



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

HÜCRE DIŞI DNA İZOLASYONLARINDA BELİRLİ PARAMETRELERİN OPTİMİZASYONU

Hacı Mehmet AKBULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ekin ÇELİK

KIRŞEHİR – AĞUSTOS/2024

KABUL VE ONAY

“Hücre dışı DNA izolasyonlarında belirli parametrelerin optimizasyonu” adlı bu çalışma, 28.08.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Ekin Çelik (Danışman)
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Elif Sevim
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Erkan Yurtcu
Kırıkkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

Hacı Mehmet AKBULUT

ÖNSÖZ

Bu çalışmada hücre dışı DNA izolasyonlarında belirli parametrelerin optimizasyonu incelenmiştir. Bu çalışma süresince desteğini sürekli olarak yanımda hissettiğim tez danışmanım Dr. Ekin ÇELİK'e derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yaptığım çalışmalarda beni her zaman destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2024

Hacı Mehmet AKBULUT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. cfDNA'nın Tanımı ve Önemi.....	3
2.1.1. cfDNA Ekstraksiyonunun Zorluğu	3
2.1.2. cfDNA'nın Kanserdeki Yeri	4
2.1.3. Meme Kanseri: Edinilen Tedavi Direnciyle İlgili Genlerin İzlenmesi	4
2.2. Sıvı Biyopsi	4
2.2.1. Sıvı Biyopsi Tanımı Ve Önemi	4
2.2.2. Geleneksel Doku Biyopsisinin Sınırlamaları	6
2.2.3. Kan Biyopsisi	6
2.2.3.1. Dolaşımdaki Tümör DNA'sı	7
2.2.4. Dolaşımdaki Tümör RNA'sı	7
2.2.5. İdrar Biyopsisi	8
2.2.6. Tükürük Biyopsisi	8
2.2.7. Beyin Omurilik Sıvısı	9
2.2.8. Sıvı Biyopsinin Avantajları ve Sınırlılıkları.....	9
2.3. cfDNA İzolasyon Yöntemleri.....	10
2.3.1. cfDNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve İçerikleri	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Malzemelerin Temini:	13
3.2. cfDNA izolasyonu:	14
3.2.1. Yapılan Deney Protokolü.....	14
3.3. Nanodrop Ölçümü:	16

3.4.	Qubit Florometre Ölçümü:	17
3.5.	Bioanalyzer 2100 DNA Fragment Analizi:	17
3.6.	İstatistik Analizleri:	20
4.	BULGULAR	21
4.1.	Elüsyon Tampon Solüsyonları Optimizasyon Sonuçları	22
4.2.	Bağlanma Tampon Solüsyonunun Süre ve Sıcaklık Optimizasyonları Sonuçları 37	
5.	TARTIŞMA SONUÇ	49
	KAYNAKLAR	51

SEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1:Kandan cfDNA'nın serbest bırakılması ve ekstraksiyonu

Şekil 3.1: Nanodrop One ölçüm cihazı (Thermo Scientific, ABD).

Şekil 3.2: Qubit™ 3Fluorometer cihazı (İnvitrogen, ABD).

Şekil 3.3: Bioanalyzer 2100 otomatize elektoroforez cihazı (Agilent, ABD).

Şekil 3.4: Bioanalyzer çip vorteksi (IKA, ABD).

Şekil 3.5: Bioanalyzer çipi (Agilent, ABD).

Şekil 4.1: E pH:10 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.2: TE pH:10 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.3: E pH:4 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.4: TE pH:4 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.5: E pH:5 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.6: TE pH:5 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.7: E pH:6 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.8: TE pH:6 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.9: E pH:7 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.10: TE pH:7 bioanalyzer grafiği

Şekil 4.11: E pH:9 bioanalyzer grafiği

Şekil 4.12: TE pH:9 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.13: TE pH:8 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.14: E pH:8 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.15: Örnek 2:1 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.16: Örnek 3:2 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.17: Örnek 4:3 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.18: Örnek 5:4 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.19: Örnek 6:5 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.20: Örnek 7:6 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.21: Örnek 8:7 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.22: Örnek 9:8 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.23: Örnek 10:9 bioanalyzer grafiği.

Şekil 4.24: Örnek 11:10 bioanalyzer grafiği.

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: İzolasyonlarda kullanılan solüsyonlar ve içerikleri.....	14
Tablo 3.2: Örnek giriş hacmi 1.	14
Tablo 3.3: Örnek giriş hacmi 2.	15
Tablo 4.1: Giriş solüsyonlarının Nanodrop ve Qubit ölçüm dataları.....	21
Tablo 4.2: Farklı elüsyon tampon solüsyonları kullanılarak izole edilmiş cfDNA'ların Nanodrop ölçüm dataları.	23
Tablo 4.3: Farklı elüsyon tampon solüsyonları kullanılarak izole edilmiş cfDNA'ların Qubit ölçüm dataları.....	23
Tablo 4.4: E pH:10 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları	23
Tablo 4.5: TE pH:10 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	24
Tablo 4.6: E pH:4 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	25
Tablo 4.7: TE pH:4 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	26
Tablo 4.8: E pH:5 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	27
Tablo 4.9: TE pH:5 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	28
Tablo 4.10: E pH:6 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	29
Tablo 4.11: TE pH:6 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	30
Tablo 4.12: E pH:7 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	31
Tablo 4.13: TE pH:7 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	32
Tablo 4.14: E pH:9 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	33
Tablo 4.15: TE pH:9 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	34
Tablo 4.16: TE pH:8 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	35

Tablo 4.17: E pH:8 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.	36
Tablo 4.18: Farklı süre ve sıcaklıklarda inkübe edilen bağlanma solüsyonları kullanılarak izolasyon yapılmış cfDNA'ların Nanodrop ölçüm dataları.	37
Tablo 4.19: Farklı süre ve sıcaklıklarda inkübe edilen bağlanma solüsyonları kullanılarak izolasyon yapılmış cfDNA'ların Qubit ölçüm dataları.	38
Tablo 4.20: Örnek 2:1 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	38
Tablo 4.21: Örnek 3:2 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	39
Tablo 4.22: Örnek 4:3 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	40
Tablo 4.23: Örnek 5:4 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	41
Tablo 4.24: Örnek 6:5 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	42
Tablo 4.25: Örnek 7:6 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	43
Tablo 4.26: Örnek 8:7 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	44
Tablo 4.27: Örnek 9:8 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	45
Tablo 4.28: Örnek 10:9 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	46
Tablo 4.29: Örnek 11:10 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.....	47

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
cfDNA	: Dolaşan serbest DNA
ctDNA	: Dolaşımdaki tümör DNA'sı.
miRNA	: MikroRNA
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
Bp	: Baz çifti
ng	: Nanogram
μ l	: Mikrolitre
pmol	: Pikomol
l	: Litre

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜCRE DIŞI DNA İZOLASYONLARINDA BELİRLİ PARAMETRELERİN OPTİMİZASYONU

Hacı Mehmet AKBULUT
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğrt. Üyesi Ekin ÇELİK

Hücre dışı DNA (cfDNA), kan dolaşımında veya diğer vücut sıvılarında bulunan parçalanmış DNA moleküllerini ifade eden serbest DNA anlamına gelmektedir. Başta kanser olmak üzere, çeşitli durumlarda artmakla birlikte, anormal veya normal hücrelerden köken alabilmektedir.

cfDNA'lar, hücrelerin programlanmış hücre ölümü (apoptoz) veya nekrozu sonucunda kan dolaşımına salınan kısa DNA parçalarından oluşmaktadır. Bu kısa DNA parçalarının vücut sıvılarında serbest halde dolaşması cfDNA analizi gerektiren yöntemler için kolayca erişilebilir olmalarını sağlamaktadır.

cfDNA'lar çeşitli tıbbi uygulamalar için girişimsel olmayan bir biyobelirteç olma potansiyeline sahiptir. Kabaca sıvı biyopsi olarak değerlendirilen cfDNA izolasyonları, zor ve riskli olan geleneksel doku biyopsilerine karşı güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. cfDNA analizi, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkları tespit etme ve izleme konusunda ve prenatal testlerdeki kromozomal anomali taramalarında umut vaat etmektedir.

Bu sebeple, izolasyon verimlerinin artırılması önem taşımaktadır. Bu tezde cfDNA izolasyonunun belirli basamakları optimize edilerek, izolasyon verimliliği spektrofotometrik ve florometrik teknikler ve otomatize elektroforez sistemi ile ölçülmüştür.

Ağustos 2024, 69 Sayfa

Anahtar kelimeler: cfDNA, sıvı biyopsi, hücre dışı DNA

SUMMARY

MASTER THESIS OPTIMIZATION OF CERTAIN PARAMETERS IN EXTRACELLULAR DNA ISOLATIONS

Hacı Mehmet AKBULUT
Kırşehir Ahi Evran University
Institute of Health Sciences
Department of Medical Biology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Ekin ÇELİK

Extracellular DNA (ecDNA) refers to fragmented DNA molecules present in the bloodstream or other body fluids, known as cell-free DNA (cfDNA). While cfDNA levels can increase in various conditions, particularly in cancer, they can originate from both abnormal and normal cells. cfDNA consists of short DNA fragments released into the bloodstream as a result of programmed cell death (apoptosis) or necrosis. The free circulation of these short DNA fragments in body fluids makes them easily accessible for methods requiring cfDNA analysis.

cfDNA has the potential to serve as a non-invasive biomarker for various medical applications. cfDNA isolations, roughly considered as liquid biopsies, are regarded as a powerful alternative to traditional tissue biopsies, which are challenging and risky. cfDNA analysis shows promise in detecting and monitoring various diseases, including cancer, as well as in chromosomal anomaly screening in prenatal testing.

Therefore, improving isolation yields is of great importance. In this thesis, specific steps in cfDNA isolation were optimized, and the efficiency of the isolation was measured using spectrophotometric and fluorometric techniques, and automated electrophoresis system.

August 2024, 69 Pages

Key words: cfDNA, liquid biopsy, cell free DNA

1. GİRİŞ

“Hücre Dışı DNA (Cell-Free DNA, cfDNA)” terimi, vücut sıvılarında (kan, idrar, tükürük vb.) bulunan, hücre zarından ayrılmış ve dolaşımında serbestçe gezebilen küçük DNA parçacıkları olarak ifade edilmektedir. Bu parçacıklar apoptotik hücrelerin bozunmasından, stres altındaki hücrelerin DNA salınımından veya kanser hücrelerinden köken alabilmektedir (1).

cfDNA'nın analizi, kromozomal bozukluklar için girişimsel olmayan gebelik dönemi testleri, erken kanser tanısı ve tedavi yanıtının izlenmesi gibi önemli vücut dışı (*invitro*) genetik tanı testlerinde çok değerli bir araç haline gelmiştir.

cfDNA izolasyonunun avantajları aşağıda sıralanmıştır (2):

1. İnvaziv değildir: Doğrudan vücut dokusundan biyopsi veya hastalığın değerlendirilmesi için girişimsel bir işlem gerektirmez.
2. Hızlı ve kolay analiz imkânı sağlamaktadır: cfDNA örnekleri basitçe toplanabilir ve hızla analiz edilebilir örneklerdir.
3. Yüksek hassasiyetle bilgi sağlamaktadır: cfDNA, direkt hücre DNA'sından bilgi sağlamaktadır, hastalıklarda genetik değişikliklerin tespit edilmesinde oldukça duyarlıdır.
4. Kanser teşhisinde kullanılabilir: Kanser hücreleri tarafından salınan serbest DNA, kanser teşhis ve prognozunda önemli bir potansiyel taşımaktadır.
5. Prenatal tanı için kullanılmaktadır: Fetüs gebeliğin belli dönemlerinde anne kanına DNA salmaktadır. Bu cfDNA analizini, fetal genetik hastalıkların ve kromozom anomalilerinin erken tespiti için prenatal tanıda kullanılabilir hale getirmektedir.
6. Tedavi izleme amacıyla kullanılabilir: cfDNA, hastalık tedavisinin etkinliğini izlemek ve hastalık ilerlemesini takip etmek amacıyla değerlendirilebilecek uygun bir araçtır.

cfDNA kullanılarak gerçekleştirilen vücut dışı (*invitro*) genetik tanı testlerinin verimlilikleri ve güvenilirlikleri; izole edilen cfDNA'nın frekansına, miktarına ve doğru test ve analiz teknolojilerinin kullanımına bağlıdır. Bu tezde, cfDNA izolasyonlarının frekans ve veriminin arttırılması için belirli tampon solüsyonların deney protokolü içerisindeki inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile içerikleri optimize edilmiştir. İzolasyon; kabaca cfDNA'nın manyetik küreciklere bağlanması, bu küreciklere bağlanan DNA'nın yıkanması ve kürecikler üzerinden elüsyon ile ayrıştırılması basamaklarından oluşmaktadır. Bu çalışmada, cfDNA'nın manyetik küreciklere bağlanma basamağı süre ve sıcaklık olarak optimize edilmiştir. Tezin ikinci aşamasında ise elüsyon aşamasında kullanılan tampon solüsyon optimize edilerek, farklı pH'lardaki izolasyon verimi kontrol edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. cfDNA'nın Tanımı ve Önemi

cfDNA ilk kez 1948'de Mandel ve Métails tarafından keşfedilmiştir. İlerleyen yıllarla birlikte cfDNA'nın, plazmada ve beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral sıvı, idrar, tükürük ve diğerleri gibi diğer vücut sıvılarında görüldüğü tespit edilmiştir. Önceki çalışmalar, plazma cfDNA moleküllerinin çoğunun sağlıklı bireylerdeki hematopoietik sistemden kaynaklandığını göstermiştir. Ancak hamilelik, organ nakli ve kanser gibi belirli fizyolojik veya patolojik durumlarda ilgili/etkilenen dokular periferik dolaşıma ek DNA salabilir. Bu nedenle, periferik kanda cfDNA'nın tespiti, bireylerdeki anormallikleri girişimsel olmayan bir şekilde tanımlamaktadır. Son yıllarda, girişimsel olmayan doğum öncesi testler, organ naklinin izlenmesi ve bağışıklık hastalıklarının yanı sıra kanserlerin tespit edilmesi için cfDNA analizine dayanan çeşitli teknolojiler ortaya çıkmıştır (3).

2.1.1. cfDNA Ekstraksiyonunun Zorluğu

cfDNA'nın özellikleri cfDNA'yı ekstrakte edilmesi zor bir analit haline getirir. cfDNA ekstraksiyonundaki ana engellerden biri, plazmadaki oldukça düşük konsantrasyonudur (ortalama 30 ng/mL, aralık 1,8–44 ng/mL). Kanser hastalarında ortalama cfDNA konsantrasyonu 180 ng/mL'ye yükselme eğilimindedir, ancak bunun tespit edilmesi hâlâ zordur. ctDNA tümöre genetik bilgi sağlayabilmektedir ancak toplam cfDNA'nın yalnızca %0,01'ini oluşturur. Ayrıca, büyük miktarlarda karışan(interfering) cfDNA, nadir mutant hedeflerin doğru şekilde tespit edilmesini zorlaştırır ve cfDNA kısa (~180 bp) ve parçalanmış olduğundan ve yarılanma ömrü kısa olduğundan (16-150 dk) mümkün olan en kısa sürede saflaştırılmalıdır. Hedef analitlerin herhangi bir kaybı yanlış kanser tanısına yol açabileceğinden, numune hazırlama hatasını azaltmak için sıvı biyopside doğru, kolay ve hızlı bir numune hazırlama yöntemi gereklidir. Ekstraksiyon işlemi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işleminden önce geldiğinden, ekstraksiyon işlemindeki cfDNA'nın geri kazanım oranı, sonraki işlemin hassasiyetini etkileyecektir. Bu nedenle hassas sıvı biyopsisi, hassas cfDNA ekstraksiyonu gerektirir (4, 5, 6).

2.1.2. cfDNA'nın Kanserdeki Yeri

cfDNA kanser yönetiminde önemli bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir. Nükleik asitlere dayalı moleküler teşhisteki teknik ilerlemeler, klinik uygulamalarda hassas ilaçların kullanımını ilerletmiştir. Nükleik asitler arasında, kan dolaşımında serbestçe dolaşan DNA, teşhis, prognoz, tedavi seçimi ve tümör yükünün izlenmesi için yararlı olan, girişimsel olmayan ve gerçek zamanlı bir kanser biyobelirteçtir. Kanda dolaşan tümör DNA'sını (ctDNA) tespit eden sıvı biyopsi, örnekleme yanlılığı, tümör içi heterojenite ve tekrarlı numune ekstraksiyonundaki zorluk gibi sınırlamaların üstesinden gelebilecek doku biyopsisine alternatif olarak araştırılmıştır (4,6).

2.1.3. Meme Kanseri: Edinilen Tedavi Direnciyle İlgili Genlerin İzlenmesi

Antineoplastik tedavi sırasında meme kanseri (BRCA), aromataz inhibitörü (AI) tedavisine direncin altında yatan çoklu mekanizmalardan biri olan östrojen reseptör geninde (ESR1) mutasyonlar kazanır. Bu etkinin bir örneği, metastatik BRCA'lı hastalarda AI tedavilerinden sonra ctDNA'da tanımlanan L536H mutasyonudur. Deneysel çalışmalar, bu mutasyonun ER proteininin ligandtan bağımsız aktivasyonu ile sonuçlandığını gösterdi. Bu bağlamda cfDNA veya ctDNA analizi ile birlikte BRCA hastalarındaki tedaviye dirençli mutasyonları inceleme fırsatı ortaya çıktı. Bu da daha iyi hasta bakımı ve daha uzun yaşam beklentisiyle sonuçlanabilecek bir durum ortaya koydu (1, 5).

2.2. Sıvı Biyopsi

2.2.1. Sıvı Biyopsi Tanımı Ve Önemi

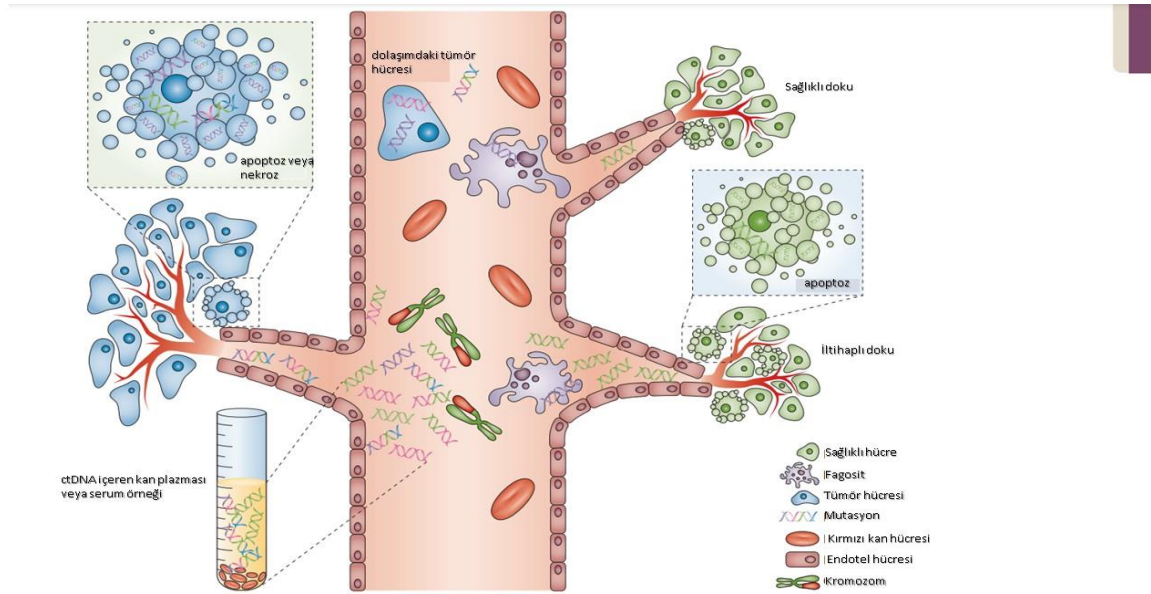
Sıvı biyopsi, kanser tanısı, tedavisi ve izlemi için önemli bir tanı yöntemidir. Geleneksel doku biyopsilerine alternatif olarak kullanılan sıvı biyopsi, vücuttaki sıvılardan elde edilen örneklerin moleküler analizi yoluyla kanser hücrelerinin varlığını ve genetik özelliklerini belirlemeyi amaçlar (7).

Sıvı biyopsi, kanserli hücrelerin veya kansere özgü moleküler belirteçlerin dolaşımdaki sıvı örneklerinde tespit edilmesi ve analiz edilmesi sürecidir. Sıvı biyopsi yöntemleri, kan, idrar, tükürük, beyin omurilik sıvısı gibi farklı vücut sıvılarının kullanılmasını

içerir. Bu örneklerin analizi, kanser hücrelerinin dolaşımdaki varlığını veya kansere özgü genetik mutasyonları tespit etmeyi mümkün kılar (8, 9).

Sıvı biyopsinin önemi, birkaç farklı yönüyle açıklanabilir. İlk olarak, sıvı biyopsi girişimsel olmayan bir yöntemdir. Geleneksel doku biyopsileri, cerrahi müdahale gerektiren girişimsel olan işlemlerdir. Bununla birlikte, sıvı biyopsi yöntemleri, vücuttan kolaylıkla alınabilen sıvı örneklerinin kullanılmasıyla girişimsel olmayan bir tanı seçeneği sunar. Bu, hastalara daha az rahatsızlık verir ve daha güvenli bir prosedürdür (10).

İkinci olarak, sıvı biyopsi yöntemleri kanserin erken tanısını sağlar. Dolaşımdaki kanser hücreleri (CTC'ler), ctDNA, dolaşımdaki tümör RNA'sı (ctRNA) gibi moleküler belirteçlerin analizi, kanserin erken evrelerinde varlığını tespit etmeyi mümkün kılar. Bu da hastaların daha erken tedaviye yönlendirilmesini sağlar ve tedaviye verilen yanıtı takip etmek için kullanılabilir (11, 12).



Şekil 2.1: Kandan cfDNA'nın serbest bırakılması ve ekstraksiyonu (13).

2.2.2. Geleneksel Doku Biyopsisinin Sınırlamaları

Geleneksel doku biyopsisi, uzun bir süredir kanser tanısı ve tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Bununla birlikte, bu yöntemin bazı sınırlamaları vardır ve sıvı biyopsi gibi alternatif yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır (14).

Geleneksel doku biyopsisinin en önemli sınırlamalarından biri girişimsel olmasıdır. Bu yöntem, cerrahi müdahale gerektiren bir prosedürdür ve hastalara bazı riskler taşır. Cerrahi işlemin yapılması için lokal anestezi veya genel anestezi gerekebilir ve ardından cerrahi yara, iyileşme sürecine girebilmektedir(13).

Diğer bir sınırlama ise örnek alınan dokunun temsil ediciliğidir. Geleneksel doku biyopsisinde, örnek alınan dokunun kanserli hücrelerin tamamını temsil etmesi mümkün değildir. Örneğin, tümör heterojenitesi nedeniyle, farklı bölgelerdeki kanser hücrelerinin farklı genetik özelliklere sahip olabileceği görülmüştür (15).

Ayrıca, geleneksel doku biyopsisinin tekrarlanabilirliği sınırlı olabilmektedir. Bazı durumlarda, kanserli lezyonların yerleşimi veya boyutu nedeniyle tekrar biyopsi yapmanın riskli olduğu görülmektedir. Bu durumda, hastaların tedaviye yanıtını veya hastalığın ilerlemesini izlemek için tekrarlanabilir bir örneğe ihtiyaç duyulmaktadır (16).

2.2.3. Kan Biyopsisi

Kan biyopsisi, sıvı biyopsi yöntemlerinden biridir ve kanser tanısı ve takibi için önemli bir araçtır (7). Bu yöntemde, kanda dolaşan tümör hücreleri (CTC'ler) ve ctDNA,ekstrasellüler veziküller (EV'ler) ve mikroRNA'lar gibi kanserle ilişkili molekülleri tespit etmek için kullanılmaktadır.

Kan biyopsisinin bir avantajı, girişimsel olmayan bir yöntem olmasıdır. Kan örneği almak, hastalara minimum rahatsızlık ve risk sağlar (17). Ayrıca, kan örneği alınanın tekrarlanabilirliği yüksektir. Hasta durumunun izlenmesi veya tedaviye yanıtın değerlendirilmesi için periyodik kan örnekleri alınmaktadır (18).

CTC'lerin analizi, kanserli hücrelerin dolaşımında olduğunu ve metastaz riskini göstermektedir. Bu belirteçlerin izlenmesi, hastalığın progresyonunu takip etmek için önemlidir (19). Ayrıca, ctDNA'nın analizi, kanser hücrelerinden gelen genetik değişiklikleri tespit etmek için kullanılır. Bu, tümör heterojenitesi hakkında bilgi

sağlayabilmekte ve tedaviye dirençli veya daha agresif kanser alt tiplerini belirlemeye yardımcı olmaktadır (11).

2.2.3.1. Dolaşımdaki Tümör DNA'sı

Dolaşımdaki tümör DNA'sı, sıvı biyopsi yöntemleri aracılığıyla kanser tanısı,takibi ve tedavi yanıtının değerlendirilmesi için kullanılan önemli bir biyobelirteçtir. ctDNA, tümör hücrelerinin genetik materyalini içeren serbest dolaşan DNA parçacıklarıdır.

ctDNA'nın analizi, kanserin moleküler özelliklerini belirlemek ve genetik değişiklikleri tespit etmek için kullanılır. Bu değişiklikler arasında tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları, onkogen aktivasyonu ve kromozomal anormallikler yer alır (11). ctDNA analizi, özellikle tümör dokusuna ulaşmanın zor olduğu durumlarda, kanser genetik profilini değerlendirmek için girişimsel olmayan bir yöntem olarak önemlidir (18).

ctDNA analizi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (PCR), Yeni Nesil Dizileme (NGS) ve damlacıklı dijital PCR (ddPCR) gibi teknikler yer alır. Bu teknikler, ctDNA'nın mutasyonları, kopya sayısı değişiklikleri ve genetik varyasyonlarını tespit etmek için kullanılmaktadır (20).

ctDNA analizi, kanserin erken tanısı, minimal rezidüel hastalık tespiti, tedavi takibi ve terapötik stratejilerin belirlenmesinde önemli bir rol oynar (21). Ayrıca, ctDNA analizi, tümör heterojenitesini anlamak, ilaç direncini izlemek ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarını geliştirmek için de kullanılmaktadır (7).

2.2.4. Dolaşımdaki Tümör RNA'sı

Dolaşımdaki tümör RNA'sı (ctRNA), sıvı biyopsi yöntemleri kullanılarak kanser tanısı, prognozu ve tedavi yanıtının değerlendirilmesi için incelenen bir biyobelirteçtir. ctRNA, tümör hücrelerinde üretilen ve serbest dolaşan RNA moleküllerini içerir.

ctRNA'nın analizi, kanserin moleküler karakteristiklerini anlamak, gen ifadesi profillerini değerlendirmek ve tümörlerin biyolojik özelliklerini belirlemek için kullanılır. Bu analiz, tümörlerdeki genetik değişiklikleri ve gen ifadesinde meydana gelen değişimleri tespit etmek için çeşitli yöntemler kullanır (22).

ctRNA analizinde kullanılan yöntemler arasında Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve RNA dizileme (RNA sequencing) gibi teknikler bulunur. Bu

yöntemler, ctRNA'nın belirli genlerin ifadesini, alternatif splicing olaylarını veya füzyon genlerini tespit etmek için kullanılır (23).

ctRNA analizi, kanser tanısında, tümör alt tiplerini belirlemede, prognoz değerlendirmesinde ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Ayrıca, ctRNA analizi, tedaviye yanıtı tahmin etmek, ilaç direncini izlemek ve hastaların klinik seyrini takip etmek için potansiyel bir araç olarak da değerlendirilmektedir (24).

2.2.5. İdrar Biyopsisi

İdrar biyopsisi, sıvı biyopsi yöntemleri arasında yer alan girişimsel olmayan bir yaklaşımdır ve idrar örneği kullanılarak kanser tanısı ve takibi için bilgi sağlar. İdrar, vücuttaki birçok sistemden salgılanan maddelerin biriktiği bir sıvıdır ve bu nedenle kanser hücreleri veya tümör belirteçleri gibi kanserle ilişkili bileşenleri içerebilir(25).

İdrar biyopsisi, idrar örneği üzerinde yapılan analizlerle kanser varlığını veya kanserle ilişkili değişiklikleri tespit etmeyi amaçlar. Bu analizler arasında mikroskopi, sitoloji, cfDNA ve mikroRNA (miRNA) analizleri yer alır. Bu yöntemler, idrardaki kanser hücrelerini veya kansere özgü genetik ve moleküler değişiklikleri tespit etmek için kullanılır (26, 27).

2.2.6. Tükürük Biyopsisi

Tükürük biyopsisi, sıvı biyopsi yöntemlerinden biri olarak kullanılan bir girişimsel olmayan yaklaşımdır. Tükürük, ağız ve tükürük bezleri tarafından salgılanan bir sıvıdır ve içerisinde çeşitli moleküler ve hücrel bileşenler bulunur. Bu bileşenler arasında kanser hücreleri, tümör belirteçleri, DNA ve RNA gibi kanserle ilişkili unsurlar da yer almaktadır.

Tükürük biyopsisi, tükürük örneği üzerinde yapılan analizlerle kanser tanısı, prognozu ve tedavi yanıtının değerlendirilmesi için kullanılır. Bu analizler arasında mikroskopi, cfDNA ve miRNA analizleri yer alır. Tükürük biyopsisi, özellikle ağız ve ağız çevresi kanserleri gibi lokal kanserlerin taramasında ve takibinde kullanılan bir yöntemdir (28).

2.2.7. Beyin Omurilik Sıvısı

Beyin omurilik sıvısı (BOS), beyin ve omurilikteki hastalıkların tanısında ve takibinde kullanılan bir sıvı yöntemidir. BOS, beyin ve omurilik çevresinde bulunan bir sıvıdır ve içerisinde beyin ve omurilik dokusundan gelen hücreler, tümör belirteçleri, DNA, RNA ve proteinler gibi çeşitli moleküler bileşenler bulunur.

BOS, genellikle beyin omurilik sıvısının analiz edilmesi ve incelenmesi amacıyla yapılan bir prosedürdür. Bu prosedürde, bir iğne aracılığıyla beyin omurilik sıvısı örneği alınır ve laboratuvar analizlerine tabi tutulur. BOS örneği üzerinde yapılan analizler, kanser hücrelerinin varlığını tespit etmek, tümör belirteçlerini ölçmek ve genetik mutasyonları araştırmak gibi bilgiler sağlanabilmektedir.

BOS, özellikle beyin tümörleri, lenfoma ve sarkom gibi beyin ve omurilikle ilişkili kanserlerin tanısında ve takibinde önemli bir rol oynar (29).

2.2.8. Sıvı Biyopsinin Avantajları ve Sınırlılıkları

Sıvı biyopsi, birçok avantajı beraberinde getiren bir tanı ve takip yöntemidir. Bununla birlikte, bazı sınırlamaları da vardır.

Avantajları:

1. Girişimsel olmayan ve tekrarlanabilir bir yöntem olması: Sıvı biyopsi, girişimsel cerrahi işlemlere gerek duymadan, kan, idrar, tükürük veya diğer vücut sıvılarından örnekler alarak yapılan bir yöntemdir. Ayrıca, bu örneklerin tekrarlanabilirliği, hastaların düzenli olarak takip edilmesini ve tedaviye yanıtın izlenmesini sağlar (30).
2. Erişilebilir örnek kaynağı: Kan, idrar, tükürük gibi sıvılar, sıvı biyopsi için kolayca ulaşılabilen örnek kaynaklarıdır. Bu nedenle, hastalara daha kolay uygulanabilmekte ve örnek alma süreci de hızlanabilmektedir (31).
3. Heterojeniteyi yakalama kabiliyeti: Sıvı biyopsi, tümör hücrelerinin dolaşıma geçtiği erken evrede bile tespit edebilir. Bu sayede tümörlerin heterojenitesi, tümör evrimi ve tedaviye dirençli hücre klonları gibi önemli bilgiler elde edilmektedir (32).

Sınırlılıkları:

1. Düşük moleküler düzeydeki bilgiler: Sıvı biyopsi yöntemleri, genellikle dolaşımdaki tümör hücrelerinin veya tümörle ilişkili moleküler bileşenlerin düşük yoğunluğuna sahiptir. Bu nedenle, bazı durumlarda hassas ve ayrıntılı moleküler analizler için yetersiz kalabilmektedir (11).
2. Heterojenite ve evrimsel değişimlerin kaçırılması: Sıvı biyopsi, tümörlere ait genetik heterojeniteyi ve evrimsel değişimleri tam olarak yansıtmayabilir. Bunun nedeni, dolaşımdaki tümör hücrelerinin veya tümörle ilişkili moleküler bileşenlerin temsiliyetinin sınırlı olmasından kaynaklanır (33).
3. Yüksek teknoloji gereksinimi: Sıvı biyopsi analizleri genellikle karmaşık teknolojilere dayanır. Bu teknolojilerin maliyeti yüksek olduğundan özel laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duyar. Bu da sıvı biyopsinin yaygın olarak kullanılmasını sınırlar (34).

2.3. cfDNA İzolasyon Yöntemleri

cfDNA izolasyonu, genetik materyalin yüksek kalitede ve saf bir şekilde elde edilmesini sağlayan kritik bir adımdır. Çeşitli izolasyon yöntemleri, cfDNA'nın farklı özelliklerine ve uygulama gereksinimlerine göre uyarlanmıştır.

1. Manyetik kürecik Kullanımı

Manyetik kürecikler, cfDNA'nın selektif olarak bağlanmasını sağlayan özel ligandlar veya antikorlarla kaplanmıştır. Kan örneği bu küreciklere eklenir ve ardından manyetik bir alan kullanılarak kürecikler ayrılır. Bu yöntem, yüksek saflık ve verimlilik sağlar ve otomasyona uygundur (35, 36).

2. Santrifüj Yöntemleri

Kan örneği santrifüj edilir ve plazma veya serum ayrılır. cfDNA, bu sıvı fazından izole edilir. Santrifüj yöntemi, basit ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir(14).

3. Kimyasal İzolasyon (Reagent Kits)

Özel reaktifler ve kitler kullanılarak cfDNA'nın ayrılması sağlanır. Bu kitler genellikle saflaştırma ve konsantrasyon aşamalarını içerir ve standartlaştırılmış protokoller sunar (37).

4. Kolon Tabanlı Yöntemler

cfDNA, özel kapalı kolonlar içinde bağlanır ve diğer bileşenlerden ayrılır. Çoğunlukla bir yıkama ve elüsyon aşaması içerir. Bu yöntem, yüksek saflık ve verimlilik sağlar(38).

5. Ultrafiltrasyon Yöntemleri

cfDNA'nın küçük molekülleri, membranlar aracılığıyla ayrılır ve daha büyük moleküller filtrelenir. Bu yöntem, yüksek verimlilik ve çoklu örnek işleme kapasitesi sağlar(39).

2.3.1. cfDNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar ve İçerikleri

cfDNA izolasyonu, kan gibi biyolojik örneklerden DNA parçacıklarının çıkarılması sürecidir. Bu süreçte kullanılan tamponlar, işlemin her aşamasında belirli görevleri yerine getirmek için tasarlanmıştır. cfDNA izolasyonunda yaygın olarak kullanılan tamponlar, içerikleri ve kullanım amaçları:

1)Lizat Tamponu

İçerik:

- Guanidin tiosiyanat: Proteinleri denatüre eder ve hücreleri parçalar.
- Triton X-100 veya SDS: Hücre zarlarını ve nükleer zarları parçalar.
- EDTA(etilendiamintetraasetik asit): DNaz enzimlerini inhibe eder, böylece DNA korunur.
- Tris-HCl: pH dengesini sağlar.

Kullanım Amacı: Hücreleri parçalayarak DNA'nın serbest hale gelmesini sağlar. Lizat tamponu, hücre zarlarını ve nükleer zarları parçalar, proteinleri denatüre eder ve DNA'nın çözeltide kalmasını sağlar (40, 41, 42, 43, 44).

2)Bağlama Tamponu

İçerik:

- Guanidin tiyosiyanat veya diğerk kaotropik tuzlar: Proteinleri ve diğerk organik bileşikleri denatüre eder.
- Etanol veya izopropanol: DNA'nın silika kolona bağlanmasını teşvik eder.

Kullanım Amacı: DNA'nın silika kolona bağlanmasını sağlar. kaotropik tuzlar ve alkol, DNA'nın çözültiden çökmesini ve silika kolona bağlanmasını kolaylaştırır(40,44).

3)Yıkama Tamponu

İçerik:

- Etanol: DNA'yı temizlerken safsızlıkların çözünürlüğünü artırır.
- Tris-HCl: pH dengesini sağlar.
- EDTA: Metal iyonlarını bağlayarak DNaz enzimlerini inhibe eder.

Kullanım Amacı: Bağlanmış DNA'yı yıkayarak proteinleri, tuzları ve diğerk kontaminantları uzaklaştırır. Yıkama tamponları, DNA'nın saflaştırılmasını sağlar ve alkol içeriği DNA'nın kolonda kalmasını sağlar(41,42,43).

4)Elüsyon Tamponu

İçerik:

- Tris-HCl: pH dengesini sağlar.
- EDTA (opsiyonel): DNaz enzimlerini inhibe eder.

Kullanım Amacı: Saflaştırılmış DNA'nın silika kolondan elüe edilmesini (çözeltiye geçirilmesini) sağlar. Elüsyon tamponu, DNA'nın saf bir şekilde toplanmasını sağlar ve downstream uygulamalar için uygun hale getirir(41,42).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Malzemelerin Temini:

İzolasyonlarda kullanılan kit bileşenleri ve içerikleri Tablo 3.1’de verilmiştir (Sigma, ABD). Manyetik mikro küre solüsyonu ZipPrime Biyoteknoloji Ltd.Şti (Eskişehir, Türkiye) tarafından temin edilmiş, izolasyonlar SafeCAP Cell-Free DNA Extraction and Capturing Kit (ZipPrime, Türkiye) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan solüsyonların içerikleri literature göre belirlenmiştir (45, 46, 47, 48). Bağlanma tampon içerisinde kullanılan sodyum iyodür tuzu DNA’yı nötralize ederek, daha yüksek saflıkta, bozunmadan ekstrakte edilmesini sağlamaktadır (49). Sodyum sitrat DNA izolasyonu sırasında magnezyum ve kalsiyum gibi iki değerlikli katyonları şelatlar. Bu katyonlar, DNA’yı parçalayan DNaz enzimlerinin aktivitesi için gereklidir. Sodyum sitrat bu iyonları bağlayarak DNaz enzimlerini inhibe etmektedir, bu sebeple solüsyonda DNA’nın bozulmasını engellemek için kullanılmıştır (50, 51). 2-propanol (isopropanol), DNA’nın çöktürülmesi için kullanılmıştır. Alkol, DNA’nın su ile olan etkileşimini azaltarak çökmesini sağlamaktadır. İzopropanol, etanol gibi diğer alkollere göre daha hızlı çöktürme sağlamakta ve daha düşük hacimlerde yüksek etkinlik göstermektedir (52). Elde edilen DNA’nın olabildiğince saf elde edilmesi, iyi yıkama protokolüne bağlıdır. Yıkama solüsyonlarında kullanılan etanol, DNA çöktürme ve yıkama işlemleri sırasında çözeltide bulunan tuzların, proteinlerin ve diğer organik moleküllerin uzaklaştırılmasında etkilidir. Ayrıca etanol, diğer alkollere kıyasla çok daha kolay buharlaşmaktadır. Bu yüzden yıkama işlemi sonrasında kolayca uzaklaştırılır ve geride saf DNA bırakır. Bu sebeple, DNA’nın konsantrasyonunu ve kalitesini artırmak üzere yıkama solüsyonlarında kullanılmıştır (53). Elüsyon solüsyonu olarak DNA’yı çözebilecek bir tampon ihtiyaç duyulmaktadır. İzolasyonlarda genellikle kolay ulaşılabilir ve yüksek saflığa sahip olması sebebiyle su; ve DNA’nın uzun süre stabil ve bozulmadan saklanmasını sağladığı için Tris-EDTA tamponları tercih edilmektedir(53). Bu tezde de su ve Tris-EDTA (TE) tampon solüsyonları farklı pH’larda denenerek optimize edilmiştir. pH’lar NaCl (Sigma, ABD) ve HCl (Sigma,

ABD) solüsyonlarıyla ayarlanmıştır. Tezin ikinci kısmında ise bağlanma solüsyonları ile örnek inkübasyonunun süresi ve sıcaklığı optimize edilmiştir.

Tablo 3.1: İzolasyonlarda kullanılan solüsyonlar ve içerikleri.

No	Solüsyonlar	İçerik (%)
1	Bağlanma tampon solüsyonu	Sodyum iyodür tuzu; 8-20 Sodyum sitrat; 0.2-1.5 2-Propanol; 50-70
2	Yıkama tampon solüsyonu 1	Sodyum iyodür tuzu; 5-10 Ethanol; 78-90%
3	Yıkama tampon solüsyonu 2	Ethanol; 70-80%
4	Elüsyon tampon solüsyonu	1x Tris-EDTA, pH:4-10 DNAz/RNAz içermeyen su, pH:4-10

3.2. cfDNA izolasyonu:

Giriş solüsyonları, ticari olarak temin edilmiş referans cfDNA lar 1ml DNAz/RNAz içermeyen su içerisine spike edilerek elde edilmiştir (0,370 ng/ μ l). İzolasyonlar için aşağıdaki protokol izlenmiştir:

3.2.1. Yapılan Deney Protokolü

Tablo 3.2: Örnek giriş hacmi 1.

	Örnek giriş hacmi
Kit bileşeni	1 ml
Bağlayıcı tampon I	1.5 ml
Bağlayıcı tampon II	0.75 ml
Manyetik küre solüsyon	15 μ l

- Manyetik kürecik çözeltisi vortekslenerek homojen hale getirildi.
- Falcon tüplerine belirtilen miktarlarda solüsyonlar eklendi. Kısa bir süre vortekslendi.
- Hazır cfDNA barındıran mikrosantrifüj tüpleri vortekslenip 15mL'lik steril tüpe eklendi ve inkübasyona alındı.
- İnkübasyon süresi tamamlanan örnekler 15 ml'lik falcon uyumlu manyetik rafa alındı ve manyetik küreciklerin tüp duvarına çekilmesi beklendi. (yaklaşık 2-3 dk)

- Süpernatantın tamamı mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Manyetik raftan alınan tüpe 800 µl YıkamaTamponu I eklendi ve tüp duvarındaki manyetik kürecikler mikropipet yardımıyla homojenize edilip 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi.
- 1.5 ml'lik tüplere aktarılan küreciklerin süspansiyonu kısaca vortekslenip termal çalkalayıcıda 25 °C'da 1400 rpm'de 1 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi tamamlanan örnekler 1.5 ml uyumlu manyetik rafa alındı ve küreciklerin mikrosantrifüj tüp duvarına çekilmesi beklendi.(yaklaşık 1 dakika)
- Kürecikler çekildikten sonra süpernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Ardından tüplere 800 µl YıkamaTamponu II eklendi. Tüp duvarındaki kürecikler mikropipet yardımıyla homojenize edildi ve termal çalkalayıcıda 25 °C'da 1400 rpm'de 1 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon tamamlandıktan sonra tüpler manyetik rafa alındı ve küreciklerin tüp duvarına çekilmesi beklendi.(yaklaşık 1 dakika)
- Süpernatantın tamamı mikropipet ile uzaklaştırıldı ve tüpler kapağı açık şekilde 5 dakika boyunca kurutuldu.

Tablo 3.3: Örnek giriş hacmi 2.

	Örnek giriş hacmi
Kit bileşeni	1 ml
Elüsyontamponu	15 µl

- Tüp manyetik raftan alındı ve üzerine 15 µl elüsyon tamponu eklendi. Küreciklerintüp duvarından dibine doğru mikropipet ile indirilmesi sağlandı.
- Tüp termal çalkalayıcıda 25°C'da 1400 rpm'de 3 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi tamamlanan tüpler manyetik rafa alındı ve küreciklerin tüp duvarına çekilmesi beklendi.(yaklaşık 1 dakika)
- cfDNA içeren süpernatant yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

3.3. Nanodrop Ölçümü:

- Cihazın temiz olduğundan emin olunup herhangi bir kalıntı olmadığı kontrol edildi.
- Kullanacağımız örnek ve boş çözelti hazırlandı.
- Cihaz açılıp ana ekranda uygun uygulama seçildi. (örneğin, dsDNA, ssDNA veya Nükleik Asit).
- Numune tipine uygun pedestali kullanıldı.
- Pedestal üzerindeki numune ölçüm bölgesine örnek veya boş çözülden bir damla yerleştirildi.
- Cihaz kolu indirilip "Blank" tuşuna basarak boş ölçümü yapıldı.
- Aynı prosedürü kullanarak örnek yerleştirildi ve "Measure" tuşuna basarak ölçüm alındı.
- Ölçüm tamamlandığında, sonuçlar kaydedildi.



Şekil 3.1: Nanodrop One ölçüm cihazı (Thermo Scientific, ABD).

3.4. Qubit Florometre Ölçümü:

- Qubit Çalışma Solüsyonu hazırlandı: Her 199 µl tampon için 1 µl Qubit boya eklenmiştir. Her örnek veya standart için 200 µl 'lik toplam hacim elde edildi.
- Her test tüpüne 190 µl Qubit Çalışma Solüsyonu eklendi.
- 10 µL standart veya 198µl çalışma solüsyonu ve 2µl örnek eklendi.
- Tüpler karıştırıldı ve 2 dakika boyunca inkübe edildi.
- Örnek tüpü cihaza yerleştirildi ve kapağı kapatıldı.
- "Read tube" (Tüpü Oku) düğmesine basarak ölçüm başlatıldı.
- Ölçüm tamamlandıktan sonra tüp çıkarıldı, data kaydedildive bir sonraki tüp ölçümüne geçildi.



Şekil 3.2: Qubit™ 3Fluorometer cihazı (İnvitrogen, ABD).

3.5. Bioanalyzer 2100 DNA Fragment Analizi:

Deneyler *Agilent High Sensitivity DNA kit* (Agilent, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

- Mavi kapaklı *High Sensitivity DNA* boya konsantresi (mavi tüp) ve kırmızı kapaklı *High Sensitivity DNA* jel matrisi (kırmızı tüp) 30 dakika oda sıcaklığına getirildi.

- Mavi kapaklı tüp 10 saniye vortekslenildi ve ardından santrifüjlenerek DMSO tamamen çözüldü.
- 15 µl mavi kapaklı boya konsantresi kırmızı kapaklı jel matris tüpüne pipetlendi. Boyalı karışım 4°C'de karanlıkta saklandı.
- Karışım bir *spin* filtreye aktarıldı ve oda sıcaklığında 2240 g ± 20 % da 10 dakika santrifüjlendi.
- Gel-dye karışımı 30 dakika oda sıcaklığına getirildi. Işıktan tutmamaya özen gösterildi.
- Yeni bir *High Sensitivity* DNA çipi ambalajından çıkarılıp çip priming istasyonuna yerleştirildi.
- Çipteki işaretli bölgeye 9.0 µl gel-dye karışımı pipetlenmiştir.
- Zamanlayıcı 60 saniye ayarlandı, pistonun 1 ml konumunda olduğundan emin olunduktan sonra çip *priming* istasyonu kapatıldı. Pistonun 0.3 ml işaretine geri dönmesi beklendi ve sonra piston 1 ml konumuna geri çekildi.
- 5 µl yeşil kapaklı *High Sensitivity* DNA *marker*'ın *ladder* simgeli bölgeye ve her bir numune kuyusuna pipetlendi.
- Sarı kapaklı *High Sensitivity* DNA *ladder* vialinden 1 µl alınıp *ladder* simgeli bölgeye pipetlendi.
- Her bir numune kuyusuna 1 µl numune pipetlendi.
- Çip vorteks mikserine yatay olarak yerleştirildi ve 60 saniye 2400 rpm hızında vortekslenildi.
- *Agilent 2100 Bioanalyzer* cihazına çip yerleştirildi ve *Chip selector*'ı (1) konumuna getirildi.
- 2100 Expert yazılımında uygun test seçilerek örnek bilgileri girildi ve ölçüm başlatıldı.
- Çip koşusu tamamlandıktan sonra çip cihazdan çıkarıldı ve datalar kaydedildi.



Şekil 3.3: Bioanalyzer 2100 otomatize elektoroforez cihazı (Agilent, ABD).



Şekil 3.4: Bioanalyzer çip vortexi (IKA, ABD).



Şekil 3.5: Bioanalizer çipi (Agilent, ABD).

3.6. İstatistik Analizleri:

İstatistik analizleri GraphPad Prism v.10.1 programı (ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Mann-Whitney U ve Kruskal- Wallis testleri kullanılmıştır. Ölçümler 3 tekrar çalışılmıştır.

4. BULGULAR

Giriş solüsyonları, ticari olarak temin edilmiş referans cfDNAlar 1ml DNAz/RNAz içermeyen su içerisine spike edilerek elde edilmiştir. Giriş solüsyonlarının da nanodrop, qubit ve bioanalyzer sonuçları Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1: Giriş solüsyonlarının Nanodrop ve Qubit ölçüm dataları.

	Nanodrop Konsantrasyon (ng/µl)	A230/260	A260/280	Qubit (ng/µl)
Giriş solüsyonu (1ml)	1.8	0.87	0.53	0.370

Bu tezde cfDNA izolasyonunda kullanılan elüsyon ve bağlanma tampon solüsyonları optimize edilmiştir. Elüsyon tampon solüsyonu olarak su (*E* ile gösterilmiştir) ve Tris-EDTA (*TE* şeklinde gösterilmiştir) tampon solüsyonlarının farklı pHları denenmiştir. pH değerleri HCl ve NaOH solüsyonları kullanılarak ayarlanmıştır. İzolasyonlarda kullanılan tampon çözeltiler; su pH:10; TE tamponu pH:10; su pH:9; TE tamponu pH:9; su pH:8; TE tamponu pH:8; su pH:7; TE tamponu pH:7; su pH:6; TE tamponu pH:6; su pH:5; TE tamponu pH:5; su pH:4; TE tamponu pH:4 şeklinde sıralanmıştır.

Bağlanma solüsyonu ise süre ve sıcaklık olarak optimize edilmiştir. Uygulanan protokol örnek numaralarına göre aşağıda sıralanmıştır:

1. Deneysel: Bağlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
2. Deneysel: Bağlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Deneysel: Bağlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Deneysel: Bağlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
5. Deneysel: Bağlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 10 dakika 30°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

6. Deneý: Baęlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 15 dakika 30°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.
7. Deneý: Baęlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 20 dakika 30°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.
8. Deneý: Baęlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş girişsolüsyonu) karıştırıldıktan sonra 10 dakika 35°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.
9. Deneý: Baęlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 15 dakika 35°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.
10. Deneý: Baęlanma solüsyonu giriş örneğiyle (referans cfDNA spike edilmiş giriş solüsyonu) karıştırıldıktan sonra 20 dakika 35°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

İzolasyonların hepsi 3 teknik tekrar olarak çalışılmış, standart sapma değerleri buna göre hesaplanmıştır. Her bir izolasyondan sonra elde edilen cfDNA miktarları öncelikle Nanodrop cihazı, ardından Qubit florometresi, en son olarak da Bioanalyzer Otomatize Elektroforez cihazı kullanılarak ölçölmüştür.

4.1. Elüsyon Tampon Solüsyonları Optimizasyon Sonuçları

Elüsyon tampon solüsyonlarının optimizasyonları sonucu elde edilen Nanodrop ve Qubit ölçüm sonuçları Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de verilmiştir. Nanodrop, Qubit ve Bioanalyzer 2100 ölçümleri 15 µl izolatlardan gerçekleştirilmiştir. Tabloda TE tamponu TE olarak, su ise E olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Farklı elüsyon tampon solüsyonları kullanılarak izole edilmiş cfDNA'ların Nanodrop ölçüm dataları.

Örnek ismi(Elution B.)	Konsantrasyon (ng/µl)	A230/260
E-1 pH:10	40,0± 2,8	0.90
TE-2 pH:10	43,3± 1,3	0.91
E-3 pH:4	45,4± 1,3	0.79
TE-4 pH:4	42,3± 1,6	0.88
E-5 pH:5	42,8± 1,5	0.87
TE-6 pH:5	43,8± 1,8	0.89
E-7 pH:6	40,6± 2,3	1..21
TE-8 pH:6	31,8± 4,5	1.17
E-9 pH:7	29,9± 5,6	1.20
TE-10 pH:7	33,9± 4,7	1.03
E-11 pH:9	29,3± 6,6	1.17
TE-12 pH:9	29,6± 5,8	0.93
E pH:8	30,4± 7,7	0.97
TE pH:8	41,8± 3,7	0.75

Tablo 4.3: Farklı elüsyon tampon solüsyonları kullanılarak izole edilmiş cfDNA'ların Qubit ölçüm dataları.

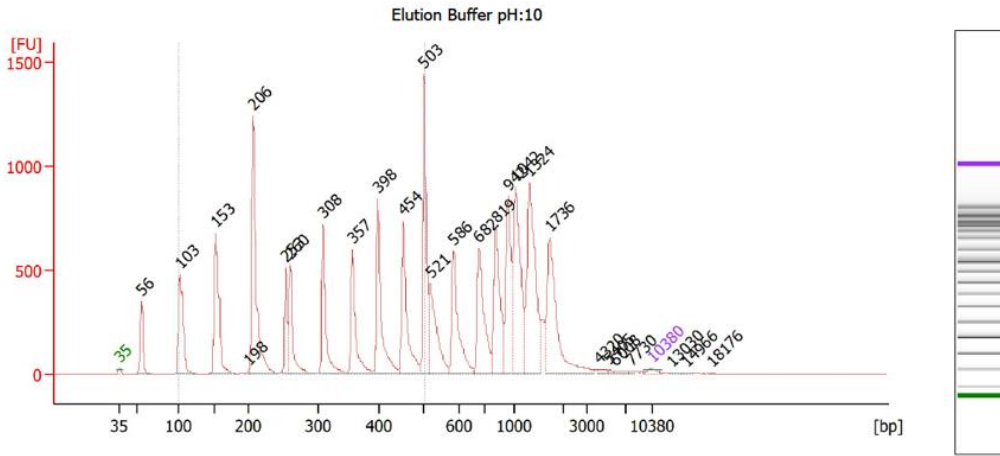
Örnek ismi(Elution B.)	A260/280	Qubit (ng/µl) (Elution B.)
E-1 pH:10	0.06	19,1± 0,6
TE-2 pH:10	0.06	22,7± 1,1
E-3 pH:4	0.06	19,4± 0,6
TE-4 pH:4	0.05	20,0± 1,0
E-5 pH:5	0.06	16,8± 2,6
TE-6 pH:5	0.05	20,7± 3,6
E-7 pH:6	0.08	21,7± 2,1
TE-8 pH:6	0.08	19,3± 0,9
E-9 pH:7	0.08	15,8± 5,6
TE-10 pH:7	0.06	14,9± 3,9
E-11 pH:9	0.08	18,7± 2,4
TE-12 pH:9	0.09	13,8± 6,1
E pH:8	0.06	13,1± 5,7
TE pH:8	0.05	13,7± 4,6

E pH:10 bioanalizer sonuçları aşağıdaki Tablo 4.4'de ve şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4: E pH:10 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1351,60	36434,1
3	103	2617,16	38646,6
4	153	3163,15	31367,3
5	198	36,06	275,3
Kons. [pg/µl] toplam		7292,97	

Electropherogram Summary



Overall Results for sample 1 : Elution Buffer pH:10

Number of peaks found: 27 Corr. Area 1: 7,051.4
Noise: 0.5

Peak table for sample 1 : Elution Buffer pH:10

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	1,351.60	36,434.1	
3	103	2,617.16	38,646.6	
4	153	3,163.15	31,367.3	
5	198	36.06	275.3	
6	206	4,699.01	34,592.8	
7	253	997.17	5,975.9	
8	260	1,506.84	8,793.9	
9	308	1,846.39	9,093.5	
10	357	1,585.96	6,738.2	
11	398	2,177.71	8,281.9	
12	454	1,968.92	6,565.1	
13	503	2,460.46	7,416.2	
14	521	1,556.68	4,531.4	
15	586	1,660.99	4,292.8	
16	682	1,728.31	3,840.8	
17	819	1,724.23	3,188.3	
18	942	1,568.22	2,523.4	
19	1,042	2,316.06	3,368.0	
20	1,324	2,579.66	2,951.1	
21	1,736	2,045.63	1,785.3	
22	4,320	54.20	19.0	
23	5,405	22.75	6.4	
24	6,008	54.38	13.7	
25	7,730	16.92	3.3	
26	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

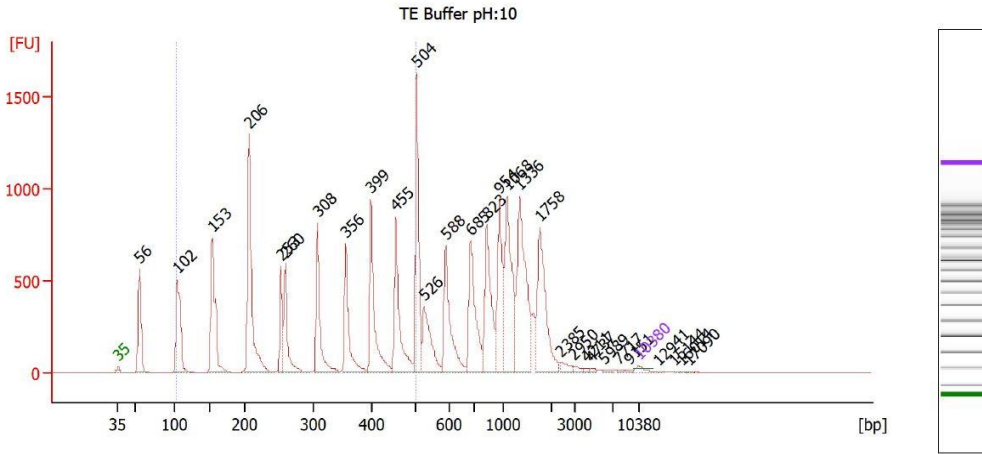
Şekil 4.1: E pH:10 bioanalizer grafiği.

TE pH:10 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.5’da ve şekil 4.2’da gösterilmiştir.

Tablo 4.5: TE pH:10 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1714,75	46109,8
3	102	2089,58	30890,7
4	153	2498,98	24757,2
Kons. [pg/μl] toplam		6428,31	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 2 : **TE Buffer pH:10**

Number of peaks found: 30 Corr. Area 1: 7,133.6
 Noise: 0.9

Peak table for sample 2 : **TE Buffer pH:10**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	1,714.75	46,109.8	
3	102	2,089.58	30,890.7	
4	153	2,498.98	24,757.2	
5	206	3,655.94	26,857.9	
6	253	853.46	5,101.1	
7	260	1,190.89	6,946.3	
8	308	1,503.34	7,393.3	
9	356	1,310.16	5,576.1	
10	399	1,774.60	6,744.5	
11	455	1,636.97	5,450.5	
12	504	2,128.66	6,401.7	
13	526	1,050.95	3,026.1	
14	588	1,419.09	3,657.8	
15	685	1,487.10	3,291.7	
16	823	1,492.05	2,746.4	
17	954	1,255.26	1,993.7	
18	1,068	1,832.63	2,599.9	
19	1,336	2,145.04	2,433.1	
20	1,758	1,610.99	1,388.7	
21	2,385	119.12	75.7	
22	2,950	60.37	31.0	
23	4,211	24.84	8.9	
24	4,737	28.49	9.1	
25	5,989	36.47	9.2	
26	7,717	19.25	3.8	

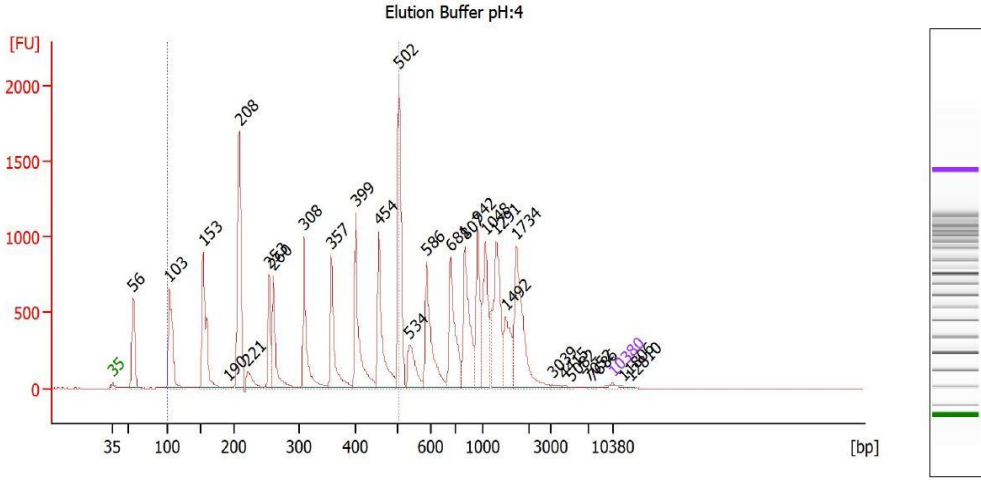
Şekil 4.2: TE pH:10 bioanalyzer grafiği.

E pH:4 bioanalyzer sonuçları aşağıdaki tablo 4.6'da ve şekil 4.3'da gösterilmiştir (Şekil 4.3).

Tablo 4.6: E pH:4 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	2316,05	62438,6
3	103	3436,85	50629,0
4	153	3961,68	39187,7
5	190	28,39	226,2
Kons. [pg/μl] toplam		9867,97	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 3 : **Elution Buffer pH:4**

Number of peaks found: 29 Corr. Area 1: 9,146.6
Noise: 0.6

Peak table for sample 3 : **Elution Buffer pH:4**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	2,316.05	62,438.6	
3	103	3,436.85	50,629.0	
4	153	3,961.68	39,187.7	
5	190	28.39	226.2	
6	208	5,562.01	40,594.3	
7	221	611.08	4,198.7	
8	253	1,368.92	8,185.1	
9	260	2,012.48	11,734.0	
10	308	2,435.42	11,985.1	
11	357	2,134.30	9,067.7	
12	399	2,688.44	10,201.9	
13	454	2,534.58	8,458.7	
14	502	3,919.06	11,826.8	
15	534	1,072.95	3,041.9	
16	586	2,272.79	5,872.3	
17	681	2,303.42	5,125.5	
18	807	2,355.91	4,423.9	
19	942	1,608.22	2,587.3	
20	1,048	1,812.00	2,619.2	
21	1,291	2,327.86	2,732.2	
22	1,492	1,104.39	1,121.7	
23	1,734	2,691.50	2,351.2	
24	3,039	53.99	26.9	
25	4,415	23.24	8.0	
26	5,082	14.89	4.4	

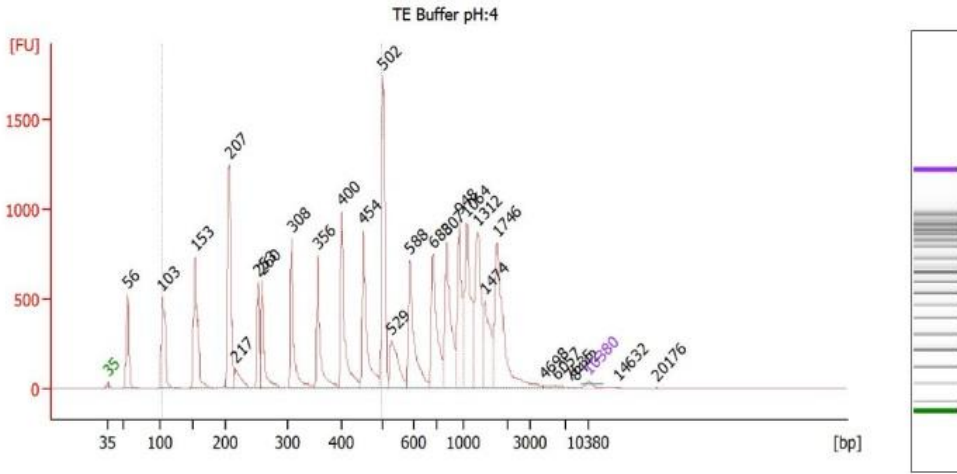
Şekil 4.3: E pH:4 bioanalizer grafiği.

TE pH:4 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.7'da ve şekil 4.4'da gösterilmiştir (Şekil 4.4).

Tablo 10 TE pH:4 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1514,46	40830,7
3	103	1973,58	29118,7
4	153	2340,50	23120,9
Kons. [pg/µl] toplam		5953,54	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 4 : **TE Buffer pH:4**

Number of peaks found: 27 Corr. Area 1: 6,792.0
Noise: 0.6

Peak table for sample 4 : **TE Buffer pH:4**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	1,514.46	40,830.7	
3	103	1,973.58	29,118.7	
4	153	2,340.50	23,120.9	
5	207	3,003.63	21,980.7	
6	217	466.96	3,257.2	
7	253	800.46	4,791.7	
8	260	1,173.87	6,849.0	
9	308	1,459.99	7,181.9	
10	356	1,269.51	5,398.7	
11	400	1,656.11	6,277.2	
12	454	1,565.73	5,227.8	
13	502	2,238.09	6,758.3	
14	529	849.50	2,433.9	
15	588	1,405.32	3,623.2	
16	683	1,435.34	3,184.6	
17	807	1,531.56	2,877.2	
18	948	1,166.19	1,863.6	
19	1,064	1,555.57	2,214.5	
20	1,312	1,508.66	1,742.8	
21	1,474	853.52	877.6	
22	1,746	1,802.07	1,563.4	
23	4,698	41.98	13.5	
24	6,057	26.16	6.5	
25	7,635	10.37	2.1	
26	8,442	10.33	1.9	

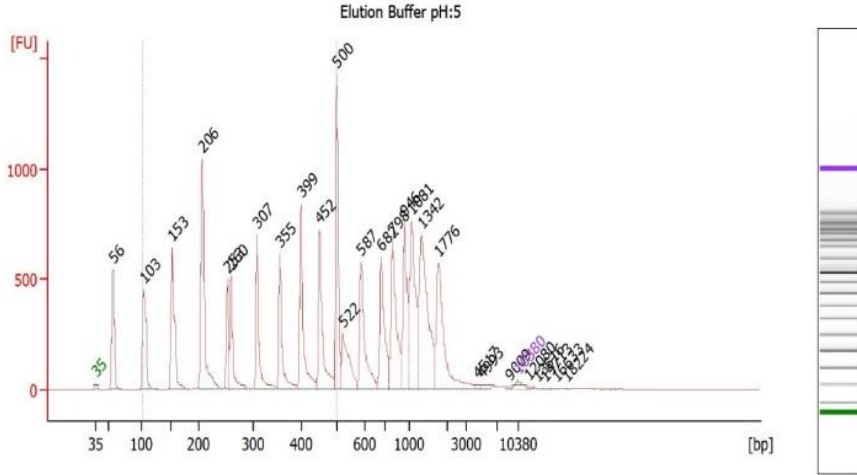
Şekil 4.4: TE pH:4 bioanalizer grafiği.

E pH:5 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.8’da ve şekil 4.5’da gösterilmiştir (Şekil 4.5).

Tablo 11E pH:5 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1590,30	42877,9
3	103	1728,36	25395,2
4	153	2030,75	20112,1
Kons. [pg/μl] toplam		5474,41	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 5 : **Elution Buffer pH:5**

Number of peaks found: 27 Corr. Area 1: 6,235.3
Noise: 0.5

Peak table for sample 5 : **Elution Buffer pH:5**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	1,590.30	42,877.9	
3	103	1,728.36	25,395.2	
4	153	2,030.75	20,112.1	
5	206	2,951.92	21,662.4	
6	253	694.36	4,161.6	
7	260	962.85	5,621.6	
8	307	1,216.84	5,996.9	
9	355	1,047.44	4,467.5	
10	399	1,353.83	5,143.4	
11	452	1,278.51	4,288.9	
12	500	1,718.26	5,204.4	
13	522	807.41	2,344.4	
14	587	1,111.23	2,870.3	
15	682	1,090.09	2,423.1	
16	798	1,271.70	2,415.6	
17	946	1,035.92	1,658.8	
18	1,081	1,322.12	1,853.0	
19	1,342	1,856.82	2,096.8	
20	1,776	1,275.58	1,088.1	
21	4,517	24.00	8.1	
22	4,993	46.01	14.0	
23	9,009	17.90	3.0	
24	10,380	75.00	10.9	Upper Marker
25	12,080	0.00	0.0	
26	13,616	0.00	0.0	

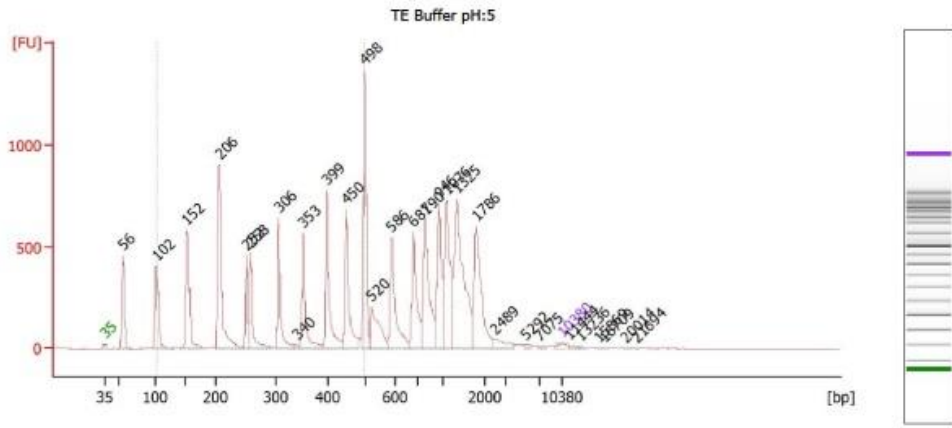
Şekil 4.5: E pH:5 bioanalizer grafiği.

TE pH:5 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.9'da ve şekil 4.6'da gösterilmiştir (Şekil 4.6).

Tablo 12 TE pH:5 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1909,19	51921,0
3	102	2210,35	32676,9
4	152	2617,65	26060,4
Kons. [pg/µl] toplam		6862,19	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 6 : **TE Buffer pH:5**

Number of peaks found: 29 Corr. Area 1: 5,227.1
Noise: 0.7

Peak table for sample 6 : **TE Buffer pH:5**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	1,909.19	51,921.0	
3	102	2,210.35	32,676.9	
4	152	2,617.65	26,060.4	
5	206	3,873.62	28,465.7	
6	252	911.22	5,486.8	
7	258	1,264.91	7,414.7	
8	306	1,542.12	7,636.8	
9	340	56.19	250.1	
10	353	1,398.10	5,995.4	
11	399	1,775.42	6,737.5	
12	450	1,632.32	5,501.9	
13	498	2,400.83	7,303.2	
14	520	1,059.17	3,088.3	
15	586	1,510.15	3,906.1	
16	681	1,450.70	3,228.1	
17	790	1,788.71	3,429.7	
18	946	1,425.50	2,282.6	
19	1,076	1,762.57	2,481.4	
20	1,325	2,680.85	3,066.3	
21	1,786	1,666.12	1,413.4	
22	2,489	209.35	127.5	
23	5,292	37.30	10.7	
24	7,075	33.62	7.2	
25	10,380	75.00	10.9	Upper Marker
26	11,444	0.00	0.0	

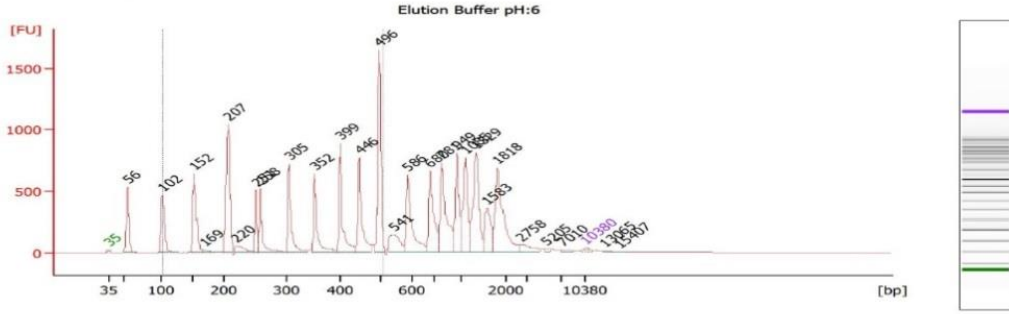
Şekil 4.6: TE pH:5 bioanalizer grafiği.

E pH:6 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.10'da ve şekil 4.7'da gösterilmiştir (Şekil 4.7).

Tablo 13E pH:6 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	2038,71	55456,4
3	102	2221,05	32892,0
4	152	2427,61	24137,5
5	169	117,93	1055,7
Kons. [pg/μl] toplam		6930,30	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 7 : Elution Buffer pH:6
 Number of peaks found: 27 Corr. Area 1: 6,780.6
 Noise: 0.6

Peak table for sample 7 : Elution Buffer pH:6

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	
2	56	2,038.71	55,456.4	Lower Marker
3	102	2,221.05	32,892.0	
4	152	2,427.61	24,137.5	
5	169	117.93	1,055.7	
6	207	3,721.30	27,259.9	
7	220	448.20	3,093.3	
8	251	961.79	5,799.3	
9	258	1,313.78	7,707.4	
10	305	1,595.44	7,936.3	
11	352	1,458.83	6,276.3	
12	399	1,735.50	6,590.0	
13	446	1,626.95	5,524.2	
14	496	3,028.95	9,257.0	
15	541	784.74	2,198.3	
16	586	1,631.28	4,218.9	
17	680	1,480.26	3,300.5	
18	781	1,872.97	3,635.2	
19	949	1,163.36	1,858.1	
20	1,085	1,411.25	1,971.0	
21	1,329	1,711.16	1,950.6	
22	1,583	788.01	754.4	
23	1,818	1,825.41	1,521.5	
24	2,758	257.60	141.5	
25	5,205	41.38	12.0	
26	7,010	64.68	14.0	

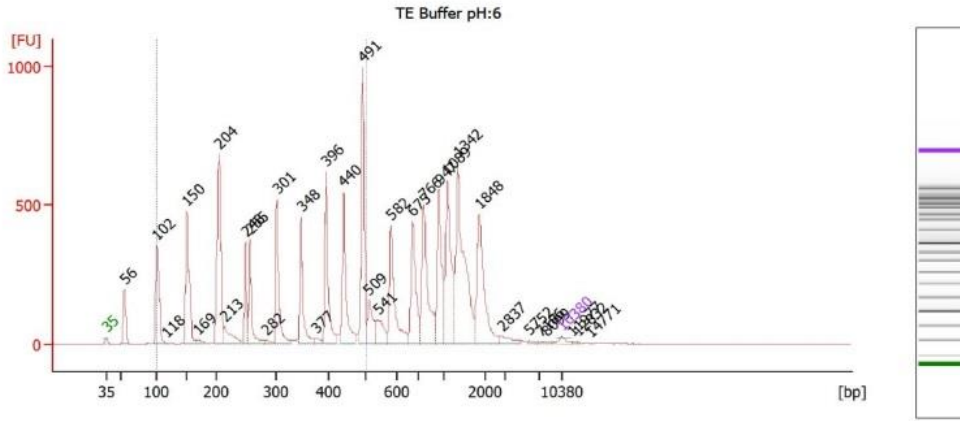
Şekil 4.7: E pH:6 bioanalizer grafiği.

TE pH:6 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.11’da ve şekil 4.8’da gösterilmiştir (Şekil 4.8).

Tablo 14 TE pH:6 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	986,67	26859,8
3	102	2155,59	32160,3
4	118	45,70	588,8
5	150	2457,37	24774,0
6	169	142,34	1276,2
Kons. [pg/µl] toplam		5912,67	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 8 : **TE Buffer pH:6**

Number of peaks found: 32 Corr. Area 1: 4,752.7
Noise: 0.4

Peak table for sample 8 : **TE Buffer pH:6**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	986.67	26,859.8	
3	102	2,155.59	32,160.3	
4	118	45.70	588.8	
5	150	2,457.37	24,774.0	
6	169	142.34	1,276.2	
7	204	3,319.27	24,655.2	
8	213	556.77	3,963.2	
9	248	909.87	5,550.9	
10	255	1,191.24	7,069.0	
11	282	83.19	447.1	
12	301	1,500.34	7,549.4	
13	348	1,270.58	5,533.8	
14	377	90.29	362.8	
15	396	1,573.63	6,019.1	
16	440	1,554.31	5,349.3	
17	491	2,280.45	7,041.6	
18	509	534.13	1,588.5	
19	541	488.58	1,369.2	
20	582	1,433.76	3,733.9	
21	675	1,285.63	2,883.9	
22	766	1,757.42	3,477.8	
23	947	1,345.66	2,153.9	
24	1,089	1,723.27	2,396.8	
25	1,342	2,613.89	2,950.4	
26	1,848	1,561.92	1,280.4	

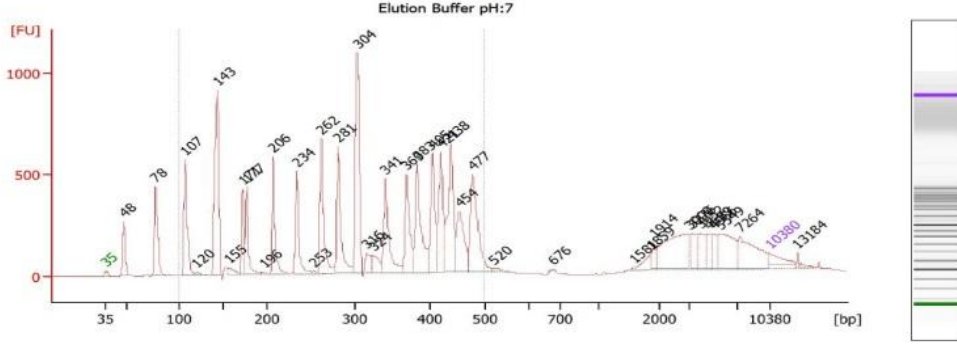
Şekil 4.8: TE pH:6 bioanalizer grafiği

E pH:7 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.12'da ve şekil 4.9'da gösterilmiştir (Şekil 4.9).

Tablo 15E pH:7 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	48	286,41	9074,7
3	78	522,32	10210,2
4	107	598,75	8499,3
5	120	23,34	295,2
6	143	1049,39	11121,6
7	155	60,79	593,3
8	171	246,17	2175,9
9	177	320,00	2746,6
10	196	8,23	63,7
Kons. [pg/μl] toplam		3240,4	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 9 : Elution Buffer pH:7

Number of peaks found: 38 Corr. Area 1: 9,590.5
Noise: 0.4

Peak table for sample 9 : Elution Buffer pH:7

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	48	286.41	9,074.7	
3	78	522.32	10,210.2	
4	107	598.75	8,499.3	
5	120	23.34	295.2	
6	143	1,049.39	11,121.6	
7	155	60.79	593.3	
8	171	246.17	2,175.9	
9	177	320.00	2,746.6	
10	196	8.23	63.7	
11	206	390.56	2,866.5	
12	234	346.33	2,245.3	
13	253	10.21	61.1	
14	262	433.29	2,507.2	
15	281	423.61	2,281.5	
16	304	721.70	3,597.9	
17	316	86.05	412.1	
18	324	103.84	485.0	
19	341	378.75	1,683.6	
20	369	332.77	1,365.3	
21	383	433.40	1,713.3	
22	405	338.51	1,266.2	
23	421	335.26	1,207.8	
24	438	463.12	1,601.5	
25	454	275.84	921.2	
26	477	453.85	1,440.7	

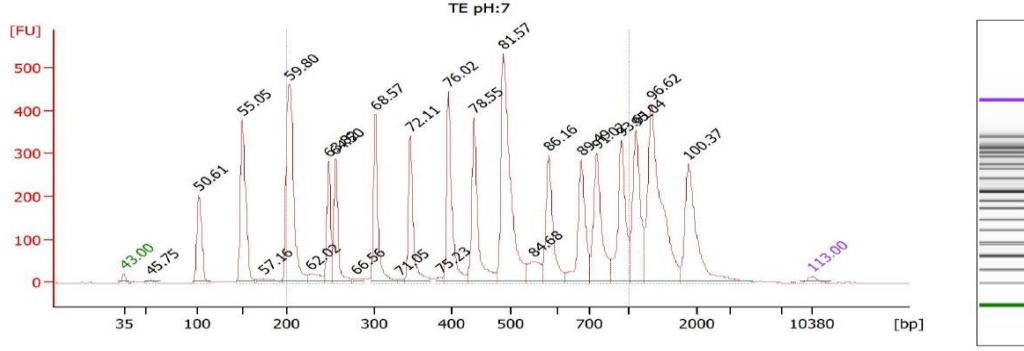
Şekil 4.9: E pH:7 bioanalizer grafiği.

TE pH:7 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.13'da ve şekil 4.10'da gösterilmiştir (Şekil 4.10).

Tablo 16 TE pH:7 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	55	84,25	2312,0
3	102	2022,75	30113,6
4	150	3373,64	34047,3
5	174	218,53	1906,9
Kons. [pg/µl] toplam		5824,17	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 2 : TE pH:Z

Number of peaks found: 24 Corr. Area 1: 4.363,4
 Noise: 0,3

Peak table for sample 2 : TE pH:Z

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	55	84,25	2.312,0	
3	102	2.022,75	30.113,6	
4	150	3.373,64	34.047,3	
5	174	218,53	1.906,9	
6	203	4.939,14	36.855,2	
7	228	348,00	2.312,6	
8	248	1.303,16	7.955,7	
9	256	1.550,55	9.180,4	
10	279	118,23	641,9	
11	302	2.028,86	10.184,9	
12	333	62,43	284,1	
13	346	1.718,18	7.517,7	
14	385	74,66	293,5	
15	395	2.117,81	8.115,2	
16	436	2.115,73	7.348,9	
17	486	4.021,43	12.525,5	
18	550	497,35	1.370,8	
19	582	1.570,28	4.090,5	
20	676	1.575,55	3.533,5	
21	754	1.721,17	3.459,2	
22	945	1.623,30	2.604,0	
23	1.098	1.645,80	2.270,1	
24	1.330	3.154,72	3.593,0	
25	1.879	1.767,59	1.425,3	
26	10.380	75,00	10,9	Upper Marker

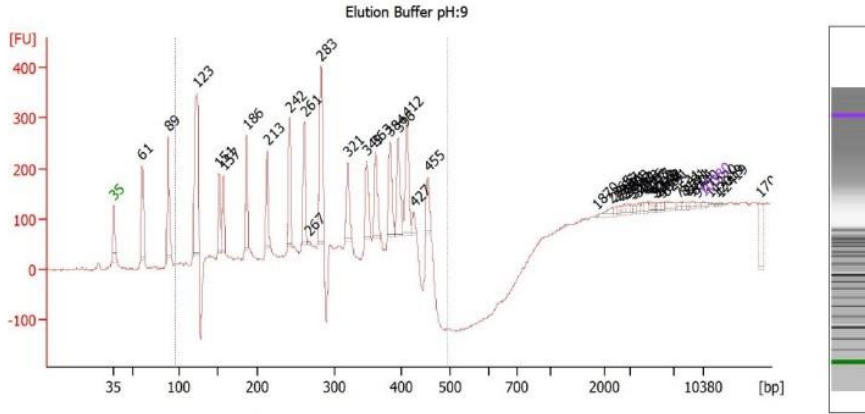
Şekil 4.10: TE pH:7 bioanalizer grafiği

E pH:9 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.14'da ve şekil 4.11'da gösterilmiştir (Şekil 4.11).

Tablo 17 E pH:9 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	61	2803,32	70159,6
3	89	3176,22	54167,8
4	123	6528,75	80180,6
5	151	1603,50	16036,7
6	157	1521,20	14704,4
7	186	2087,87	16964,5
Kons. [pg/µl] toplam		17845,86	

Electropherogram Summary Continued ...



Setpoint Deviations for sample 11 : **Elution Buffer pH:9**

Slope Threshold : 0 Width Threshold [s] : 0

Overall Results for sample 11 : **Elution Buffer pH:9**

Number of peaks found: 47 Corr. Area 1: 2,296.9
Noise: 2.0

Peak table for sample 11 : **Elution Buffer pH:9**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	61	2,803.32	70,159.6	
3	89	3,176.22	54,167.8	
4	123	6,528.75	80,180.6	
5	151	1,603.50	16,036.7	
6	157	1,521.20	14,704.4	
7	186	2,087.87	16,964.5	
8	213	1,758.59	12,488.4	
9	242	2,108.61	13,212.7	
10	261	1,978.15	11,467.8	
11	267	51.51	292.6	
12	283	3,998.93	21,433.3	
13	321	1,430.09	6,760.2	
14	349	1,392.43	6,050.3	
15	363	1,556.45	6,504.9	
16	384	1,623.06	6,403.2	
17	396	1,756.07	6,713.0	
18	412	1,984.27	7,290.2	
19	427	357.92	1,270.2	
20	455	787.67	2,624.7	
21	1,870	19.66	15.9	
22	2,265	201.87	135.1	

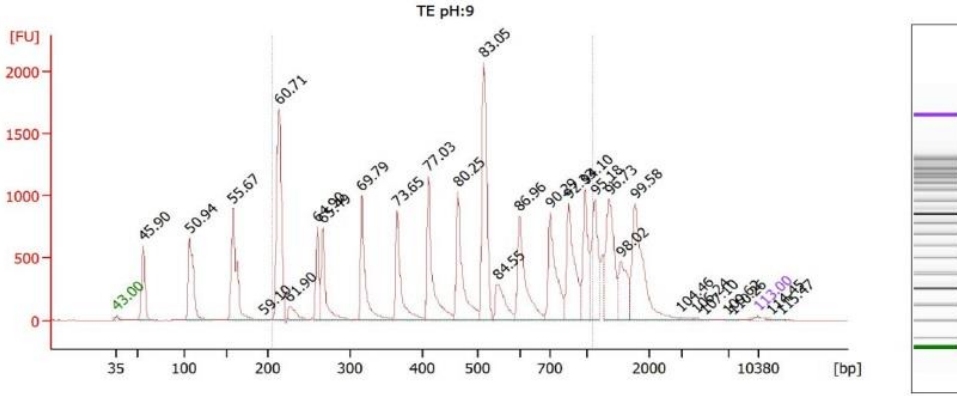
Şekil 4.11: E pH:9 bioanalizer grafiği

TE pH:9 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.15'da ve şekil 4.12'da gösterilmiştir (Şekil 4.12).

Tablo 18TE pH:9 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	2316,05	62438,6
3	103	3436,85	50629,0
4	153	3961,68	39187,7
5	190	28,39	226,2
Kons. [pg/µl] toplam		9867,97	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 3 : **TE pH:9**

Number of peaks found: 29 Corr. Area 1: 12.120,1
Noise: 0,6

Peak table for sample 3 : **TE pH:9**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	56	2.316,05	62.438,6	
3	103	3.436,85	50.629,0	
4	153	3.961,68	39.187,7	
5	190	28,39	226,2	
6	208	5.562,01	40.594,3	
7	221	611,08	4.198,7	
8	253	1.368,92	8.185,1	
9	260	2.012,48	11.734,0	
10	308	2.435,42	11.985,1	
11	357	2.134,30	9.067,7	
12	399	2.688,44	10.201,9	
13	454	2.534,58	8.458,7	
14	502	3.919,06	11.826,8	
15	534	1.072,95	3.041,9	
16	586	2.272,79	5.872,3	
17	681	2.303,42	5.125,5	
18	807	2.355,91	4.423,9	
19	942	1.608,22	2.587,3	
20	1.048	1.812,00	2.619,2	
21	1.291	2.327,86	2.732,2	
22	1.492	1.104,39	1.121,7	
23	1.734	2.691,50	2.351,2	
24	3.039	53,99	26,9	
25	4.415	23,24	8,0	
26	5.082	14,89	4,4	

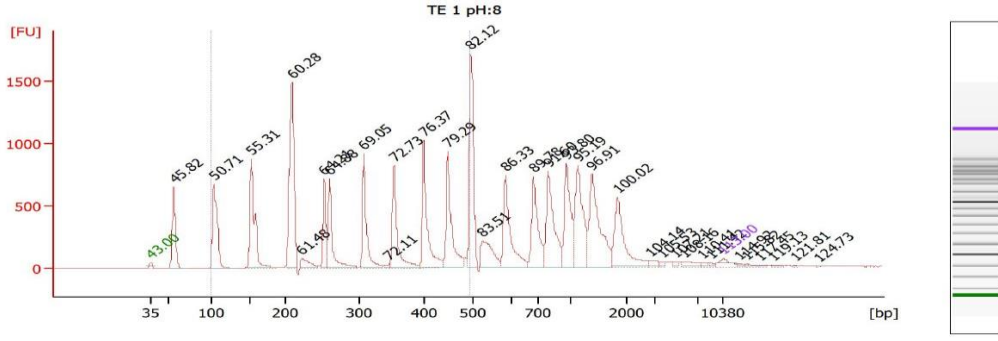
Şekil 4.12: TE pH:9 bioanalizer grafiği.

TE pH:8 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.16'da ve şekil 4.13'da gösterilmiştir (Şekil 4.13).

Tablo 19 TE pH:8 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1090,63	29533,8
3	103	1413,31	20815,4
4	153	1586,66	15710,4
Kons. [pg/µl] toplam		4215,60	

Electropherogram Summary



Overall Results for sample 1 : TE 1 pH:8

Number of peaks found: 33 Corr. Area 1: 8.530,7
Noise: 0,3

Peak table for sample 1 : TE 1 pH:8

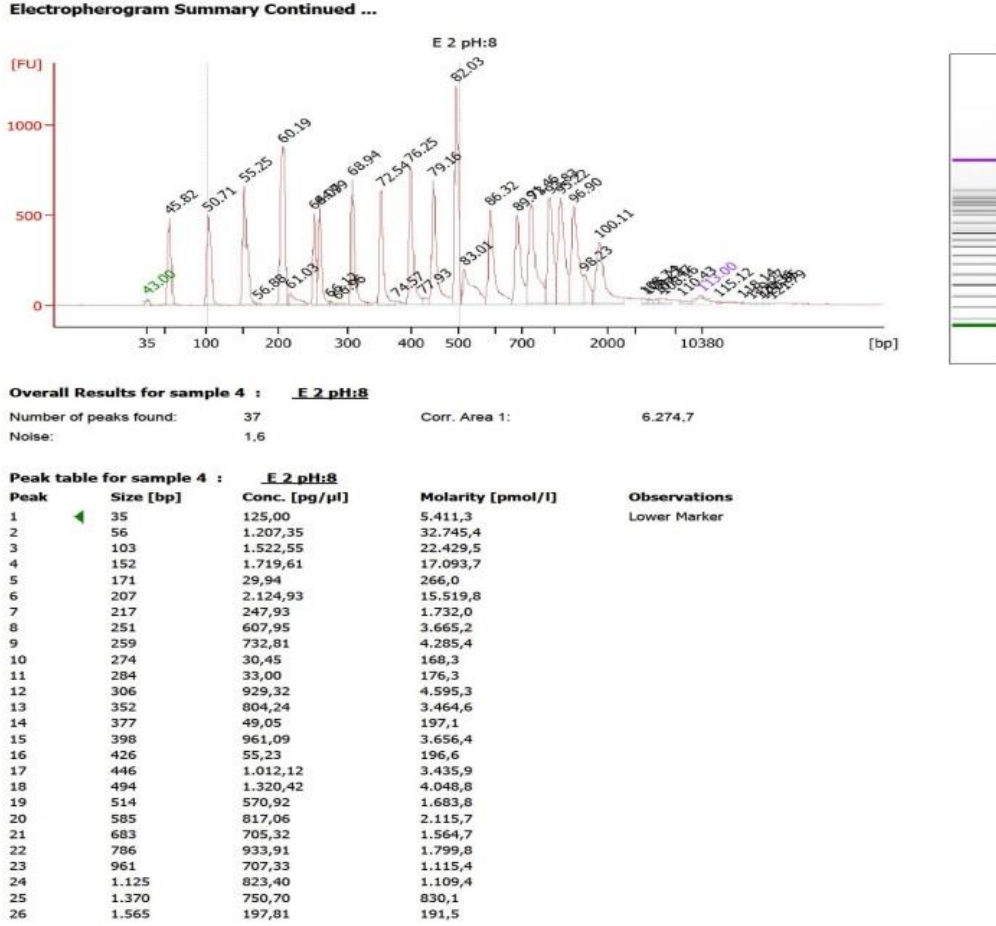
Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	56	1.090,63	29.533,8	
3	103	1.413,31	20.815,4	
4	153	1.586,66	15.710,4	
5	208	2.219,02	16.125,5	
6	222	208,49	1.423,2	
7	253	554,64	3.326,4	
8	260	826,51	4.813,4	
9	308	885,97	4.361,0	
10	346	35,57	155,6	
11	354	842,24	3.603,6	
12	400	976,85	3.701,6	
13	449	915,96	3.094,2	
14	496	1.359,73	4.156,5	
15	524	457,95	1.323,3	
16	585	821,94	2.127,8	
17	684	746,09	1.651,8	
18	796	884,86	1.683,8	
19	958	701,17	1.108,4	
20	1.121	807,55	1.091,9	
21	1.373	954,95	1.054,0	
22	1.828	645,12	534,7	
23	2.849	51,87	27,6	
24	3.672	23,16	9,6	
25	4.973	19,35	5,9	
26	5.717	66,00	17,5	

Şekil 4.13: TE pH:8 bioanalizer grafiği.

E pH:8 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.17’da ve şekil 4.14’da gösterilmiştir (Şekil 4.14).

Tablo 20E pH:8 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1207,35	32745,4
3	103	1522,55	22429,5
4	152	1719,61	17093,7
5	171	29,94	266,0
Kons. [pg/µl] toplam		4604,45	



Şekil 4.14: E pH:8 bioanalyzer grafiği.

4.2. Bağlanma Tampon Solüsyonunun Süre ve Sıcaklık Optimizasyonları Sonuçları

Bağlanma tampon solüsyonlarının süre ve sıcaklık optimizasyonları sonucu elde edilen Nanodrop ölçüm sonuçları Tablo 4.18’de verilmiştir.

Tablo 21 Farklı süre ve sıcaklıklarda inkübe edilen bağlanma solüsyonları kullanılarak izolasyon yapılmış cfDNA’ların Nanodrop ölçüm dataları.

Örnek ismi(Binding B.)	Konsantrasyon	A230/260
1	25,9± 2,9	1.35
2	23,7± 4,8	1.20
3	32,3±2,0	1.09
4	28,8± 1,3	1.32
5	24,7± 6,1	0.90
6	33,3± 4,1	0.99
7	35,7± 3,5	0.50
8	32,7± 4,0	0.49
9	31,9± 3,4	0.91
10	32,2± 2,5	0.88

Bağlanma tampon solüsyonlarının süre ve sıcaklık optimizasyonları sonucu elde edilen Qubit ölçüm sonuçları Tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 22Farklı süre ve sıcaklıklarda inkübe edilen bağlanma solüsyonları kullanılarak izolasyon yapılmış cfDNA'ların Qubit ölçüm dataları.

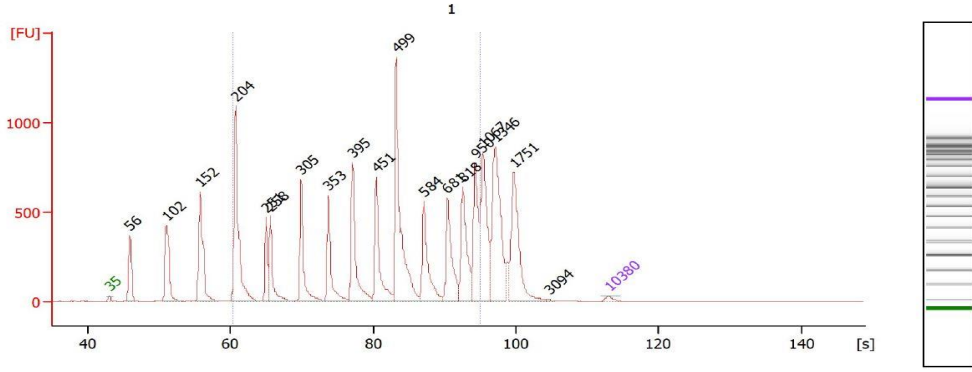
Örnek ismi(Binding B.)	A260/280	Qubit (ng/µl) (Binding B.)
1	0.09	11,0± 1,4
2	0.07	12,2± 1,0
3	0.07	14,6± 1,7
4	0.09	14,9± 1,3
5	0.05	15,5± 1,2
6	0.06	13,1± 1,7
7	0.08	17,6± 1,9
8	0.09	18,7± 1,9
9	0.05	15,1± 1,1
10	0.05	17,4± 1,4

Örnek 2:1 bioanalyzer sonuçları aşağıdaki tablo 4.20'de ve şekil 4.15'de gösterilmiştir (Şekil 4.15).

Tablo 23Örnek 2:1 bioanalyzer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1791,87	48889,7
3	102	2864,42	42596,7
4	152	3415,42	34115,6
Kons. [pg/µl] toplam		8196,71	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 2 : **1**

Number of peaks found: 19 Corr. Area 1: 8,241.7
Noise: 0.5

Peak table for sample 2 : **1**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	1,791.87	48,889.7	
3	102	2,864.42	42,596.7	
4	152	3,415.42	34,115.6	
5	204	5,156.46	38,211.4	
6	251	1,144.81	6,902.9	
7	258	1,530.56	8,998.4	
8	305	1,980.99	9,834.1	
9	353	1,676.62	7,196.2	
10	395	2,304.70	8,831.1	
11	451	2,076.47	6,972.7	
12	499	4,322.30	13,111.9	
13	584	1,739.27	4,515.6	
14	681	1,817.77	4,044.3	
15	818	1,858.89	3,441.2	
16	950	1,715.60	2,735.3	
17	1,067	2,400.21	3,408.3	
18	1,346	3,104.46	3,495.6	
19	1,751	2,253.57	1,950.2	
20	3,094	28.56	14.0	
21	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

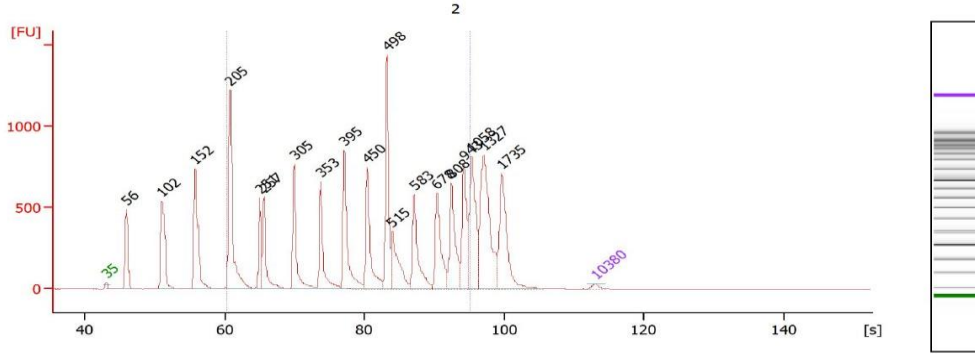
Şekil 4.15: Örnek 2:1 bioanalizer grafiği.

Örnek 3:2 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.21'de ve şekil 4.16'da gösterilmiştir (Şekil 4.16).

Tablo 24 Örnek 3:2 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	2308,43	62702,8
3	102	3520,48	52325,5
4	152	4027,06	40144,2
Kons. [pg/μl] toplam		9980,97	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 3 : 2

Number of peaks found: 19 Corr. Area 1: 8,691.0
Noise: 0.4

Peak table for sample 3 : 2

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	2,308.43	62,702.8	
3	102	3,520.48	52,325.5	
4	152	4,027.06	40,144.2	
5	205	5,680.27	42,081.0	
6	251	1,256.19	7,568.9	
7	257	1,819.63	10,707.5	
8	305	2,215.89	11,004.5	
9	353	1,847.46	7,932.8	
10	395	2,464.50	9,451.1	
11	450	2,204.52	7,430.2	
12	498	2,776.76	8,444.7	
13	515	1,586.15	4,670.2	
14	583	1,799.08	4,674.0	
15	678	1,828.21	4,084.3	
16	808	1,919.93	3,600.9	
17	943	1,700.60	2,731.2	
18	1,058	2,351.76	3,368.8	
19	1,327	3,407.07	3,890.5	
20	1,735	2,216.51	1,935.7	
21	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

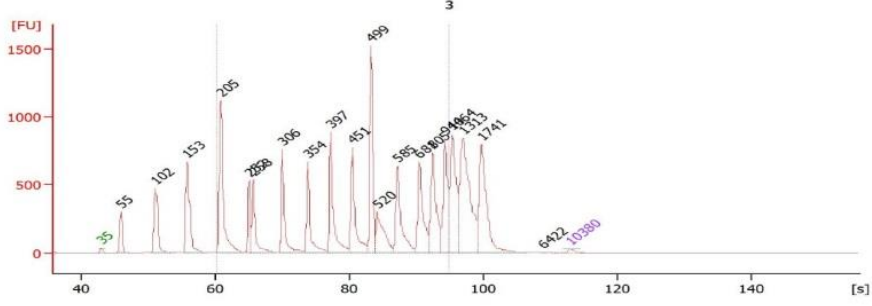
Şekil 4.16: Örnek 3:2 bioanalizer grafiği.

Örnek 4:3 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.22'de ve şekil 4.17'de gösterilmiştir (Şekil 4.17).

Tablo 25 Örnek 4:3 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	55	1488,33	40660,4
3	102	3182,17	47089,0
4	153	3753,70	37273,3
Kons. [pg/μl] toplam		8549,20	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 4 : 3

Number of peaks found: 20 Corr. Area 1: 8,902.0
Noise: 0.3

Peak table for sample 4 : 3

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	55	1,488.33	40,660.4	
3	102	3,132.17	47,089.0	
4	153	3,753.70	37,273.3	
5	205	5,468.89	40,351.5	
6	252	1,267.46	7,629.8	
7	258	1,796.96	10,532.8	
8	306	2,266.55	11,212.5	
9	354	1,930.66	8,265.6	
10	397	2,562.78	9,791.8	
11	451	2,379.32	7,991.6	
12	499	3,137.56	9,524.7	
13	520	1,546.95	4,508.4	
14	585	2,076.84	5,375.4	
15	681	2,090.93	4,655.1	
16	805	2,282.06	4,296.2	
17	944	1,963.66	3,151.6	
18	1,064	2,519.98	3,599.8	
19	1,313	3,878.52	4,474.9	
20	1,741	2,711.76	2,359.8	
21	6,422	7.97	1.9	
22	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

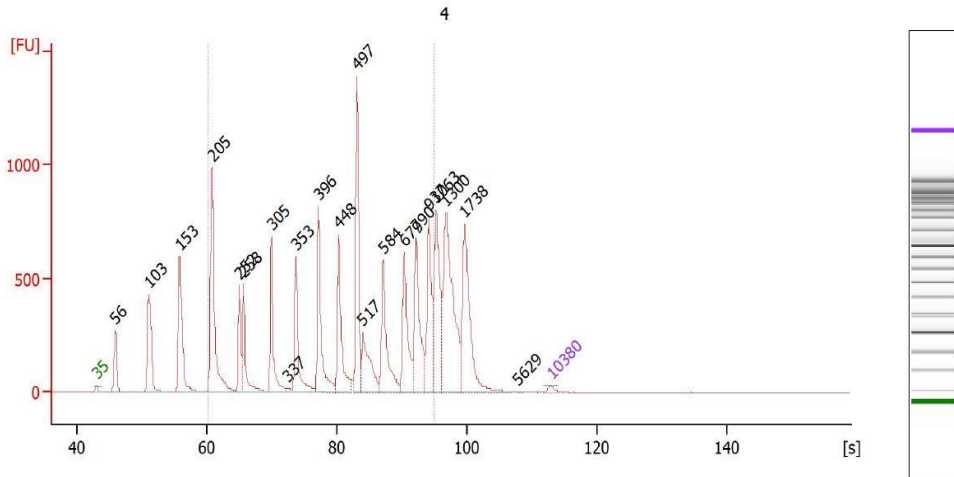
Şekil 4.17: Örnek 4:3 bioanalizer grafiği.

Örnek 5:4 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.23’de ve şekil 4.18’de gösterilmiştir (Şekil 4.18).

Tablo 26 Örnek 5:4 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	56	1342,53	36621,8
3	103	2903,65	42915,8
4	153	3401,64	33762,7
Kons. [pg/μl] toplam		7772,82	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 5 : 4

Number of peaks found: 21 Corr. Area 1: 8,069.3
Noise: 0.3

Peak table for sample 5 : 4

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	56	1,342.53	36,621.8	
3	103	2,903.65	42,915.8	
4	153	3,401.64	33,762.7	
5	205	5,016.35	37,000.2	
6	252	1,134.14	6,830.5	
7	258	1,632.84	9,592.9	
8	305	1,961.59	9,732.0	
9	337	80.92	363.4	
10	353	1,752.24	7,527.9	
11	396	2,281.52	8,722.5	
12	448	2,071.12	7,003.7	
13	497	2,865.68	8,733.0	
14	517	1,452.51	4,259.4	
15	584	1,913.92	4,968.0	
16	679	1,887.45	4,213.8	
17	790	2,170.59	4,161.0	
18	937	1,823.70	2,948.1	
19	1,063	2,287.60	3,260.5	
20	1,300	3,759.08	4,380.5	
21	1,738	2,595.99	2,263.1	
22	5,629	11.14	3.0	
23	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

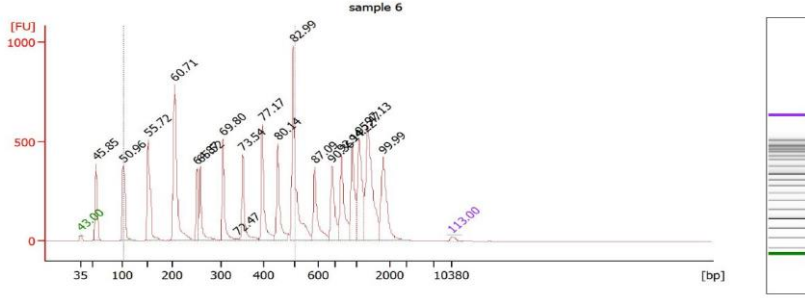
Şekil 4.18: Örnek 5:4 bioanalizer grafiği.

Örnek 6:5 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.24'de ve şekil 4.19'da gösterilmiştir (Şekil 4.19).

Tablo 27 Örnek 6:5 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	55	2604,47	71660,5
3	102	3275,19	48676,8
4	152	3754,61	37430,2
Kons. [pg/μl] toplam		9759,27	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 6 : sample 6

Number of peaks found: 19 Corr. Area 1: 4.558,2
Noise: 0,3

Peak table for sample 6 : sample 6

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	55	2.604,47	71.660,5	
3	102	3.275,19	48.676,8	
4	152	3.754,61	37.430,2	
5	205	5.593,47	41.406,1	
6	250	1.200,70	7.278,3	
7	257	1.641,72	9.676,2	
8	304	1.961,83	9.771,8	
9	338	69,89	313,6	
10	351	1.691,07	7.298,5	
11	396	2.156,93	8.243,4	
12	446	1.901,73	6.455,0	
13	496	4.280,70	13.086,8	
14	584	1.607,91	4.173,6	
15	679	1.499,35	3.345,0	
16	786	1.843,65	3.555,2	
17	945	1.566,18	2.510,8	
18	1.083	2.011,07	2.812,4	
19	1.345	3.160,44	3.561,0	
20	1.793	1.832,67	1.549,0	
21	10.380	75,00	10,9	Upper Marker

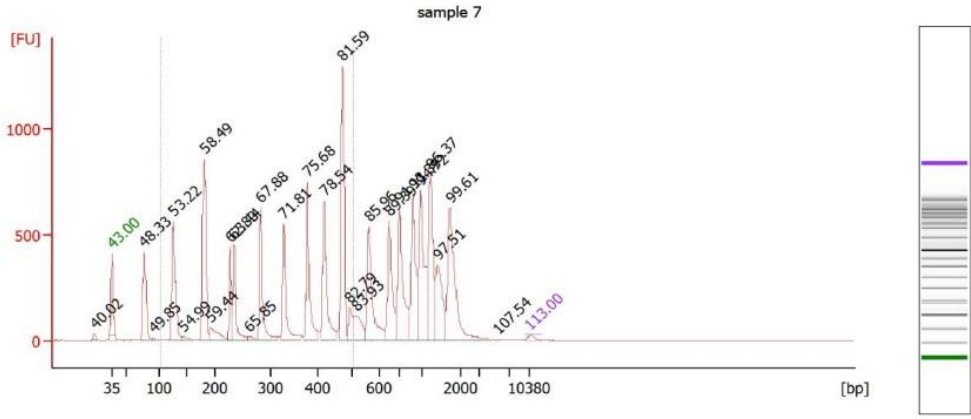
Şekil 4.19: Örnek 6:5 bioanalizer grafiği.

Örnek 7:6 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.25’de ve şekil 4.20’de gösterilmiştir (Şekil 4.20).

Tablo 28 Örnek 7:6 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	25	0,00	0,0
2	35	125,00	5411,3
3	78	2407,25	46954,2
4	92	56,96	942,4
5	126	2795,00	33695,2
6	144	148,54	1558,7
7	181	3894,32	32576,7
8	191	623,37	4941,2
Kons. [pg/µl] toplam		10050,44	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 7 : sample 7

Number of peaks found: 26 Corr. Area 1: 5.532,3
Noise: 0,4

Peak table for sample 7 : sample 7

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	25	0,00	0,0	
2	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
3	78	2.407,25	46.954,2	
4	92	56,96	942,4	
5	126	2.795,00	33.695,2	
6	144	148,54	1.558,7	
7	181	3.894,32	32.576,7	
8	191	623,37	4.941,2	
9	227	1.033,71	6.885,9	
10	234	1.383,33	8.943,2	
11	261	104,55	607,8	
12	283	1.769,40	9.482,6	
13	329	1.559,77	7.174,8	
14	378	1.803,05	7.229,9	
15	419	1.772,50	6.413,1	
16	471	2.829,03	9.094,0	
17	492	428,92	1.320,5	
18	515	608,43	1.790,1	
19	559	1.717,96	4.655,0	
20	649	1.502,77	3.509,8	
21	706	2.023,53	4.341,3	
22	881	1.522,80	2.618,0	
23	983	1.925,84	2.967,1	
24	1.225	1.683,87	2.082,5	
25	1.405	1.113,56	1.201,3	
26	1.733	2.088,08	1.825,2	

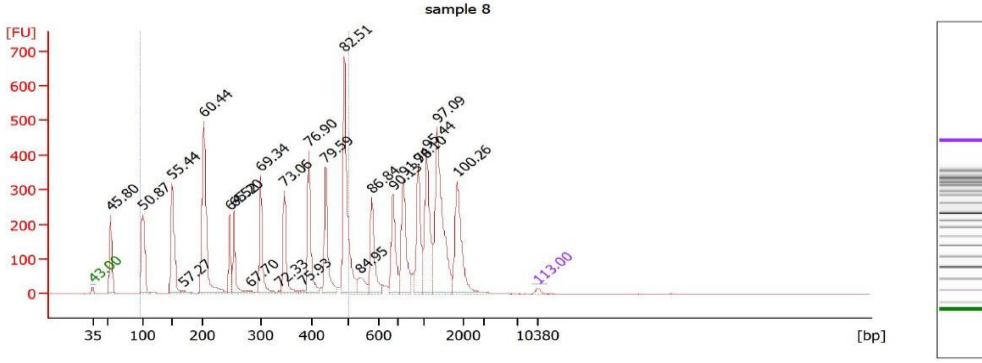
Şekil 4.20: Örnek 7:6 bioanalizer grafiği.

Örnek 8:7 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.26'da ve şekil 4.21'de gösterilmiştir (Şekil 4.21).

Tablo 29 Örnek 8:7 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	55	2134,24	59187,3
3	101	2606,30	39126,7
4	149	3105,81	31568,8
5	168	135,90	1223,3
Kons. [pg/µl] toplam		8107,25	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 8 : sample 8

Number of peaks found: 23 Corr. Area 1: 3.169,8
Noise: 0,3

Peak table for sample 8 : sample 8

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	55	2.134,24	59.187,3	
3	101	2.606,30	39.126,7	
4	149	3.105,81	31.568,8	
5	168	135,90	1.223,3	
6	202	5.529,59	41.527,2	
7	246	1.122,15	6.905,3	
8	254	1.386,71	8.287,6	
9	281	59,66	322,0	
10	299	1.859,27	9.432,6	
11	336	55,40	249,9	
12	345	1.546,28	6.790,5	
13	381	67,02	266,6	
14	393	2.007,82	7.738,5	
15	437	1.898,81	6.586,2	
16	487	4.013,53	12.478,3	
17	537	510,57	1.440,2	
18	578	1.497,79	3.924,4	
19	672	1.525,53	3.439,3	
20	758	1.852,93	3.703,9	
21	936	1.664,51	2.695,8	
22	1.079	2.211,46	3.106,7	
23	1.337	3.501,02	3.967,3	
24	1.835	1.968,58	1.625,5	
25	10.380	75,00	10,9	Upper Marker

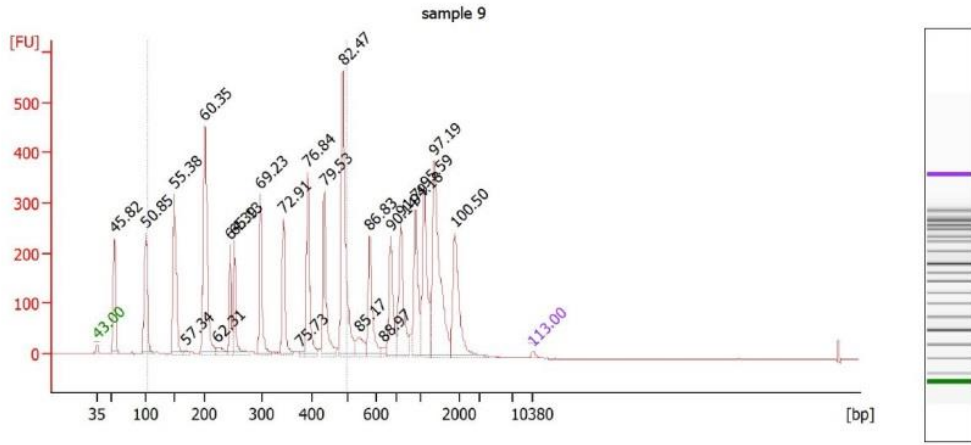
Şekil 4.21: Örnek 8:7 bioanalizer grafiği.

Örnek 9:8 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.27’de ve şekil 4.22’de gösterilmiştir (Şekil 4.22).

Tablo 30 Örnek 9:8 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	55	3081,26	85240,5
3	101	3829,84	57614,8
4	148	4387,80	44780,5
5	169	154,30	1382,5
Kons. [pg/μl] toplam		11578,2	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 9 : sample 9

Number of peaks found: 23 Corr. Area 1: 2.650,2
Noise: 0,2

Peak table for sample 9 : sample 9

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	55	3.081,26	85.240,5	
3	101	3.829,84	57.614,8	
4	148	4.387,80	44.780,5	
5	169	154,30	1.382,5	
6	201	7.045,32	53.175,1	
7	222	394,96	2.694,4	
8	245	1.503,12	9.304,1	
9	253	1.943,88	11.651,1	
10	297	2.426,31	12.357,5	
11	343	1.952,89	8.622,5	
12	378	93,92	376,0	
13	392	2.555,77	9.871,4	
14	436	2.389,13	8.304,3	
15	487	5.188,21	16.152,0	
16	542	602,75	1.685,2	
17	578	1.818,25	4.766,7	
18	636	157,94	376,5	
19	672	1.789,21	4.033,3	
20	759	2.170,41	4.333,6	
21	942	1.954,52	3.143,7	
22	1.103	2.438,51	3.351,1	
23	1.353	4.069,21	4.557,5	
24	1.873	2.170,33	1.756,1	
25	10.380	75,00	10,9	Upper Marker

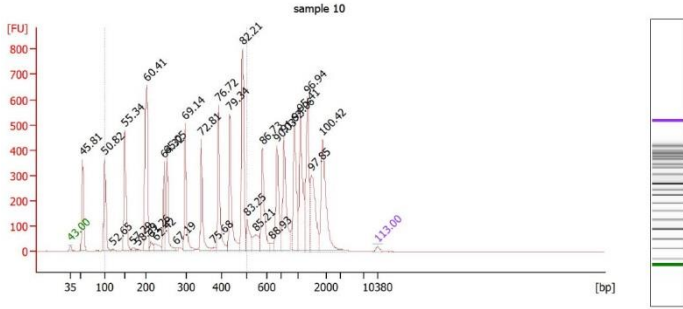
Şekil 4.22: Örnek 9:8 bioanalizer grafiği.

Örnek 10:9 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.28’de ve şekil 4.23’de gösterilmiştir (Şekil 4.23).

Tablo 31 Örnek 10:9 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/μl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	55	2800,39	77597,6
3	100	3212,73	48470,0
4	120	80,83	1023,0
5	148	3587,79	36728,4
6	169	152,98	1374,9
7	180	63,01	530,0
Kons. [pg/μl] toplam		10022,73	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 10 : sample 10

Number of peaks found: 29 Corr. Area 1: 4.465,6
Noise: 0.2

Peak table for sample 10 : sample 10

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	55	2.800,39	77.597,6	
3	100	3.212,73	48.470,0	
4	120	80,83	1.023,0	
5	148	3.587,79	36.728,4	
6	169	152,98	1.374,9	
7	180	63,01	530,0	
8	201	5.286,66	39.768,5	
9	211	303,34	2.181,1	
10	223	412,98	2.801,4	
11	244	1.386,26	8.609,3	
12	252	1.742,29	10.477,7	
13	275	95,60	526,3	
14	296	2.225,40	11.372,3	
15	342	1.929,42	8.551,5	
16	378	99,81	400,3	
17	391	2.344,73	9.090,6	
18	433	2.302,40	8.063,0	
19	482	3.364,83	10.572,9	
20	500	748,30	2.266,9	
21	543	611,56	1.707,4	
22	576	1.846,95	4.858,8	
23	634	178,25	425,7	
24	669	1.799,96	4.077,2	
25	746	2.190,09	4.449,5	
26	933	1.918,45	3.115,5	

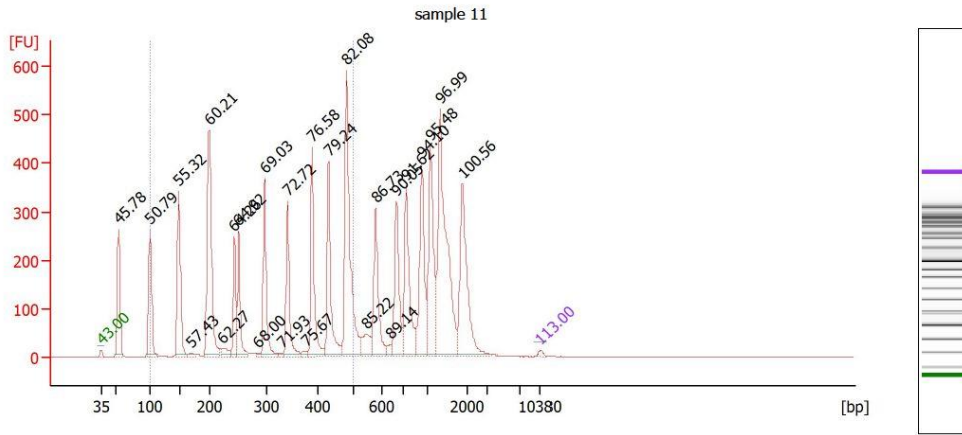
Şekil 4.23: Örnek 10:9 bioanalizer grafiği.

Örnek 11:10 bioanalizer sonuçları aşağıdaki tablo 4.29'da ve şekil 4.24'de gösterilmiştir (Şekil 4.24).

Tablo 32 Örnek 11:10 bioanalizer konsantrasyon ölçüm sonuçları.

Peak	Boyut [bp]	Kons. [pg/µl]	Molarite [pmol/l]
1	35	125,00	5411,3
2	54	3942,91	109833,9
3	100	4358,48	65944,3
4	148	5078,33	52052,2
5	170	185,51	1652,7
6	199	7943,64	60385,7
Kons. [pg/µl] toplam		21633,87	

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 11 : **sample 11**

Number of peaks found: 25 Corr. Area 1: 3.459,1
 Noise: 0,3

Peak table for sample 11 : **sample 11**

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125,00	5.411,3	Lower Marker
2	54	3.942,91	109.833,9	
3	100	4.358,48	65.944,3	
4	148	5.078,33	52.052,2	
5	170	185,51	1.652,7	
6	199	7.943,64	60.385,7	
7	222	493,79	3.375,5	
8	243	1.942,41	12.094,5	
9	251	2.278,29	13.776,4	
10	284	101,79	542,9	
11	295	3.138,64	16.105,4	
12	331	94,01	430,5	
13	341	2.652,87	11.798,0	
14	378	141,59	567,9	
15	389	3.430,88	13.360,1	
16	431	3.323,76	11.689,1	
17	480	6.458,54	20.394,5	
18	543	757,34	2.113,6	
19	576	2.680,49	7.053,6	
20	641	197,59	467,1	
21	669	2.635,39	5.965,1	
22	746	3.247,78	6.599,5	
23	935	3.123,39	5.059,3	
24	1.086	3.361,49	4.690,9	
25	1.323	6.273,79	7.185,8	
26	1.882	3.479,50	2.800,7	

Şekil 4.24: Örnek 11:10 bioanalizer grafiği.

5. TARTIŞMASONUÇ

Bu tezde cfDNA izolasyonlarının veriminin artırılması için belirli tampon solüsyonların deney protokolü içerisindeki inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile içerikleri optimize edilmiştir. İlk aşamada cfDNA'nın manyetik küreciklere bağlanma basamağı süre ve sıcaklık olarak optimize edilmiştir. Tezin ikinci aşamasında ise elüsyon aşamasında kullanılan tampon solüsyon optimize edilerek, farklı pH'lardaki izolasyon verimi kontrol edilmiştir.

Manyetik küreciklerle yapılan DNA izolasyonunda inkübasyon süresi, birkaç önemli nedenden dolayı kritiktir. Öncelikle DNA'nın küreciklere etkin bağlanması en optimal inkübasyon süresinin uygulanmasına bağlıdır. İzolasyonlarda kullanılan manyetik kürecikler, DNA'ya karşı afinite gösteren (genellikle silika veya diğer DNA bağlayıcı maddelerle kaplı) malzemelerle kaplanmıştır. Inkübasyon süresi boyunca, çözelti içindeki DNA moleküllerinin manyetik küreciklerin yüzeyi ile temas kurup bağlanması beklenir. Inkübasyon süresinin uzunluğu, küreciklere bağlanan DNA miktarını doğrudan etkilemektedir. Inkübasyon süresi çok kısa olursa, optimal DNA bağlanması için yeterli zaman olmaması düşük verimlere yol açabilmektedir. Ayrıca DNA manyetik küreciklere spesifik olarak bağlanırken diğer kirleticiler ve kontaminantlar çözeltide kalmaktadır. Yeterli inkübasyon süresi, küreciklerin DNA'ya seçici olarak bağlanmasını ve böylece izole edilen DNA'nın saflığının artırılmasını sağlamaktadır (54). Doğru inkübasyon, DNA izolasyon sürecinin tekrarlanabilir ve tutarlı olmasını sağlamaktadır ve bu da PCR, dizileme veya klonlama gibi sonraki uygulamalar için güvenilir sonuçlar doğuracaktır. Tezde manyetik kürecikler ile DNA 5, 10, 15, 20 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar inkübasyon süreleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

Manyetik küreciklerle yapılan DNA izolasyonunda, izolasyon sürecinin verimliliğini ve kalitesini etkileyen bir diğer kritik parametre de inkübasyon sıcaklığıdır. Optimal sıcaklıkta, DNA molekülleri ile manyetik küreciklerin yüzeyi arasındaki etkileşim artar ve bu da daha verimli bağlanmayı sağlamaktadır. Sıcaklık çok düşük olduğunda, bağlanma kinetiği yavaşlamakta ve verim azalmaktadır. Sıcaklığın çok yüksek olduğu

durumda ise, DNA denatüre olduğundan bağlanma özgülüğü azalmaktadır (55). Ayrıca inkübasyon sıcaklığı, DNA izolasyonu sırasında kullanılan reaktiflerin uygun şekilde çalışmasını sağlayarak, hücrelerin etkin lizisi, DNA'nın manyetik küreciklere bağlanması ve kontaminantların uzaklaştırılması gibi süreçleri kolaylaştırmaktadır. Tezde manyetik kürecikler ile DNA 25°C, 30°C ve 35°C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar inkübasyon sıcaklıkları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir ($p>0.05$).

Tezin ikinci aşamasında elüsyon tampon çözeltisi ve pH'sı optimize edilmiştir. Tris-EDTA (TE) ve DNaz/RNAsız içermeyen su 4-10 arası pH'larda elüsyon tamponu olarak kullanılmıştır. DNA, belirli bir pH aralığında stabil ve çözülmüş haldedir. Tris tamponu, genellikle pH 7.5-8.0 civarında DNA'nın bozulmadan saklanmasını ve enzimatik reaksiyonların optimal pH aralığında gerçekleşmesini sağlamaktadır. EDTA iki değerlikli kationları (özellikle Mg^{2+} ve Ca^{2+}) şelatlayarak DNA'yı parçalayan DNaz enzimlerinin aktivitesini inhibe etmektedir. Mg^{2+} , DNaz enzimlerinin aktivitesi için gereklidir, EDTA bu iyonları bağlayarak DNaz enzimlerini etkisiz hale getirmekte ve DNA'nın bozulmasını engellemektedir (56). Bu sebeple su ve TE tamponu elüsyon olarak değerlendirilmiştir. Yapılan deneylerde gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Özet olarak manyetik kürecik temelli DNA izolasyonlarında DNA ve manyetik küreciklerin bağlanma inkübasyonu sıcaklıkları ve süreleri ile; DNA'nın elüsyon içeriğinin optimize edilmesi izole edilen DNA'nın verim, saflık ve kalitesini artırmak için gereklidir ve sonraki uygulamalar için kritik önem taşımaktadır. Bu tezde bu parametreler yukarıda belirtilen koşullar çerçevesinde optimize edilmiştir. Anlamlı ve kesin sonuçlar için daha fazla deney ve teknik, ayrıntılı optimizasyonların planlanmasının gerekli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cisneros-Villanueva M, Hidalgo-Pérez L, Rios-Romero M, Cedro-Tanda A, Ruiz-Villavicencio CA, Page K, et al. Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review. *British Journal of Cancer*. 2022;126(3):391-400.
2. Ignatiadis M., Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic — implementation issues and future challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021;18(5):297-312.
3. Yan YY, Guo QR, Wang FH, Adhikari R, Zhu ZY, Zhang HY, et al. Cell-free DNA: Hope and potential application in cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 22(9): 639233.
4. Heitzer E, Speicher MR. Circulating tumor DNA: a new generation of cancer biomarkers. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2015; 30: 89-97.
5. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2014; 6(3): 119-136.
6. Lee H, Park C, Na W, Park KH, Shin S. Precision cell-free DNA extraction for liquid biopsy by integrated microfluidics. *NPJ Precision Oncology*. 2020; 4(1): 3.
7. Crowley E, Di Nicolantonio F. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016; 13(8): 471-486.
8. Savino M, Criscitiello C, Basile D, Pasquali S, Pruneri G, Curigliano G. Liquid biopsy for solid tumors: a review of available platforms and clinical applications. *The Oncologist*. 2020; 25(6): e936-e951.
9. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11(6): 426-437.
10. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy in cancer patients: advances in capturing viable CTCs for functional studies using the EPISPOT assay. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2019; 19(6): 473-476.

11. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*. 2014; 32(6): 579-586.
12. Li Y, Zhang Y, Tao Y, Wang M, Zhang H, Yang Y, Zheng H. Circulating tumor RNA in cancer patients: Developments and clinical applications. *Molecular Cancer*. 2020; 19(1): 1-17.
13. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013; 10(8): 472-84.
14. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*. 2014; 6(224): 224ra24.
15. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12(5): 323-334.
16. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(23): 9530-9535.
17. Buder A, Tomuta C, Filipits M, Krupka K. Circulating tumor DNA: an evolving entity in cancer diagnostics and therapy. *European Journal of Clinical Investigation*. 2021; 51(1): e13418.
18. Siravegna G, Bardelli A. Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome Biology*. 2014; 15(8): 449.
19. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease—latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019; 16(7): 409-424.
20. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine*. 2014; 20(5): 548-554.
21. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 2017; 545(7655): 446-451.

22. Ignatiadis M, Dawson SJ. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Annals of Oncology*. 2014; 25(12): 2304-2313.
23. Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2010; 20(1): 96-99.
24. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud JM, Padovani B, et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PloS One*. 2014; 9(10): e111597.
25. Soave A, Dahlem R. Urine liquid biopsy: The potential for new non-invasive methods in bladder cancer diagnosis, surveillance, and treatment. *Frontiers in Oncology*. 2021; 11:597573.
26. Wang Z, Wu C, Zhu X, Zhang X, Liu S, Zhao X, et al. Urine-based liquid biopsy: Non-invasive and sensitive AR-V7 detection in urinary EVs from patients with prostate cancer. *Cancer Letters*. 2020; 476: 158-166.
27. Roupert M, Babjuk M, Comperat E, Zigeuner R, Sylvester RJ, Burger M. European Association of Urology. European guidelines on upper tract urothelial carcinomas: 2011 update. *European Urology*. 2011; 59(4): 584-594.
28. Speight PM, Barraclough P. The diagnosis of oral precancer: the modern role of the oral brush biopsy. *Oral Oncology*. 2007; 43(7): 771-773.
29. Chamberlain MC. Neoplastic meningitis. *The Oncologist*. 2009; 14(9): 961-971.
30. Siravegna G, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*. 2017; 35(13): 1417-1420.
31. Wan JC, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17(4): 223-238.
32. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease—latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017; 14(6): 377-392.
33. Heitzer E, Speicher MR. Circulating tumor cells: potential markers of minimal residual disease in solid tumors. *Clinical Chemistry*. 2015; 61(2): 150-156.

34. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical Chemistry*. 2015; 61(1): 112-123.
35. Azimi SM, Nixon G, Ahern J, Balachandran W. A magnetic bead-based DNA extraction and purification microfluidic device. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2011; 11: 157-165.
36. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17(4): 223–238.
37. Leest PV, Boonstra PA, Elst AT, Kempen LCV, Tibbesma M, Koopmans J, et al. Comparison of Circulating Cell-Free DNA Extraction Methods for Downstream Analysis in Cancer Patients. *Cancers*. 2020; 12(5): 1222.
38. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. Comparison of methods for the isolation of cell-free DNA from cell culture supernatant. *Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2020; 42(4): 1010428320916314.
39. Hyun KA, Kim J, Gwak H, Jung HI. Isolation and enrichment of circulating biomarkers for cancer screening, detection, and diagnostics. *Analyst*. 2016; 141(2): 382-392.
40. Ji H. Lysis of cultured cells for immunoprecipitation. *Cold Spring Harbor Protocols* [Internet]. 2010 [Erişim Tarihi 10 Mayıs 2024]. Erişim adresi: <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/8/pdb.prot5466>
41. Guanidine Thiocyanate (Products G9277) [Internet]. 2024 [Erişim Tarihi 20 Mayıs 2024]. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/g9277>
42. Triton™ X-100 (Products X100) [Internet]. 2024 [Erişim Tarihi 10 Mayıs 2024]. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/x100>
43. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Products E4884) [Internet]. 2024 [Erişim Tarihi 18 Mayıs 2024]. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sial/e4884>

44. Tris hydrochloride (Products 10812846001) [Internet]. 2024 [Erişim Tarihi 15 Mayıs 2024]. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/roche/10812846001>
45. Kerachian MA, Azghandi M, Javadmanesh A, Ghaffarzagdegan K, Mozaffari-Jovin S. Selective capture of plasma cell-free tumor DNA on magnetic beads: a sensitive and versatile tool for liquid biopsy. *Cellular Oncology*. 2020; 43(5): 949-56.
46. He Z, Tang C, Chen X, Liu H, Yang G, Xiao Z, et al. Based on magnetic beads to develop the kit for extraction of high-quality cell-free DNA from blood of breast cancer patients. *Materials Express*. 2019; 9(8): 956-61.
47. Lee H, Choi M, Lim J, Jo M, Han JY, Kim TM, et al. Magnetic nanowire networks for dual-isolation and detection of tumor-associated circulating biomarkers. *Theranostics*. 2018; 8(2): 505-17.
48. Mazurek AM, Fiszer-Kierzkowska A, Rutkowski T, Skłodowski K, Pierzyna M, Ściegłińska D, et al. Optimization of circulating cell-free DNA recovery for KRAS mutation and HPV detection in plasma. *Cancer Biomarkers*. 2013;13:385-94
49. Soleimani-Delfan A, Bouzari M, Wang R. A rapid competitive method for bacteriophage genomic DNA extraction. *Journal of Virological Methods*. 2021;293:114148.
50. Akbariqomi M, Heidari R, Gargari SS, Omrani MD, Rigi G, Sanikhani NS, et al. Evaluation and statistical optimization of a method for methylated cell-free fetal DNA extraction from maternal plasma. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019;36(5):1029-38.
51. Triant DA, Whitehead A. Simultaneous Extraction of High-Quality RNA and DNA from Small Tissue Samples. *Journal of Heredity*. 2008;100(2):246-50.
52. Jain A, Jain R, Jain S. Extraction of DNA from Animal Cells. *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques*. New York, NY: Springer US; 2020; 61-4.
53. Moore D. Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Curr Protoc Protein Sci*. 2001; 4-4e.

54. Adams NM, Bordelon H, Wang K-KA, Albert LE, Wright DW, Haselton FR. Comparison of Three Magnetic Bead Surface Functionalities for RNA Extraction and Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015;7(11):6062-9.
55. Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner-Greiner S, Anders P, Henske B, et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Science International*. 2005;152(1):13-22.
56. Rudi K, Kroken M, Dahlberg OJ, Deggerdal A, Jakobsen KS, Larsen F. Rapid, Universal Method to Isolate PCR-Ready DNA Using Magnetic Beads. *BioTechniques*. 1997;22(3):506-11.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Hacı Mehmet AKBULUT
Doğum Yeri	Yerköy/YOZGAT
Doğum Tarihi	01.01.1998
Uyruğu	T.C.
Telefon	0 555 883 76 38
E-Posta Adresi	mehmet.akbulut.4038@gmail.com

Eğitim Bilgileri	
Üniversite	Erciyes Üniversitesi
Fakülte	Eczacılık Fakültesi
Bölümü	Eczacılık
Mezuniyet Yılı	2022