'nın çoğaltılması sağlanır. Denatürasyon, bağlanma ve uzatma işlemleriyle

istenilen DNA bölgesine bağlanabilen primer ile yeni-kopya DNA iplikler sentezlenmesine devam edilir ve DNA'dan yeni kopyalar üretilir (Sharkey ve ark., 1994; Elizabeth, 2007).

3.1. Konvansiyonel PCR

PCR'ın ilk yöntemi olan konvansiyonel PCR, 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilmiş ve 1994'te Nobel ödülü almıştır (Bruce ve ark., 1999). Yöntem hastalıkların teşhisinden, genetik değişimlere kadar tüm temel biyolojik süreçlerin ortaya konması açısından gerçek anlamda bir devrim yaratmıştır (Spolidorio ve Spolidorio, 2005). Üç aşamayı takip eder. Bunlar;

3.1.1. Denatürasyon

Sıcaklığın yükseltilmesiyle elde edilen iki DNA ipliğinin ayrılması aşamasıdır. İlk periyotta, denatürasyon sıcaklığı olarak adlandırılan 94°C'lik bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Bu sıcaklıkta, replikasyon sırasında matris görevi gören matris DNA denatüre edilir. çift sarmallı DNA, tek sarmallı DNA'ya denatüre edilir.

3.1.2. Hidridizasyon

İkinci aşama hibridizasyondur. Primer hibridizasyon sıcaklığı olarak ta adlandırılan bu aşamada, genellikle 40 ila 70°C arasındaki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Sıcaklığın düşürülmesi, hidrojen bağlarının yeniden oluşmasına ve dolayısıyla tamamlayıcı şeritlerin hibridize olmasına izin verir. Primerler, amplifiye edilecek DNA'yı çevreleyen bölgeleri tamamlayan kısa tek sarmallı diziler, uzun sarmallı matris DNA'dan daha kolay melezenir. Hibridizasyon sıcaklığı ne kadar yüksekse hibridizasyon o kadar seçici, o kadar spesifiktir.

3.1.3. Elongasyon

Üçüncü ve son aşama olan bu kısım, uzama sıcaklığı olarak adlandırılan 72°C'lik bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Tamamlayıcı ipliğin sentezidir. 72°C'de Taq polimeraz, hazırlanmış tek sarmallı DNA'lara bağlanır ve reaksiyon karışımında bulunan Deoksiribonükleosit trifosfatları kullanarak replikasyonu katalize eder. Primerlerin aşağı akışındaki şablon DNA bölgeleri böylece seçici bir şekilde sentezlenir. Bir sonraki döngüde, önceki döngüde sentezlenen fragmanlar sırayla matristir ve birkaç döngüden sonra baskın türler, primerlerin melezenildiği bölgeler arasındaki DNA sekansına karşılık gelir. Analiz edilebilir miktarda DNA'yı (yaklaşık 0,1 µg) sentezlemek 20–40 döngü alır. Her döngü teorik olarak önceki döngüde bulunan DNA miktarını iki katına çıkarır (Pelt ve ark., 2008; Kadri, 2019).

3.2. Konvansiyonel PCR Protokolü

0,2 ml duvar kalınlığındaki PCR tüpleri için 96 kuyucuklu bir plaka soğuk ortama yerleştirilir (PCR reaktiflerinin soğuk ortamda PCR tüplerine eklenmesi, nükleaz aktivitesini ve nonspesifik primer bağlanmalarını önlemeye yardımcı olacaktır).

Steril su, 10X PCR buffer, dNTPs, MgCl₂, primer ve template DNA, 0,2 ml duvar kalınlığındaki PCR tüpleri içerisinde karıştırılır. PCR tüpü içerisine negatif kontrol hariç tüm reagent'ler aktarılır. Ek olarak bilinen bir DNA örneğini içeren diğer bir tüp ise pozitif kontrol olarak kullanılmalıdır. Kullanılacak olan Taq DNA polimeraz % 50 gliserol solüsyonunda muhafaza edilmektedir. Diğer PCR reaktifleri ile 20 kere pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanır. Bu işlem yapılırken kabarcıkların oluşmamasına özen gösterilmelidir. PCR tüpü gerekli program ayarlandıktan sonra, Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek işlem başlatılır.

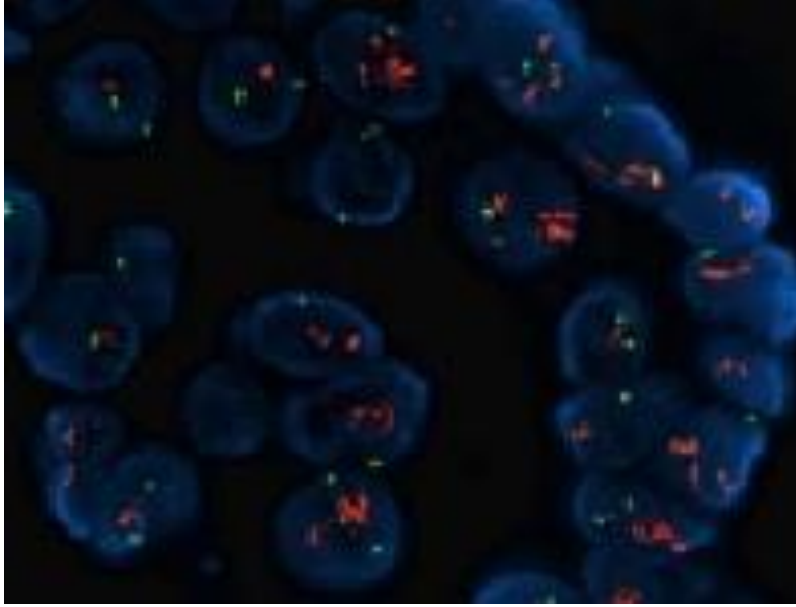
4. *İn Situ* Hibridizasyon (ISH)

İn Situ Hibridizasyon yöntemi hücre ve dokuların içinde yer alan nükleik asit dizilerini ve morfolojisini incelemeye dayanmaktadır. Hücrelerdeki kromozomal evreler, tümoral olgular, kromozom analizleri ve birçok sitogenetik çalışmalar için uzun yıllar bu teknik kullanılmıştır (Moter ve Göbel, 2000). Bu yöntem hücrelerde gen ekspresyonu yapılabilen en yaygın yöntemlerden birisidir. Kullanılan yöntemdeki amaç dışardan sentezlenen bir nükleik asit probunun hücredeki nükleik asit dizilimine mRNA sekansı ile hibridizasyon olayının gerçekleşmesine dayanmaktadır (Wilcox, 1993). Hedef DNA ve RNA sekanslarına doğrudan hibritlendiği için bu yöntem büyük bir avantaj sağlamaktadır (De Bault ve Gu, 2012). Hibritlenen nükleik asit dizilimleri kromojen *in situ* hibridizasyon (CISH) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemleri ile tespit edilmektedir (Jensen, 2014).

4.1. Kromojen *İn Situ* Hibridizasyon ve Floresan *İn Situ* Hibridizasyon

Kromojen *İn Situ* Hibridizasyon yönteminin amacı dokuda yer alan gen tespit edilerek bir kromojen olan digoksinin bağlı bir prob ile hibritlenmesi ve peroksidasyon sağlanmasına dayanmaktadır. Floresan *İn Situ* Hibridizasyon yöntemi ise aynı amacı kapsamaktadır fakat bu yöntemde Floresan bağlı bir prob kullanılmaktadır ve floresan mikroskop gerekmektedir (Fischer ve ark., 2008). CISH yönteminin bir avantajı avidin-biyotin kompleksi kullanıldığı için örneklerin uzun süre saklanabilir ve rutin analizlerde ışık mikroskopunda incelenebilir olmasıdır. FISH yöntemi ise son derece hassas olması ve spesifik olması avantaj sağlamaktadır. Fakat FISH yönteminde floresan ışığına maruz kalması sonucu solması ve uzun süreli

incelenmemesi dezavantaj sağlamaktadır (Cremers ve ark., 1987; Cornelese-ten Velde ve ark., 1989; Robben ve ark., 1994; Kanda ve ark., 1998).



Şekil 3. FISH yöntemi ile meme kanseri tanısı (Kabakçı ve ark., 2016).

4.2. *In Situ* Hibridizasyon Protokolü

Parafin veya dondurulmuş kesitler hazırlanır.

4.2.1. Ön İşlemler

Dondurulmuş kesitler oda sıcaklığında ısıtılır ve 50°C de 15 dakika kurutulur. 2. Parafin kesitleri ise deparafinizasyon (15 dakika boyunca 2 kez ksilen ile muamele) ve rehidrasyon (5 dakika boyunca sırasıyla %100, %95, %90, %80, %70 etanol ve distile su) işlemi yapılır. Not: Eğer dokularda dökülme olursa 60°C de 1-2 saat ısıtılır.

4.2.2. Hibridizasyon

Dokular 20 dakika oda sıcaklığında DEPC-PBS (Diethyl Pyrocarbonate Phosphate-Buffered Saline) içinde %4 lük paraformaldehit ile sabitlenir. 2. Dokular oda sıcaklığında DEPC-PBS ile 5 dakika boyunca yıkanır. Dokular 10µg/ml Proteinaz-K ile 37°C de 8-15 dakika boyunca muamele edilir. Dokular DEPC-PBS içinde oda sıcaklığında yıkanır ve %4 lük paraformaldehit ile tekrar sabitlenir. Dokular ön hibridizasyon solüsyonu içinde 50°C de 3-4 saat hibridizasyon yapılır. Hibridizasyon solüsyonu içinde hibritlenen dokular + Prob

(Digoksinin işaretli prob: 2-4 ng/ul hibridizasyon solüsyonunda) 45°C de 12-16 saat hibritlenir (Eğer FISH yöntemi uygulanırsa Floresan işaretli prob gerekmektedir).

Not: Pre-hibridizasyon, hibridizasyon ve bloke edici solüsyon hacmi dokuyu kaplayacak şekilde olmalıdır. Dokular Immegde Pen ile daire içine alınmalıdır. Buharlaşmayı önlemek için su ile ıslatılmış kağıt havlu kullanılmalıdır.

4.2.3. Yıkama

Dokular 2x SCC ile 45°C de 10 dakika yıkanır. Dokular 1,5x SCC ile 45°C de 10 dakika yıkanır. Dokular iki kez 0,2x SCC ile 37°C de 20 dakika yıkanır. Dokular 1x bloklama solüsyonunda 1 saat inkübe edilir.

4.2.4. Digoksinin'in Antikor ile Bağlanması

Probun hassasiyetine göre dokuları 1: 100 ve ya 1: 1000 oranında seyreltilmiş PBS ile Alkalen fosfataz (AP) -konjuge anti-digoksinin antikor ile 1-4 saat boyunca ya da 4°C de gece boyunca inkübe edilir. Dokular oda sıcaklığında 3 kez 1x PBS ile 10 dakika yıkanır. Dokular oda sıcaklığında 1x Alkalen Fosfotaz tampon çözeltisinde 2 kez 5 dakika boyunca yıkanır. Dokuda yer alan hedef RNA'nın yoğunluğuna göre 1ml 1x Alkalen Fosfotaz tampon çözeltisine 6,6 µl NBT ve 3,3 µl BCIP eklenir ve oda sıcaklığında 2-20 saat arası inkübe edilir. NBT/BCIP (Bromo chloro fosfat indolyl/Nitro mavi tetrazolium)karışımı uzaklaştırılır ve dokular distile su ile yıkanır. Dokulara eğer gerekliyse Zıt boyama yapılır. Dokular kapatılarak mikroskopta incelenir (Anonim, 2024d).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye benzer oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Kaynakça

Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K., 2009. Performing and optimizing western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol*, 463, 573-599.

Angell CM, Wilson JY, Moore MJ, Stegeman JJ., 2004. Cytochrome P4501A1 expression in cetacean integument: Implications for detecting contaminant exposure and effects. *Marine Mammalian Sciences*, 20, 554-566.

Anonim., 2024a. İmmünohistokimyasal boyama yönteminde kullanılan protokol.http://images.novusbio.com/design/IHC_fluorescentFFPE_protocol.pdf. (Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Anonim., 2024b. İmmünohistokimyasal boyama yönteminde protokol. <https://www.biologend.com/en-us/protocols/immunohistochemistry-protocol-for-paraffin-embedded-sections>.(Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Anonim., 2024c. Western blot yönteminde kullanılan çalışma protokolüne ait bilgiler. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6376.pdf. (Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Anonim., 2024d. İn situ hibridizasyon yönteminde kullanılan çalışma protokolü. <https://resources.amsbio.com/Datasheets/K2191050.pdf>. (Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Bio-Rad Laboratories., 2011. Protein blotting guide, interactive pdf. review b, Bulletin 2895.

Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM., 2003. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows, goats, and sheeps milk in dairy products. *International Dairy Journal*, 13, 277-282.

Brianna Kim., 2017. Western blot techniques, molecular profiling: Methods and protocols, methods in molecular biology: Ed. Espina V. 1606.

Bruce A, Bray D, Johnson A, Lewis J, Rass M, Roberts K, Walter P., 1999. *Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula*. porto alegre: Artes Médicas Su.

Cordwell SJ., 2008. Sequential extraction of proteins by chemical reagents. *Methods Mol Biol*, 424, 139-146.

Cornelese-ten Velde I, Wiegant J, Tanke HJ, Ploem JS., 1989. Improved detection and quantification of the immuno peroxidase product using reflection contrast microscopy. *Histochemistry*, 92, 153-160.

Cremers AF, Jansen in de Wal N, Wiegant J, Dirks RW, Weisbeek P, van der Ploeg M, Landegent JE., 1987. Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy. *Histochemistry*, 86(6): 609–615.

Crowe AR, Yue W., 2019. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: An integrated protocol. *Bio-Protocol*, 9(24): e3465.

De Bault LE, Gu J., 1996. In situ hybridization, in situ transcription, and in situ polymerase chain reaction. *Scanning Microscopy, Supplement 10*, 27–47.

Demir R., 2001. *Histokimya ve temel elemanlar. Histolojik Boyama Teknikleri*, Ankara, Palme, 195–225.

Dubitsky A, DeCollibus D, Ortolano GA., 2002. Sensitive fluorescent detection of protein on nylon membranes. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 51, 47–56.

Elizabeth G., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 481-488.

Eugenio S., 1998. *Methods in molecular biology. Mycoplasma protocols. Immunohistochemical staining of fixed tissues*. Humana press inc 999 riverview drive, New Jersey 07512.

Ergin M., 2004. Molecular pathology-moleküler patoloji. *Aegean Pathologist Journal*, 103-107.

Fischer I, de la Cruz C, Rivera AL, Aldape K., 2008. Utility of chromogenic in situ hybridization (cish) for detection of egfr amplification in glioblastoma: Comparison with fluorescence in situ hybridization (fish). *Diagnostic Molecular Pathology*, 17(4): 227-230.

Friedenauer S, Berlet HH., 1989. Sensitivity and variability of the bradford protein assay in the presence of detergents. *Analytical Biochemistry*, 178:263–268.

Gariyban L, Avashia N., 2013. Polymerase chain reaction. *J Investig Dermatol*, 133(3): e6.

Hnasko TS, Hnasko RM., 2015. The western blot. *Methods Mol Biol*, 1318, 87-96.

Hubálek Z., 2009. Epidemiology of lyme bor-reliosis. *Curr Probl Dermatol*, 37, 31-50.

Jensen E., 2014. Technical review: Insituhybridization. *The Anatomical Record*, 297, 1349-1353.

Kabakçı KA, Çapar A, Töreyn BU, Akkoç M, Borazan O, Türkmen İ, Ata LD., 2016. A multi-level thresholding based segmentation method for microscopic fluorescence in situ hybridization (fish) images, 24th Signal Processing and Communication Application Conference, Zonguldak, Turkey, 849-852.

Kadri K., 2019. Polymerase chain reaction (pcr): principle and applications, synthetic biology. *New Interdisciplinary Science*, 14, 237.

Kanda R, Suzuki M, Minamihisamatsu M, Furukawa A, Odaka T, Hayata I., 1998. Non-fluorescent chromosome painting using the peroxidase/diaminobenzidine (dab) reaction. *International Journal of Radiation Biology*, 73, 529-533.

Korgun ET., 2001. İmmünohistokimya uygulamalar ve örnek protokoller, histolojik boyama teknikleri. Editör: Demir R. Sayfalar: 285–305. Ankara, Palme.

Kurien BT, Scofield RH., 2006. Western blotting. *Methods*, 38(4): 283–293.

Lin JC, Choi EI, Pagano JS., 1985. Qualitative and quantitative analyses of Epstein-Barr virus early antigen diffuse component by western blotting enzyme-linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody. *Journal of Virology*, 53(3): 793–799.

Mahmood T, Yang PC., 2012. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medicine and Science*, 4(9): 429-434.

Mills B., 1992. Immunohistochemistry, laboratory methods in histotechnology, armed forces institute of pathology, Ed. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Washington DC, 247–255.

Moter A, Göbel UB., 2000. Fluorescence in situ hybridization (fish) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2): 85–112.

Netterwald J., 2006. Molecular testing? Emerging technologies show promise for helping to prevent spread of the epidemic disease. *Advance for Medical Laboratory Professionals*, 17-18.

Özkaraca M, İrehan B, Parmaksız A, İtik Ekinci A, Çomaklı S., 2016. Koyun ve keçi abortlarında neospora caninum ve toxoplasma gondii' nin dubleks pcr, immunohistokimyasal ve immunfloresans yöntemlerle teşhisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 11(2): 200-206.

Pelt-Verkuil E, Belkum A, John PA., 2008. Brief comparison between in vivo dna replication and in vitro pcr amplification. principles and technical aspects of pcr amplification. Netherlands: Springer, 9-15.

Robben H, Van Dekken H, Poddighe PJ, Vooijs GP., 1994. Identification of aneuploid cells in cytological specimens by combined in situ hybridization and immunocytochemistry. *Cytopathology*, 5, 384-391.

Rosai J., 2004. Special techniques in surgical pathology. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, 37-91.

Sandhu GS, Eckloff BW, Kline BC., 1991. Chemiluminescent substrates increase sensitivity of antigen detection in western blots. *Biotechniques*, 11, 14–16.

Sarioğlu S., 2021. Kanser tanı ve takibinde kullanılan moleküler yöntemler: moleküler patoloji yöntemleri ve biyoinformatik; immünohistokimyasal yöntemler, in situ hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu, yeni nesil dizileme. Aktaş S, Alakavuklar M, editörler, *Klinisyenler İçin Temel Onkoloji*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 45-50.

Sean CT, Thomas B, Geetha YA, Matt H., 2013. A defined methodology for reliable quantification of western blot data. *Mol Biotechnol*, 55i 217–226.

Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG, Atwood SM, Daiss JL., 1994. Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnol*, 12, 506–509.

Spolidorio DMP, Spolidorio LC., 2005. Técnicas básicas de biologia molecular. in: estrela, c. metodologia científica ciência-ensino-pesquisa. São Paulo: Artes Médicas.

Sterchi DL, Astbury C., 2013. Molecular pathology. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 455–491.

Walker JM., 1994. The bicinchoninic acid (bca) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32, 5-8.

Weiss W, Görg A., 2008. Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 424, 35-42.

Wilcox JN., 1993. Fundamental principles of in situ hybridization. *the journal of histochemistry and cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 41(12): 1725-1733.

Wilson JY, Wells R, Aguilar A, Borrell A, Tornero V, Reijnders P, Moore M, Stegeman JJ., 2007. Correlates of cytochrome p450 1a1 expression in bottlenosedolphin integument biopsies. *Toxicological Sciences*, 97(1): 111-119.