

FLOW SİTOMETRİNİN HİDROBİYOLOJİDE KULLANIMI

Utku Güner*

Trakya University, Faculty Sciences, Department of Biology, Edirne

Özet:

Bu derlemede, flow sitometrinin hidro biyolojide alanlarının tanıtılması flow sitometrinin çalışma ilkelerinin anlatılması amaçlanmıştır. 1950'li yıllarda geliştirilen flow sitometri, günümüzde farklı araştırmalarda da kullanılmaktadır. Işığın saçılması ve emilmesi ilkesini kullanan flow sitometri özellikle alglerde kullanılabilir. Hız, hassasiyet, maliyet ve kolaylık açısından benzersiz olanakları olan ,flow sitometrinin çalışma ilkesi anlatılmıştır. Derlemede özellikle, hidrobiyolojide flow sitometrinin nasıl kullanıldığı verilmektedir. Bu derlemenin bir amacı da genel olarak flow sitometriyi tanıtarak araştırmacıları bir araç olarak flow sitometriyi daha fazla kullanmasına özendirmeektir.

Anahtar Kelimeler: Flow sitometri, Hidrobiyoloji

Abstract: **Using flow Cytometry in Hydrobiology**

In this review, we describe the principles of flow cytometry Hydrobiology areas of study is intended to promote flow cytometry. Flow cytometry was developed in the 1950s, today is also used in different studies. Using the principle of light scattering and absorption, flow cytometry can be used, especially algae. In speed, accuracy, cost and convenience in terms of unique opportunities, explained the principle of flow cytometry study. The review primarily focuses on how flow cytometry is used in hydrology. Another aim of the review is to encourage researchers to use this application more in their studies by describing flow cytometry in its general guidelines.

Keywords: Flow cytometry, Hydrobiology

* Correspondence to:

Utku GÜNER, Trakya University, Faculty Sciences, Department of Biology. 22030 Edirne-TÜRKİYE

Tel: (+90 284) 235 28 26 / 1194 Fax: (+90 284) 235 40 10

E-mail: uguner@trakya.edu.tr; utku_guner@hotmail.com

Giriş

Flow Sitometri, çeşitli hücrelerin süspansiyon halinde bir kanal boyunca tek tek bir sıra haline gelerek ince bir kanaldan geçmesiyle, hücre büyüklüğü ve granülaritesine bağlı olarak sınıflandırılması ilkesine dayanan bir cihazdır (Alice 2004). Sitometri hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel yada kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir Flow sitometri'de ölçümler, süspansiyon içindeki hücrelerin ölçüm yapacak olan aparattan birer birer geçmesiyle yapılır.

Flow Sitometrinin çalışma prensleri 1870 yıllara kadar eski olsa da 1969 yılında argon lazerinin kullanılmaya başlaması, 1980 yılında ayırma işleminin bulunması ve son 10 yıldır sürekli olarak geliştirmesiyle günümüze kadar gelişmiştir (Dunphy 2004). Flow Sitometrinin temel yaklaşımı, hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granülaritesi açısından değerlendirilmesidir (Demirel 1995). Bu amaçla hedeflenen yapı ya da hücre önce flüoresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya (nükleik asitlere özel propidium iodide) kullanılarak işaretlenir. Bazı durumlarda ise klorofil gibi maddeler kendileri flüoresan özelliğe sahiptir. (Collier 2000). Flow sitometri analizi hedeflene yapı ve hücrelerinin sayısını türünü çok kısa sürede, ucuz ve etkin bir şekilde belirleyebilir (Karaboz ve ark., 2008).

On binlerce hücrenin yada partikülün(virus, spor vb) kısa zaman içinde analiz edilmesi, İstatistiksel bilginin çok çabuk elde edilmesi, elde edilen bilginin esnek olması Flow sitometrinin iyi bir analiz aracı olarak öne çıkarmaktadır.

Günümüzde flow sitometrinin biyoloji ve hidrobiyolojide başlıca kullanım alanları:

- DANN (miktar ve DNA kompozisyonu), RNA, Protein analizleri,
- Hücre antijenlerinin ve yoğunluğunun belirlenmesi,
- Klorofil veya fikoeritrin gibi hücre pigmentleri,
- Hücre ölümü(apoptozis) ve proliferasyonun belirlenmesi,
- Mikroorganizma (hücre içi bakteri, virüs, bakteri ve alg) sayısı (Binet ve ark., 2006) ve tür analizi yapılması (Collier & Campbell, 1999)

- Parazit, mantar belirlenmesi,
- Hücre zar geçirgenliği ve potansiyelinin değerlendirmesi,
- Hücre kültüründe virüs, bakteri, hücre sayımı,
- Bağlı klorofil içeriği ne bağlı alt populasyonların, türlerin ve bireylerin belirlenmesi (Heidi ve ark., 1989; Dignum ve ark., 2004),
- Nötral yağ içeriğinin belirlenmesi,
- Hücreler arası serbest kalsiyum ölçümü,
- Hücre pH ölçümü,
- Hücre büyüme dinamikleri, eğrilerinin çıkarılması (Forget ve ark., 2010)
- Alglerde toksik madde etkileri LC50 değerlerinin bulunmasında (Franklin ve ark., 2001; Kong ve ark., 2007),
- Alglerde sitotoksik çalışmalarda (Franqueira ve ark., 2000; Li & Yang, 2003),
- Ekotoksikolojik çalışmalarda (Stauber ve ark., 2001).

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin incelenmesidir. "Flow" sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (Taneli 2007). Flow sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Flow sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granularite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği (da Silva & Reis, 2008), enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir. Çok küçük olmaları nedeniyle belirlenmeleri çok zor olan virusler (Baculoviridae, Herpesviridae, Myoviridae, Phycodnaviridae, Picornaviridae, Podoviridae,

Retroviridae, and Siphoviridae) özel boyalar ile (SYBR Green I, SYBR Green II, OliGreen, PicoGreen) flow sitometri ile belirlenebilir (Brussaard ve ark., 2000).

Başta tıpta hematoloji, immünoloji, patoloji kullanım alanı bulan flow Sitometrinin hidrobiyolojide kullanım alanlarını özetlenmesi, flow Sitometrinin çalışma prensibinin, uygulama alanlarının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Flow sitometrinin çalışma ilkesi

Flow sitometri cihazında bir sıvı içinde yer alan her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırma ve geçirme şeklinde okunurken yayınlanan fluoresen ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, bilgisayar ortamına aktarılır (Karaboz ve ark. 2008). Elde edilen veriler histogramlar olarak bilgisayar ortamına aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur (Olson ve ark. 2005). Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, fluoresen ışığı yayarlar (Olson ve ark. 2005) (Şekil 1).

Flow sitometride temel kısımlar:

- 1- Akışkan sistemi(fluidics system): Hidro dinamik odaklama ile örneğin tek tek lazer demetinin önünden sabit bir akış hızıyla düzenli geçmesinden sorumludur.
- 2- Laserler: Farklı dalga boyunda ışık verirler.
- 3- Optik system: İleri ve yana saçılma için lazer ışını ayarlar, farklı detektörlere farklı ışınların ulaşmasına izin verirler (Baumgarth & Bigos, 2004).
- 4- Detektörler Optik sistem tarafından ayrılmış olan farklı ışınların elektronik olarak algılanması ve değerlendirilmesini yapar.

- 5- Elektronik ve bilgisayara sistemi: detektörlere gelen elektronik bilginin değerlendirilmesi ve bilgisayar tarafında analiz edilerek kullanıcıya sunulması yapılır. Analiz sonunda elde edilen verilerin ileri yöntemler değerlendirilmesi mümkündür (Wilkins ve ark., 2001).

Flow sitometri cihazında bir sıvı içinde yer alan her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırma ve geçirme şeklinde okunurken yayınlanan fluoresen ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, bilgisayar ortamına aktarılır (Collier 2000, Taneli 2007) (Şekil 1.). Elde edilen veriler histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur (Olson ve ark. 2005).

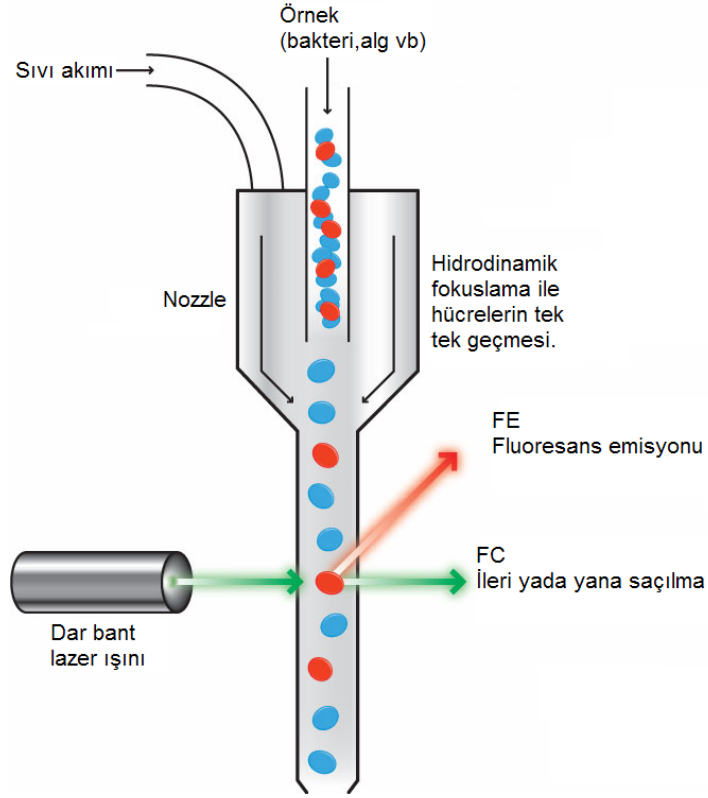
Temel olarak bir Flow sitometri cihazından

- 1- İleri saçılma grafiği (Forward scatter)
- 2- Yana saçılma grafiği (Side scatter grafiği)
- 3- Fluoresen grafiği (belli dalga boyuna has parıldama elde edilir. Elde edilen değerlerin 2'li, 3'lü değerlendirmesiyle bilgisayar ortamında yapılabilir.

Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır (Heidi ve ark. 1989). Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir (Şekil 2.). Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, fluoresen ışığı yayarlar (Olson ve ark. 2005).

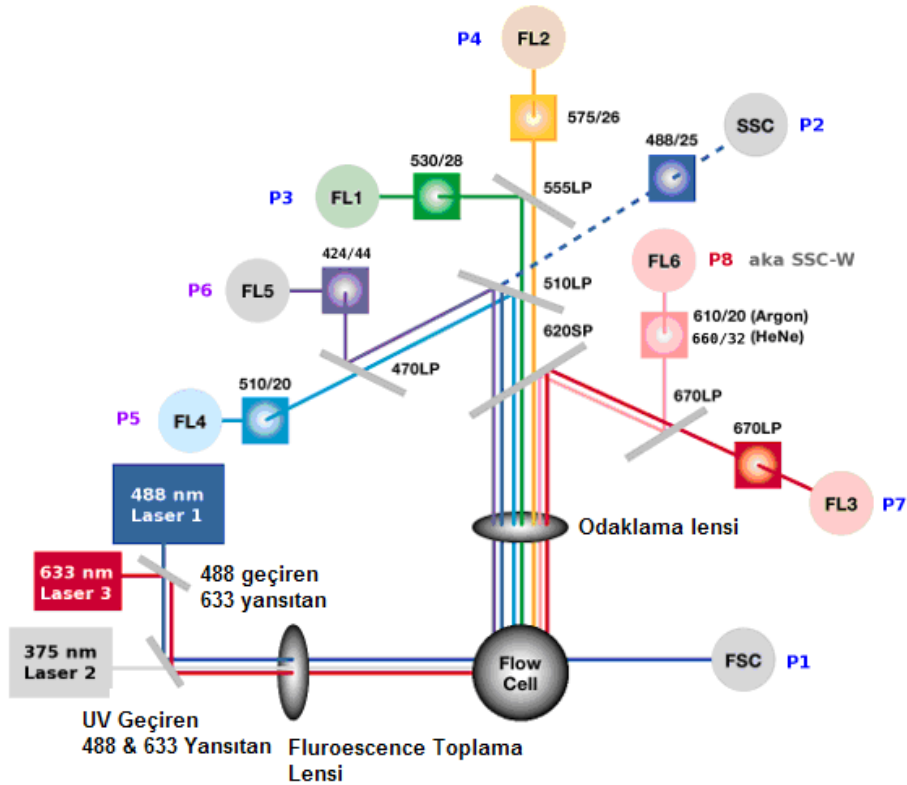
Sitometri her bir hücre için aynı anda birçok parametre ölçer:

- Hücre çapı ile yaklaşık orantılı olarak düşük acıda ileri saçılma yoğunluğu
- Hücre içindeki granül yapı sayısı ile yaklaşık orantılı olarak ortogonal (90°) saçılma yoğunluğu
- Birçok dalga boyundaki fluoresen yoğunluğu



Şekil 1. Flow sitometri cihazının temeli

Figure 1. The basis of flow cytometry device



Şekil 2. Laser sources and laser wavelengths used in flow cytometry.

Figure 2. Flow sitometri kullanılan lazer kaynakları ve lazer dalga boyları.

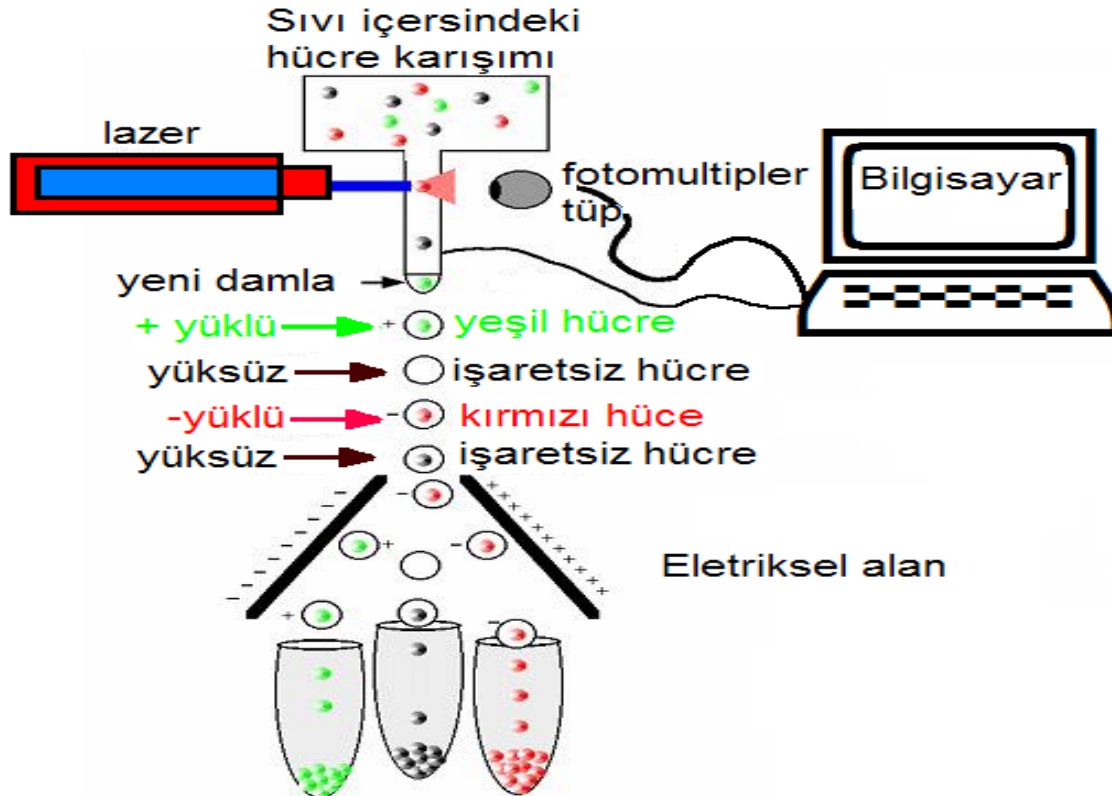
Flow sitometri cihazın ileri modelleri hücreleri ölçüm parametrelerine göre sınıflandırıp ayırabilir (Jones ve ark., 1989). Bu imkan özellikle saf kültür elde edilmesinde hızlı, kolay, ucuz bir yöntemdir (Dignum ve ark., 2004) (Şekil 3.). Flow sitometrik yöntemle belli parametrelere göre mikroskopik canlıların ayrılması (canlı olarak) saflaştırılması, canlılığının belirlenmesi kolaylıkla ve hızlı yapılabilir (Saunders ve ark., 1985).

Flow sitometri cihazı belirli boyalarla boyanmış olan partikülleri sayabilir, ayırabilir. Verileri bilgisayar ortamında değerlendirerek alt grupları (gate alma) oranlarını, sayılarını, kalibre edildiğinde ise boyutları hakkında yüksek hızda doğru sonuç verebilir.

Araştırmacıların farklı amaçlar için farklı tipteki partikülleri (mikroorganizmalar, dokular, canlı yada cansız yapılar) gerekli ayar yada kalibrasyonları yaparak analizleri yapabilir. Flow sitometri cihazın floresen özeliği granüleyi ölçen bunu çok hızlı ve doğru bir şekilde yapan bir

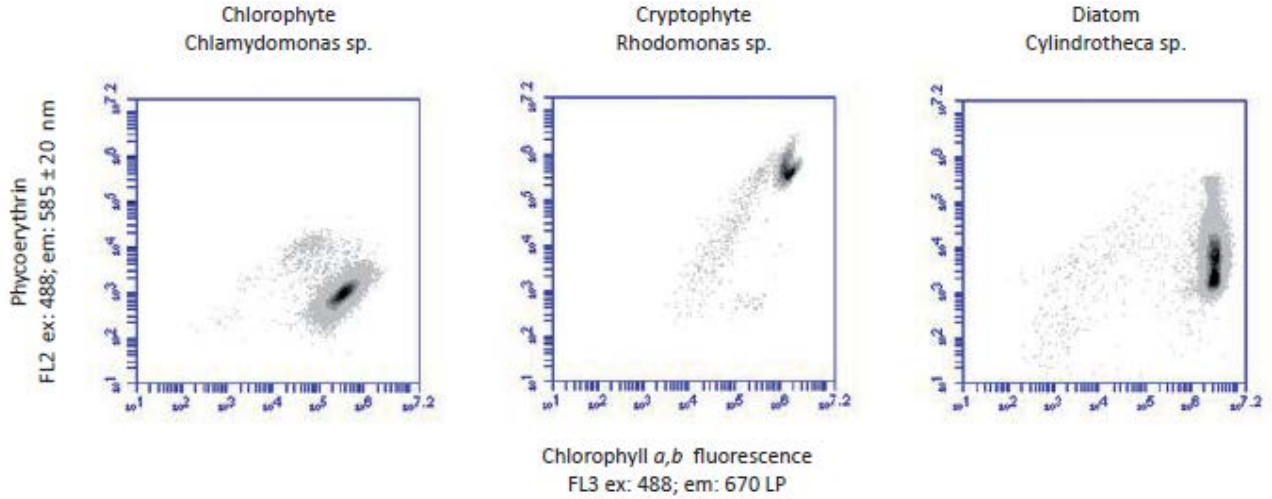
analiz cihazı olduğu ve uygun her hücre, partikül ve yapı ile farklı onlarca analizin yapılabilmesi unutulmamalıdır (Dignum ve ark. 2004). Aynı şekilde sınıflandırılan hücrelerin ayrılmasında yapılabilir (Şekil 3.).

Alglerin su ortamında direk olarak sayısının ve türlerinin belirlenmesi sağlayan flow sitometri cihazının protipi ilk kez 1960 yılında geliştirildi. (Şekil 4.). Flow sitometri ile optik ölçümler, siyanobakterler, proklorofitler, kokolitofitler, pennat diatomlar ve kriptofitler gibi fitoplanktonları ve gruplarını tanımlamak ve saymak için kullanılabilir (Collier ve Campbell 1999). Yeni geliştiren otomatik örnekleme cihazları örnekleme, analiz işlemlerini güneş enerjisi ile yapabilmektedir. Bu şekilde karadan bağımsız olarak, tüm yıl istenen sıklıkta ve derinlikte veri toplaması yapılabilir (Barnaba ve ark., 2006). Üstelik gelecekte çok daha gelişmiş araçlarla daha fazla veri daha ucuza toplayabilecektir.



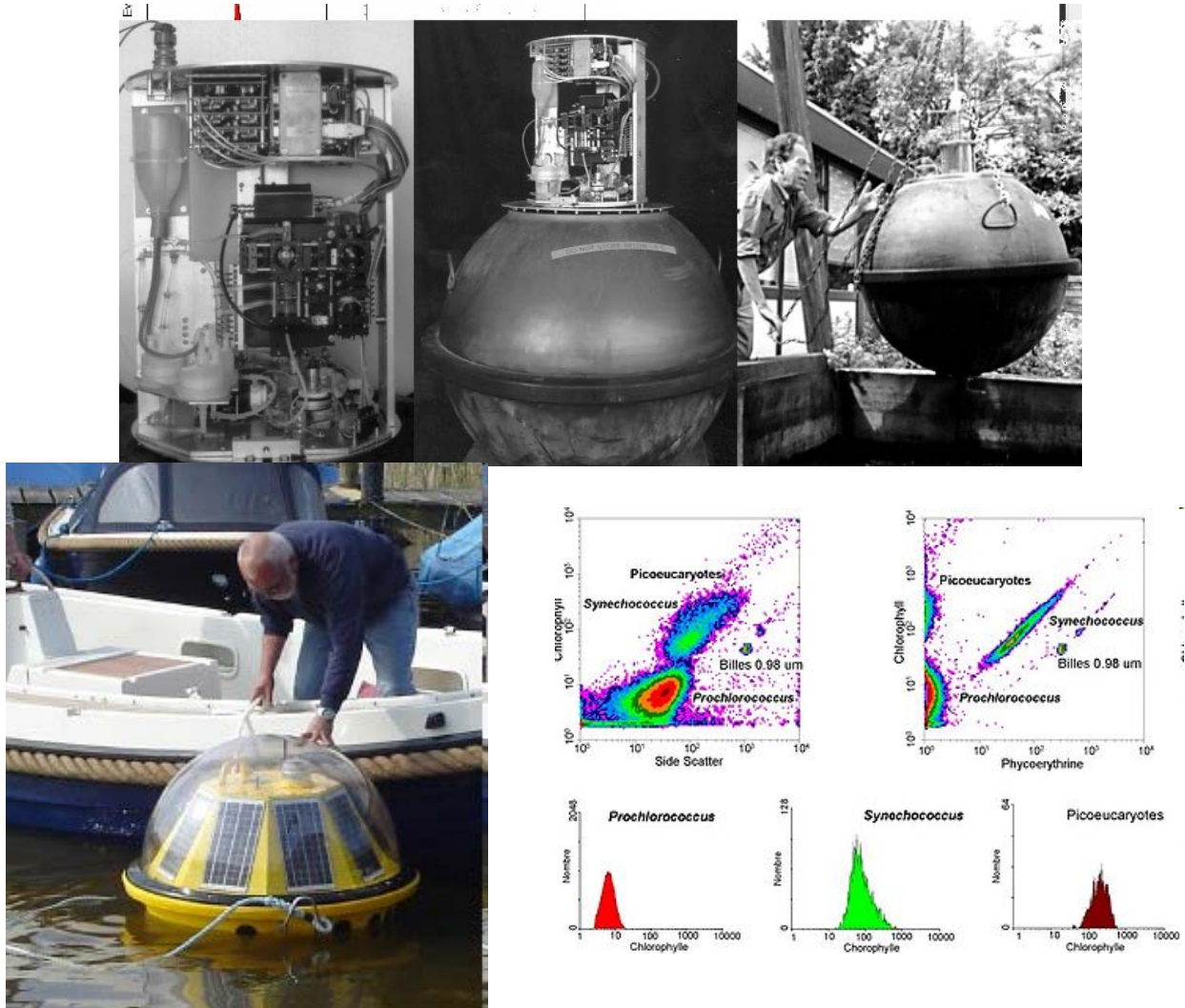
Şekil 3. Flow sitometri ile hücre ayırma

Figure 3. Flow cytometry and cell sorting



Şekil 4. Flow sitometr ile farklı türdeki alglerin sayısını ve türünün belirlenmesi

Figure 4. Determination of the number and type of different types of algae by flow cytometry



Şekil 5. Alg analizi yapan ilk prototip ve son hali.

Figure 5. The fist prototype which anayles algae and next generation.

Flow Sitometrinin Avantajları

- **Hız:** Teknik hızlıdır, saniyede binlerce partikül sayımı yapabilir.(tek hücreli florusans özelliği olan canlıların çok kısa zamanda çok duyarlı olarak sayılmasına izin verir(Stauber ve ark., 2002).
- **Duyarlılık:** Yüksek duyarlılıkla analiz yapma imkanı vardır (Her bir dalga boyunu yada her bir partikül boyunun ayrı ayrı sayılması mümkündür).
- **Doğruluk:** Tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ve fluorosen ölçümleri için varyasyon sabiti (CV=standart sapma/ortalama); %1 küçüktür
- **Gruplama:** Flow sitometrinin en güçlü ve kendisine özgü avantajı, herhangi bir optik karakteristiğe veya bunların kombinasyonlarına bağlı olarak hücrelerin fiziksel olarak birbirlerinden ayırabilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur (Olson ve ark. 2005).
- Yıl boyunca farklı noktalarda farklı derinliklerden alınan örneklerinin sürekli ölçümü yapılabilir (Şekil 5.).
- Flow sitometri cihazlarının kurulun maliyetleri yüksek olmasına karşın, kullanım bakım maliyetleri düşüktür.

Flow Sitometrinin Dezavantajları

- **Sınırlı çözümüleme:** Flow sitometreler tipik olarak sadece ileri yapısal detayları değil de pik yapan veya entegre sinyalleri ölçebilir. Ayrımı yapılacak olan partikül (örneğin fitoplanktondaki) morfolojik özellikleri dikkate almaz. Bu sorun ölçüm yapılması istenen partikülere özel olarak bağlanan yada incelenemesi istenen yapı dışında tüm yapılara bağlanan optik olarak aktif kimyasallarla çözülebilir.
- **Küçük örnek boyutu:** Birçok flow sitometri çok küçük hacimleri (<0.5 mm) analiz eder. Oysa, hücreler en az yaklaşık 10^3 /ml olarak bulunurlar. Bu nedenle flow sitometri cihazının doğru şekilde kalibre ve ayarlanması gerekir. Flow sitometreler çok doğru ölçümler yapabiliyor olmalarına rağmen, bu ölçümler kullanılan örneğin

özelliğine göre kalibrasyonuna bağlıdır (Olson ve ark. 2005).

Sonuç

Flow sitometri temel olarak bir analiz yöntemidir. Kullanım alanı yoğun olarak tıpta özellikle hematolojide öne çıkmaktadır. Ancak bir analiz yöntemi olarak çok farklı konularda farklı metod ve yöntemlerde kullanılma imkanı vardır. Özellikle farklı dalga boylarında boyanma, ışın yapma imkanı olan tek hücrelilerde (özellikle algler) alternatif yöntem metodlara göre daha kesin, ucuz ve hızlı sonuç alma imkanı vardır.

Günümüzde flow sitometri hızla gelişmeye devam etmektedir. Özellikle partikül (hücre) belirleme dışında ayırma işlemi yapan özel sistemler geliştirilmiştir. Bu yolla yalnız belirleme değil, ayırma işlemi içinde Flow sitometri kullanılabilir. Flow sitometri gelecek yıllarda daha etkin analiz, ayırma yapabileceği, kullanım alanının genişleyeceği düşünülmektedir. Bu noktada araştırmacıların flow sitometri haberdar olup, öğrenmeleri, uygulamaları ve araştırmalarında bir seçenek olarak değerlendirmeleri gerekmektedir. Flow sitometrimin bir araç olduğu bu araçla araştırmacıların amaçına yönelik eylemlerin çok hızlı, duyarlı, hassas, ucuz yapılabileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir.

Kaynaklar

- Alice, L.,G., (2004). Flow Cytometry, Protocols Methods in Molecular Biology, **263**: 1-31. DOI: 10.1385/1-59259-773-4:001
- Brussaard C.P.D ., Dominique, M., Gunnar B., (2000). Flow cytometric detection of viruses, *Journal of Virological Methods*, **85**: 175-182. [doi:10.1016/S0166-0934\(99\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00167-6)
- Collier, J.,L., (2000). Flow Cytometry and The single cell in Phycology, *Journal of Phycology*, **36**: 628-644. [doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99215.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99215.x)
- Collier, J.,L., Campbell L., (1999). Flow cytometry in molecular aquatic ecology, *Hydrobiologia*, **401**: 33-53. [doi:10.1023/A:1003769806881](https://doi.org/10.1023/A:1003769806881)
- Demirel, D., (1995). Flow Sitometrik DNA analizinin Temel Prensipleri, *Türk patoloji Dergisi*, **11**(2): 64-65.

- Dignum, M., Hoogveld, H.L., Matthijs, H.C.P., Laanbroek, H.J., Pel, R., (2004). Detecting the phosphate status of phytoplankton by enzyme-labelled fluorescence and flow cytometry, *FEMS Microbiology Ecology*, **48**: 29-38.
[doi:10.1016/j.femsec.2003.12.007](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.007)
- Dunphy, C.H., (2004). Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **128**(9): 1004-1022.
- Barnaba, F., Fiorani, L., Palucci, A., Tarasov, P., (2006). First characterization of marine particles by laser scanning flow cytometry, *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, **102**(1): 11-17.
[doi:10.1016/j.jqsrt.2006.02.051](https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2006.02.051)
- Baumgarth, N., Bigos, M., (2004). Optimization of emission optics for multicolor flow Cytometry. *Cytometry, 4th Edition: New Developments*, **75**: 3-22.
- Dignum, M., Hoogveld, H.L., Matthijs, H.C.P., Laanbroek, H.J., Pel, R., (2004). Detecting the phosphate status of phytoplankton by enzyme-labelled fluorescence and flow cytometry, *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 29-38. [doi:10.1016/j.femsec.2003.12.007](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.007)
- Dunphy, C.H., (2004). Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **128**(9): 1004-1022.
- Forget, N., Belzile, C., Rioux, P., Nozais, C., (2010). Teaching the microbial growth curve concept using microalgal cultures and flow cytometry, *Journal of Biological Education*, **44**(4): 185-189.
[doi:10.1080/00219266.2010.9656220](https://doi.org/10.1080/00219266.2010.9656220)
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P., (2001). Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(1): 160-170.
[doi:10.1002/etc.5620200118](https://doi.org/10.1002/etc.5620200118)
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C., Cid, A., (2000). Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae, *Science of the Total Environment*, **247**(2-3): 119-126.
[doi:10.1016/S0048-9697\(99\)00483-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00483-0)
- Heidi, M.S, Sallie, W.C., Olson, R.J., (1989). Chlorophyll Fluorescence from single Cells: Interpretation of Flow Cytometric Signals, *Limnology and Oceanography*, **34**(8): 1749-1761.
[doi:10.4319/lo.1989.34.8.1749](https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.8.1749)
- Johnson, K.W., Dooner, M, Quesenberry, P.J., (2007). Fluorescence activated cell sorting: a window on the stem cell, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **8**(3): 133-9.
[doi:10.2174/138920107780906487](https://doi.org/10.2174/138920107780906487)
- Jones, B.M., Nicholson, J.K.A., Holman, R.C., & Hubbard, M. (1989). Comparison of Monocyte Separation Methods Using Flow Cytometric Analysis, *Journal of Immunological Methods*, **125**(1-2): 41-47.
[doi:10.1016/0022-1759\(89\)90076-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90076-8)
- Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S., (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab OnLine Mikrobiyoloji Dergisi)* **06**(2): 01-18
www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080201.pdf.
- Kong, F.X., Yu, Y., Wang, M.L., Qian, L.L., Shi, X.L. (2007). Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **66**(1): 49-56.
[doi:10.1016/j.ecoenv.2005.10.014](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.014)
- Laane, E., Tani, E., Bjorklund, E., Elmberger, G., Everaus, H., Skoog, L., Porwit-Mac Donald. A., (2005). Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle spirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma, *Cytometry Part B Clinical Cytometry*, **64**(B1): 34-42.
[doi:10.1002/cyto.b.20043](https://doi.org/10.1002/cyto.b.20043)
- Li, Z., Yang, M.J. (2003). The application of flow cytometry in toxicology, *Toxicology*, **191**(1): 55-55.
- Olson, R.J., Zetter, E.R., Anderson, O.K., (2005). Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell type from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry, *Cytometry*, **10**: 636-693.
[doi:10.1002/cyto.990100520](https://doi.org/10.1002/cyto.990100520)
- Saunders, G.C., Jett, J.H., Martin, J.C., (1985). Amplified Flow-Cytometric Separation-Free

- Fluorescence Immunoassays, *Clinical Chemistry*, **31**(12): 2020-2023.
- Stauber, J.L., Franklin, N.M., Adams, M.S., (2001). New applications of flow cytometry in ecotoxicology, *Toxicology*, **164**(1-3): 37-37.
- Stauber, J.L., Franklin, N.M., Adams, M.S., (2002). Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae, *Trends in Biotechnology*, **20**(4): 141-143.
[doi:10.1016/S0167-7799\(01\)01924-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01924-2)
- Taneli, F., (2007). Flow Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **5**(2): 75-82.
- Wilkins, M.F., Hardy, S.A., Boddy, L., Morris, C.W., (2001). Comparison of five clustering algorithms to classify phytoplankton from flow cytometry data, *Cytometry*, **44**(3): 210-217.
[doi:10.1002/1097-0320\(20010701\)44:3<210::AID-CYTO1113>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010701)44:3<210::AID-CYTO1113>3.0.CO;2-Y)