

**ALERJEN SPESİFİK İMMUNOGLOBULİN E TAYİNİ
İÇİN YÜZEY PLAZMON BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF SURFACE PLASMON BIOSENSORS
FOR DETECTION OF ALLERGEN SPECIFIC
IMMUNOGLOBULIN E**

MUHAMMED ERKEK

DOÇ. DR NİLAY BERELİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

*"Dünyada her şey için,
medeniyet için, hayat için, başarı için en hakiki mürşit ilimdir, fendir.
İlim ve fennin dışında yol gösterici aramak gaflettir,
doğru yoldan sapmaktır."*

MUSTAFA KEMAL ATATÜRK

Sevgili Canım Aileme...

ÖZET

ALERJEN SPESİFİK İMMUNOGLOBULİN E TAYİNİ İÇİN YÜZEY PLAZMON BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Muhammed ERKEK

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nilay BERELİ

Ocak 2022, 72 sayfa

Alerji dünya nüfusunun %10-20'sini etkileyen oldukça yaygın kronik bir hastalıktır. Alerji, yetişkin nüfusun %2'sini ve çocukların %8'ini etkilemektedir. Alerjik hastalıklar, solunum sisteminin toz ve polenlere, sindirim sisteminin belirli bir gıdaya, cildin bir kimyasal maddeye maruz kalması ile ortaya çıkabilir. Serumda, antijen-spesifik immunoglobulin E'nin (IgE) tayini antijene karşı aşırı duyarlılığı belirtir. IgE düzeyi alerjik durumlarda yükselir. Başlıca alerjenik kaynaklar polenler, besinler, akarlar, küfler ve zehirlerdir. Bu nedenle astım, egzama ve saman nezlesi gibi alerjik hastalıkların teşhisi için IgE düzeyindeki artış önemlidir. Alerjen tespiti için geleneksel yöntemler genellikle enzimatik etiketleme gerektiren Enzim-bağlı immunosorbent analizi (ELISA) tekniğidir. Bu etiketleme süreci zaman alıcıdır ve hedef biyomoleküllerin immunokimyasal aktivitesini değiştirebilir. Yüzey plazmon rezonans (SPR), biyomoleküller arasındaki etkileşim ölçümü için iyi bilinen bir teknolojidir. Bu tez kapsamında alerjen-spesifik serum IgE tayini için optik temelli yüzey plazmon rezonans biyosensörler hazırlanmıştır. SPR biyosensör çip yüzeyi öncelikle 3-merkaptopropionik asit ile işlevleştirilmiştir. N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)karbodiimid (EDC)/sülfo-N-hidroksisülfosüksinimit (NHS) ile aktive edilmiş karboksilik asit fonksiyonlarına kovalent bağlanması

gerçekleştirilmiştir. Antikor üzerindeki terminal amin grupları ile Anti-immüoglobulin E daha sonra tanıma bölgeleri olarak yüzeye immobilize edilmiştir. Hazırlanan SPR biyosensor çip yüzeyi temas açısı, atomik kuvvet mikroskop (AFM) ve elipsometre ile karakterize edilmiştir. Yüzey pürüzlülük değerleri boş çip yüzeyi ve modifiye edilmiş çip yüzeyi için sırasıyla 0.28 nm ve 8.36 nm olarak bulunmuştur. IgE tayini 1.0 ng/mL-1000 ng/mL derişim aralığında yürütülmüştür. SPR biyosensörde plazma ve sulu çözeltilerde IgE'nin tayini yaklaşık 10 dakika analiz süresiyle çok seçici bir şekilde gerçekleştirilmiştir. IgE tayin sınırı (LOD) 0.22 ng/mL olarak bulunmuştur. Albumin, immunoglobulin G, miyoglobin proteinleri ile seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmaları SPR biyosensor sistemine ard ard 5 defa IgE örnkeleri verilerek sinyal yanıt kararlılığı incelenmiştir. Tasarlanan SPR biyosensor çiplerin yüzey homojenliğini incelemek için Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri hesaplanmıştır. Hem çiplerde adsorpsiyon davranışı, Langmuir izoterm modeline uygun olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Alerji, İmmunoglobulin E, Yüzey Plazmon Rezonans, Biyosensörler.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SURFACE PLASMON BIOSENSORS FOR DETECTION OF ALLERGEN SPECIFIC IMMUNOGLOBULIN E

Muhammed ERKEK

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Nilay BERELİ

January 2022, 72 pages

Allergy is a mysterious chronic disease that causes the digestive system to be exposed to certain foods, the respiratory system to dust or pollen, or the skin to chemicals. Allergy is a very common disease affecting 10-20% of the world's population. Allergy affects 2% of the adult population and 8% of children. Immunoglobulin E (IgE) level rises in allergic conditions. The main allergenic sources are pollen, foods, mites, molds and poisons. Therefore, the increase in IgE level is important for the diagnosis of allergic diseases such as asthma, eczema and hay fever. Food allergy is defined by the adverse reactions of the immune system when triggered by the consumption of certain foods. Food allergy reactions occur as a result of the recognition of allergenic proteins by allergen-specific IgE antibodies. For some allergic individuals, selective food contact can develop into life-threatening reactions (such as anaphylactic shock). Traditional methods for allergen detection are Enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA), which usually requires enzymatic labeling. This labeling process is time consuming and can alter the immunochemical activity of target biomolecules. Surface plasmon resonance (SPR) is a well-known technology for the measurement of interactions between biomolecules. In this thesis, optical-based surface plasmon resonance biosensors were prepared for

allergen-specific serum IgE determination. The SPR biosensor gold chip surface is primarily functionalized with 3-mercaptopropionic acid. The covalent coupling of N-ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) has been performed to activate carboxylic acid functions. Anti-immunoglobulin E (anti-IgE) with terminal amine groups on the antibody were then immobilized to the surface as recognition sites. The prepared SPR biosensor chip surface was characterized by the contact angle, atomic force microscope (AFM) and ellipsometry. Surface roughness values were found as 0.28 nm and 8.36 nm for the bare chip surface and the modified chip surface, respectively. The detection of IgE has been carried out in the broad range of 1.0 ng/mL-1000 ng/mL. The detection of IgE was performed with the SPR biosensor in plasma and aqueous solutions very selectively with an analysis time of approximately 10 minutes. The limit of detection (LOD) value for IgE was found to be 0.22 ng/mL. Selectivity studies were performed with albumin, immunoglobulin G, and myoglobin as similar proteins. In reusability studies, IgE samples were given to the SPR biosensor system five times in a sequence and were examined the stability of the signal response. Scatchard, Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich adsorption isotherm models were calculated to examine the surface homogeneity of the designed SPR biosensor gold chips. The adsorption behavior of both chips was found following the Langmuir isotherm model.

Keywords: Allergy, Immunoglobulin E, Surface Plasmon Resonance, Biosensors

TEŞEKKÜR

Bütün emeğimle hazırladığım ve Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamda;

*Engin bilgi birikimi ve tecrübesiyle çalışmalarımın titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, değerli hocam **Prof. Dr. Adil Denizli**' ye,*

*Tez çalışmalarım süresince güler yüzüyle enerji veren, her türlü sorunuma zaman ayıran, ilgisi ve samimiyetinin yanında bilimsel katkı ve desteğini hep hissettiğim, çok sevdiğim değerli hocam, tez danışmanım **Doç. Dr. Nilay Bereli**' ye,*

*Tez dönemim boyunca bilimsel katkılarını, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen bilgi birikimini ve düşüncelerini benimle paylaşan değerli hocam **Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz**' e,*

*Tez çalışmam süresince, her zaman desteğini yanımda hissettiğim, değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmam üzerinde büyük yardımları dokunan, değerli hocam **Öğr. Gör. Dr. Semra Akgönüllü**' ye*

*Enerjisiyle, neşesiyle beni motive eden, üzüntümde, mutluluğumda yanımda olan, dinleyen, çözüm arayan ve bulan, güler yüzüyle, desteğini hep hissettiğim değerli, kıymetli manevi ablam dediğim **Arş. Gör. Merve Çalışır**'a,*

*Yüksek lisans öğrenimim süresince tecrübelerinden yararlandığım, **Doç. Dr. Deniz Türkmen, Arş. Gör. Dr. Duygu Çimen, Arş. Gör. Dr. Sevgi Aslyüce Çoban** başta olmak üzere **Doç. Dr. Fatma Yılmaz, Dr. Öğr. Üyesi Yeşeren Saylan, Dr. Öğr. Üyesi Erdoğan Özgür, Arş. Gör. Dr. Ilgım Göktürk Başal, Dr. Monireh Bakhspour** ve **Bioreg** ailesinin diğer tüm üyelerine,*

*Sadece tezimde değil, yaşamımın büyük çoğunluğunda yanımda olan, birlikte geçirdiğimiz lisans ve yüksek lisans öğrenimlerimiz boyunca, her zaman yanımda hissettiğim, tez sürecinde en büyük destekçim **Burcu Akbulut**'a*

*Hayatım boyunca desteklerini benden hiç esirgemeyen en büyük destekçilerim **Canım Aileme**,*

Sonsuz, sevgi ve saygılarımı sunarım...

Muhammed ERKEK

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmünoglobulinler.....	3
2.2. İmmünoglobulin E (IgE)	7
2.2.1. İmmünoglobulin E (IgE) Yapısı.....	8
2.2.2. İmmünoglobulin E Reseptörleri	9
2.3. Alerjik Hastalıklar	10
2.4. Alerjenler.....	14
2.4.1. Alerjenlerin Sınıflandırılması.....	15
2.4.2. Analitler.....	15
2.4.3. Referans Aralıkları	16
2.4.4. Toplam Serum IgE Antikoru.....	16
2.4.5. Alerjene Özgü IgE Antikoru	16
2.4.6. Klinik Bulgular.....	17
2.4.7. Antibody Tayin Yöntemleri	18
2.5. Biyoalgılama teknolojileri.....	18
2.5.1. Yüzey Plazmon Rezonans	21
2.5.2. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Teorisi.....	23
2.5.3. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler.....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	28
3.1. Kimyasal Malzemeler	28

3.2. SPR Biyosensör Altın Çip Yüzey Modifikasyonu	28
3.3. SPR Biyosensör Karakterizasyon Çalışmaları.....	29
3.3.1. Temas Açısı	29
3.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....	30
3.3.3. Elipsometre	31
3.4. IgE Tayini için Kinetik Çalışmaları.....	32
3.4.1. Optik Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi.....	32
3.4.2. pH Etkisi	33
3.4.3. IgE Tayini	33
3.4.4. Seçicilik Çalışmaları	34
3.4.5. Yapay Plazma Çalışmaları.....	34
3.4.6. Tekrar Kullanılabilirlik	34
3.5. Adsorpsiyon İzoterm Modeli	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	40
4.1. SPR Biyosensör Çiplerinin Karakterizasyonu	40
4.1.1. Temas Açısı Sonuçları	40
4.1.2. AFM Sonuçları	42
4.1.3. Elipsometre Sonuçları.....	43
4.2. Kinetik Çalışmaları	44
4.2.1. pH Etkisi Sonuçları.....	45
4.2.2. Total IgE Tayini.....	45
4.3. Seçicilik Sonuçları	47
4.4. Tekrarlanabilirlik Sonuçları.....	49
4.5. SPR Biyosensörün Kinetik Modeli.....	50
4.6. Langmuir ve Freundlich İzoterm Modeli.....	52
4.7. Literatür Özeti.....	54
5. YORUM.....	60
6. KAYNAKLAR	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Salgılanan beş ana antikorun sınıfının genel yapıları.	5
Şekil 2.2. İmmüoglobulinlerin (Ig) genel yapısı.	6
Şekil 2.3. İmmüoglobulin E molekül yapısı.....	7
Şekil 2.4. IgE'nin yapısı.	9
Şekil 2.5. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.6. Duyarlılaşma ve sonrası alerjen teması sırasında meydana gelen immünolojik hücresel olaylar. Ag = antijen veya alerjen, APC, antijen sunan hücre; Th, T yardımcı hücre; IL, interlökin.....	13
Şekil 2.8. Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonları.....	17
Şekil 2.9. Herhangi bir biyosensörün sinyal işleminde yer alan farklı adımların resimli açıklaması.	19
Şekil 2.10. Spesifik İmmüoglobulin E'lerin tayini için biyoalgılama teknolojilerinin sınıflandırılması.	19
Şekil 2.11. Scopus, Haziran 2021 verileri göre Yüze Plazmon Rezonans (SPR) optik sensörleri ile yapılan literatür çalışmaları.....	21
Şekil 2.12. Bir dielektrik ve bir iletken malzeme arayüzünde ışıkla uyarılan yüze plazmon rezonansının (SPR) gösterimi.	26
Şekil 2.13. SPR biyosensör ile analitin bağlanmasının izlenmesi için tipik bir sensorgram.....	27
Şekil 3.1. SPR biyosensör çip yüzeyinin hazırlanmasının şematik gösterimi.	29
Şekil 3.2. Temas Açısı Krüss DSA cihazı görüntüsü.....	30
Şekil 3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) cihazı görüntüsü.	31
Şekil 3.4. Elipsometre cihazı görüntüsü.....	32
Şekil 3.5. SPR biyosensör sistemi ve altın çip görüntüsü.	32
Şekil 4.1. Temas açısı sonuçları (a) boş çip yüzey görüntüsü; (b) 3-MPA modifiye edilmiş çip yüzey görüntüsü; (c) EDC-NHS/anti-IgE modifiye edilmiş çip yüzey görüntüsü.....	41
Şekil 4.2. (a) Boş çip; (b) modifiye edilmiş SPR biosensör çip.....	43
Şekil 4.3. Modifiye edilmiş çipin elipsometre görüntüsü.....	44

Şekil 4.4. Farklı pH tamponu ile yapılan IgE tayini sensorgram grafiği; Derişim: 100 ng/mL; Sıcaklık: 24 °C.....	45
Şekil 4.5. SPR biyosensör ile 0-1000 ng/mL derişim aralığındaki total IgE örnekleri arasındaki etkileşimlere ait sinyallerin sensogram grafiği; (a) PBS 7.4 denge çözeltisi; (b) adsorpsiyon adımı; (c) desorpsiyon adımı.....	46
Şekil 4.6. SPR biyosensör ile derişime bağılı kalibrasyon grafiği: 0 ng/mL-1000 ng/mL IgE; PBS 7.4 tamponu.	47
Şekil 4.7. Proteinlerin yapısı: (a) IgE; (b) BSA; (c) IgG; (d) Myb.....	48
Şekil 4.8. SPR biyosensör çipin seçicilik sonuçları; Derişim: 100 ng/mL PBS pH 7.4 tamponu.	48
Şekil 4.9. SPR biyosensör çipin seçicilik sonuçları; Yapay plazma.....	49
Şekil 4.10. SPR biyosensörün tekrarlanabilirlik sonuçları: Derişim 500 ng/mL.....	50
Şekil 4.11. SPR biyosensördeki hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel modellemeler; Scatchard izoterm modeli.....	51
Şekil 4.12. SPR biyosensördeki hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel modellemeler; Bağılanma kinetiği.	51
Şekil 4.13. Modifiye edilmiş SPR biyosensör Langmuir modeli.	53
Şekil 4.14. Modifiye edilmiş SPR biyosensör Freundlich modeli.....	53
Şekil 4.15. Modifiye edilmiş SPR biyosensör Langmuir-Freundlich modeli.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İmmünoglobulin (Ig) alt tiplerinin ayrıntıları	4
Çizelge 2.2. IgE proteinin özellikleri.	8
Çizelge 2.3. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının sınıflandırılması ve aracı moleküller	10
Çizelge 2.4. Gell ve Coombs'a göre aşırı duyarlılık reaksiyonlarının sınıflandırılması.	11
Çizelge 2.5. Aşırı duyarlılık belirtileri. Semptomlar genellikle antijene maruz kalan atomik bölgelere yerleşir.	12
Çizelge 2.6. Spesifik IgE'leri belirlemek için önerilen yaklaşımların analizi.	20
Çizelge 3.1. Adsorpsiyon modelleri.	35
Çizelge 4.1. SPR biyosensör çiplerine ait temas açısı değerleri.	40
Çizelge 4.2. SPR biyosensör film kalınlıklarının sonuçları.	44
Çizelge 4.3. SPR çipin denge ve bağlanma kinetik parametre değerleri.	50
Çizelge 4.4. SPR biyosensörün Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modeli parametreleri.....	54
Çizelge 4.5. IgE tayini için yapılan biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması.....	55
Çizelge 4.6. İmmünglobun E tayini için elektrokimyasal biyosensörler.	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

H	Heavy
L	Light
V _L	Hafif Zincir Değişken Kısım
C _L	Hafif Zincir Sabit Kısım
V _H	Ağır Zincir Değişken Kısım
C _H	Ağır Zincir Sabit Kısım
T _H	T Yardımcı Hücre
K _d	Ayrışma sabiti
K _a	Bağlanma sabiti
K _L	Langmuir adsorpsiyon sabiti
K _f	Freundlich sabiti
C _e	Denge analiti
q _e	Analitin miktarı
b	Adsorpsiyon denge sabiti

Kısaltmalar

Ig	İmmünoglobülin
Fab	Antijen Bağlanma Fragment
Fc	Kristalize Olabilen Fragment
FcεRI	Yüksek Afiniteli Reseptör
FcεRII/CD23	Düşük Afiniteli Reseptör
Ag	Antijen veya Alerjen
APC	Antijen Sunan Hücre

IL	İnterlökin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
IUIS	Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği
PhRAST	Phadebas Radyoallergosorbent Testi
RAST	Radyoallergosorbent Testi
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
SPRi	Yüzey Plazmon Rezonans Görüntüleme
SPP	Yüzey Plazmon Polariton
RI	Kırılma İndisi
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma
LOD	Tayin Sınırı
AuNPs	Altın Nanopartiküller
SAM	Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar
BSA	Sığır Serum Albümin
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskoku
SAM	Self-Assembled Monolayer
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

1. GİRİŞ

Alerji gizemli bir kronik hastalıktır. Temas, solunum veya yiyecekler alerjiye neden olabilir. Alerjik hastalıklar, solunum sisteminin toz ve polenlere (veya diğer maddeler), sindirim sisteminin belirli bir gıdaya, cildin bir kimyasal maddeye maruz kalması ile oluşabilir [1]. Alerji terimi, kişilerin belirli maddeye maruz kaldığında ortaya çıkan belirtilere ve aşırı duyarlılığa dikkat çekmek için ilk defa 1906 yılında Clemens von Pirquet tarafından kullanılmıştır [2-4]. Anafilaktik şok, dermatit, alerjik rinit, besin alerjisi ve astım gibi atopik hastalıkların şiddetlenmesini önlemek için mast hücre aktivasyonuna neden olan antijenlerin tanınması oldukça önemlidir. Serumda, antijen-özgül immunoglobulin E'nin (IgE) tayini antijene karşı aşırı duyarlılığı belirtir [5]. IgE düzeyi alerjik durumlarda yükselir. Bu nedenle astım, egzama ve saman nezlesi gibi alerjik hastalıkların teşhisi için IgE düzeyindeki artış önemlidir. Duyarlı hastaların IgE düzeyleri serumda 0.3 µg/mL civarındadır [6]. Alerji, dünya nüfusunun %10-20'sini etkileyen oldukça yaygın bir hastalıktır [7]. Alerji, yetişkin nüfusun %2'sini ve çocukların %8'ini etkilemektedir [8]. Hassas bireylerde, alerjenlerin vücuda alımı çok kısa sürelerde (dakika mertebesinde) sindirim bozukluğuna (ishal), solunumda (rinit, astım) ve dolaşımında (ödem, hipotansiyon) sıkıntılara, cilt reaksiyonlarına (ürtiker, dermatit/egzama) neden olabilir. Bazı alerjik kişiler için, seçici bir gıda ile temas yaşamı tehdit eden reaksiyonlara (anafilaktik şok) dönüşebilir [8,9].

Son yirmi yılda biyosensör yaklaşımların klinik araştırma çalışmalarında kullanımı önemli bir rol oynamıştır. Biyosensörler, ELISA yöntemine potansiyel bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyosensörler hızlı, basit, yeniden kullanılabilir, ucuz ve çok noktalı algılama ile ilgili bazı önemli sorunları çözenin muhtemelen en umut verici yollarından birini sağlamaktadır. Biyosensörler, geleneksel yöntemlere potansiyel bir alternatiftir. Hem çevrimiçi (on-line) izleme ve gerçek zamanlı algılama sağlar hem de karşılaştırılabilir hassasiyetler ve seçicilik sunmaktadır. Biyosensörler biyolojik yanıtı ölçülebilir bir sinyale dönüştürerek moleküllerin ve/veya bileşiklerin tanınması ve tayin edilmesi için kullanılan çok popüler algılayıcı platformlardır. Gerçek zamanlı ve etiketsiz olarak yüksek hassasiyetle algılama platformları olarak optik temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır. SPR biyosensör 50-100 nm

altın film ile kaplanmış bir sensör çip yüzeyine herhangi bir etiketleme olmaksızın moleküllerin bağlanması gerçek zamanlı ölçüldüğü bir sistemdir.

Bu tez kapsamında alerjen-spesifik serum IgE tayini için optik temelli yüzey plazmon rezonans biyosensörler hazırlanmıştır. SPR biyosensör çip yüzeyi öncelikle 3-merkaptopropionik asit ile işlevleştirilmiştir. N-etil-N'-(3-dietilaminopropil) karbodiimid (EDC)/sülfo-(N-hidroksisülfosüksinimit sodyum tuzu) NHS ile aktive edilmiş karboksilik fonksiyonlarına kovalent bağlanması gerçekleştirilmiştir. Antikor üzerindeki terminal amin grupları ile Anti-immüoglobulin E daha sonra tanıma bölgeleri olarak yüzeye immobilize edilmiştir. Hazırlanan SPR biyosensör çip yüzeyi temas açısı ve atomik kuvvet mikroskop (AFM) ile karakterize edilmiştir. Yüze pürüzlülük değerleri boş çip yüzeyi ve modifiye edilmiş çip yüzeyi için sırasıyla 0.28 nm ve 8.36 nm olarak bulunmuştur. IgE tayini 1.0 ng/mL-1000 ng/mL derişim aralığında yürütülmüştür. SPR biyosensörde plazma ve sulu çözeltilerde IgE'nin tayini yaklaşık 10 dakika analiz süresiyle çok seçici bir şekilde gerçekleştirilmiştir. IgE tayin sınırı (LOD) 0.22 ng/mL olarak bulunmuştur. Albümin, immunoglobulin G, miyoglobin proteinleri ile seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmaları SPR biyosensör sistemine ard ard 5 defa IgE örnekleri verilerek sinyal yanıt kararlılığı incelenmiştir. Bu tez kapsamında hazırlanan SPR biyosensör çiplerin yüzey homojenliğini incelemek için Scatchard, Langmuir, ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri hesaplanmıştır. Hem çiplerde adsorpsiyon davranışı, Langmuir izoterm modeline uygun olarak bulunmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmünoglobulinler

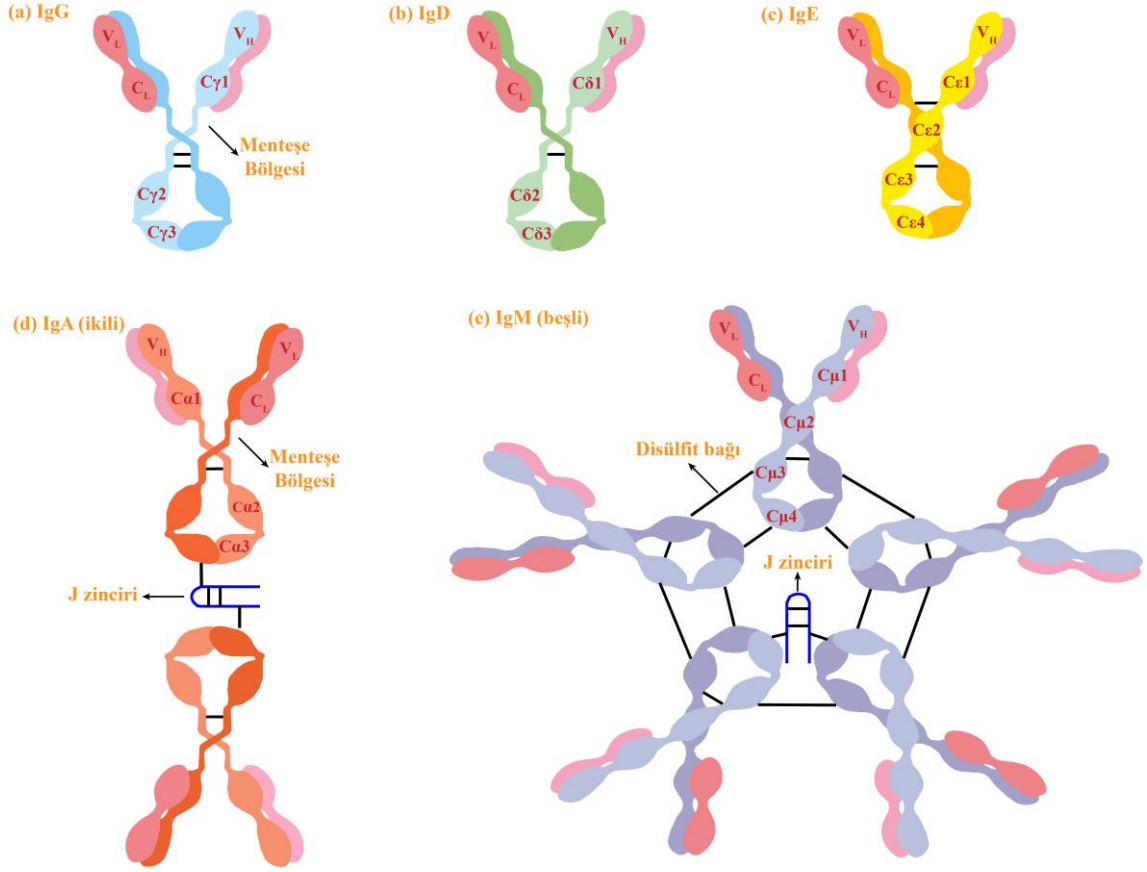
İmmünoglobulinler, immün (bağışıklık) korumada merkezi bir rol oynamaktadır. İmmünoglobulinler, plazma hücreleri tarafından sentezlenen glikoproteinlerdir. Vücutta B lenfositlerinin aktivesinde rol oynarlar ve vücuda giren yabancı madde karşı üretilirler ve yanıt verirler. Toplam plazma / serum proteinlerinin %20'sini içerirler ve kanda en bol bulunan proteinler grubu arasında yer almaktadır. İmmunoglobulinler spesifik yabancı molekül veya maddeleri nötralize ederler. İkincisi, antikorlar olarak adlandırılan ve konak savunmasında çeşitli işlevlere hizmet eden bir alt küme içerir. Doğrudan yabancı materyali öldürür veya hücre yıkımını fagositik hücreler tarafından alımını kolaylaştıran başka bir doğal protein grubu olan tamamlayıcı sistemi (komplement) aktive ederek çalışabilirler. Beş ana immünoglobulin (Ig) sınıfı tanımlanmıştır: IgA , IgG, IgM , IgE ve IgD [10]. İmmünoglobulin (Ig) alt tiplerinin ayrıntıları Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Farklı efektör fonksiyonları tetikleyerek, her biri bağışıklık tepkisine benzersiz bir katkı sağlar. Serumdaki ana antikor sınıfı olan IgG, istilacı bakteri ve virüslere karşı koruyucu mekanizmalar ortaya çıkarırken, IgE parazitik enfeksiyonlara karşı korumada rol oynar, ancak aynı zamanda alerji semptomlarından da sorumludur. IgA, serumda oldukça yüksek derişimlerde bulunurken, ana antikor sınıfı olduğu solunum ve mide bağırsak yollarının astarları gibi mukozal yüzeylerde anahtar rolünü yerine getirir. Esas olarak serumda bulunan IgM, büyük boyutunun dokulara hazır difüzyonu engellemesi nedeniyle, bakteri ve mantar istilacılarına birincil yanıtı sağlar. IgD'nin işlevi daha az ve belirgindir [11].

Çizelge 2.1. İmmünoglobulin (Ig) alt tiplerinin ayrıntıları

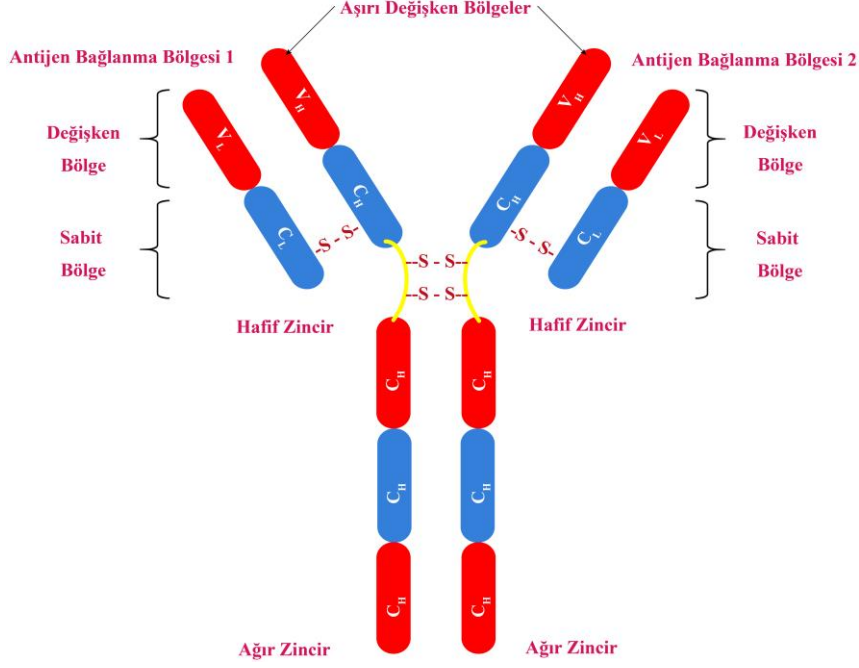
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Moleküler Ağırlığı	900 kDa	150 kDa	320 kDa	200 kDa	180 kDa
Normal Konsantrasyonları	0.5–2 g/L	10–16 g/L	1–4 g/L	10–400 µg/L	0–0.4 g/L
Fonksiyon	İkincil bağışıklık tepkisi: Hassas tepki	İkincil bağışıklık tepkisi: bağışıklık belleği	Açığa çıkan mukozal yüzeyde yerel bağışıklık tepkisi	Parazitlere karşı bağışıklık tepkisi	Antikor üretimi düzenleme
Anormal Durumlar		Multiple Miyelom ↑ İmmün yetmezlik ↓		Alerjik reaksiyonlar ↑	

İmmünoglobulinlerin sınıflandırılması; monomer yapıda (IgG, IgD ve IgE), sekonder yapıda (IgA) veya pentamer (IgM) olmak üzere değişiklik göstermektedir.



Şekil 2.1. Salgılanan beş ana antikorun sınıfının genel yapıları [12].

En basit antikor molekülü, dört polipeptit zincirinden oluşan bir "Y" şekline benzemektedir. Genel yapısı şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Antikor molekülleri birbirine paralel olarak bağlanan disülfür bağlarından oluşmaktadır. Bu disülfür bağlar iki özdeş ağır zincir (Ağır = Heavy = H) ve iki özdeş hafif zincirden (Hafif = Light= L) oluşmaktadır [13].



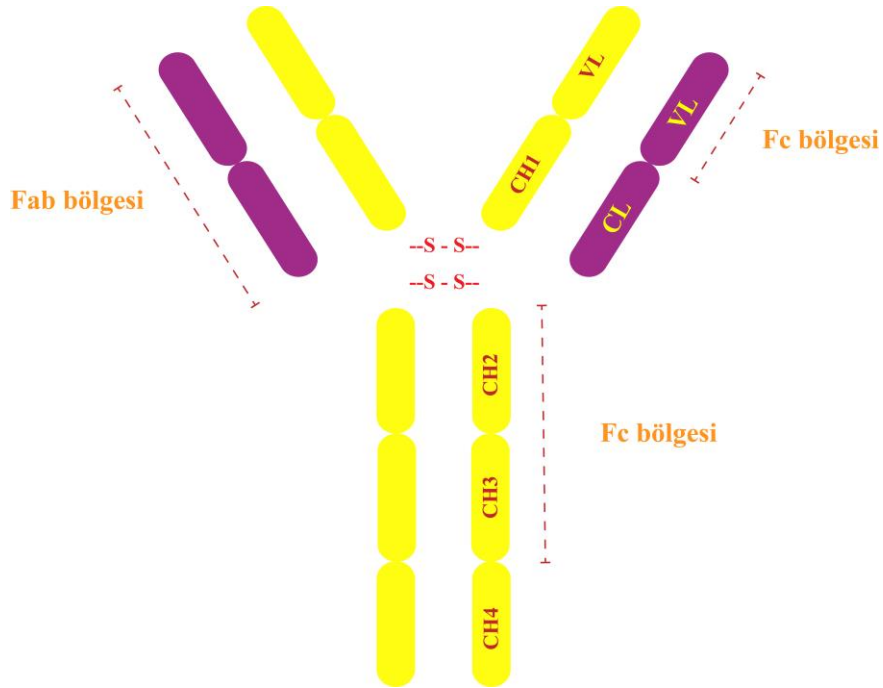
Şekil 2.2. İmmüoglobulinlerin (Ig) genel yapısı.

L zincirleri yalnızca bir değişken (V_L = değişken zincir) ve bir sabit (C_L = sabit zincir) alanından oluşurken, ağır zincirler, sırasıyla IgG/IgA ve IgM/IgE'ye karşılık gelen bir V_H (ağır zincirin değişken kısmı) ve üç ila dört C_H (ağır zincirin sabit kısmı) bölgelerine sahiptir. Antijen bağlanma bölgelerinin, L ve H zincirlerinin terminal uçlarının değişken bölgeler sunmasına olanak sağlar.

İki tür L zinciri vardır: λ (lambda) veya κ (kappa). Tüm Ig türlerinde bulunabilir, ancak asla birlikte bulunmamaktadır. H zincirleri Ig'ye özgüdür, γ (IgG), α (IgA), μ (IgM), ϵ (IgE) ve δ (IgD) olarak adlandırılır. Her ağır zincir, hafif zincirlere (~25 kDa) kıyasla iki kat daha fazla amino asit ve moleküler ağırlığa (~50 kDa) sahiptir. Bu da yaklaşık 150 kDa'lık bir toplam Ig monomer moleküler ağırlığıyla sonuçlanmaktadır. Sabit bölge Ig'ye biyolojik aktivitesini verirken, değişken bölgeler her spesifik antijenin bağlanması için karmaşık, konformasyonel bir moleküler düzenleme oluşturur [11].

2.2. İmmünoglobulin E (IgE)

İnsan immünoglobulin E (IgE), yaklaşık 190 kDa ağırlığında monomerik bir immünoglobulindir (Şekil 2.3) [14]. IgE, insan vücudundaki 5 antikor izotipinden biridir. IgE, B ve plazma hücreleri tarafından üretilirler ve aynı zamanda IgE'nin derişimi kan dolaşımında çok düşük miktarlarda bulunmaktadır. Kordon kanında genellikle 1.0 0U/mL'den (2.4 ng) daha az bulunur. İmmünoglobulin E, mast hücrelerine, bazofillere ve aktive olan eozinofillere bağlanır. Aşırı duyarlılık tepkileri üreten doğası gereği zararsız antijenler, alerjenler olarak adlandırılır [15].



Şekil 2.3. İmmünoglobulin E molekül yapısı [14].

İmmünoglobulin E, canlılarda bazofillerin ve mast hücrelerinin yüzey zarında mevcuttur. IgE bu hücreleri, IgE-spesifik alerjilere anahtar bir reaksiyon olan IgE antikor-alerjen etkileşimleri tarafından uyarılmaya karşı oldukça duyarlı hale getirir [16,17]. Mast hücre aktivasyonunu tetikleyen antijenlerin belirlenmesi, anafilaksi (alerjik şok), alerjik rinit (saman nezlesi), atopik dermatit (egzama), astım ve gıda alerjisi gibi atopik hastalıkların yoğunlaşmasını önlemek için çok önemlidir. Antijene karşı duyarlılık belirlenmesi için serumda antijene özgü IgE'nin belirlenmesi ile sağlanmaktadır [5]. IgG'nin derişimi yaklaşık olarak 10 mg/mL'ye yakındır ve IgE'nin derişimi ile kıyaslandığında vücutta eser serum proteini olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, toplam IgE seviyesi, hasta

seviyelerinin 290 ng. mL^{-1} 'in (120 IU.mL^{-1}) üzerinde bulunduğu atopik hastalıkların bir belirteci olarak geniş çapta rapor edilmektedir [18].

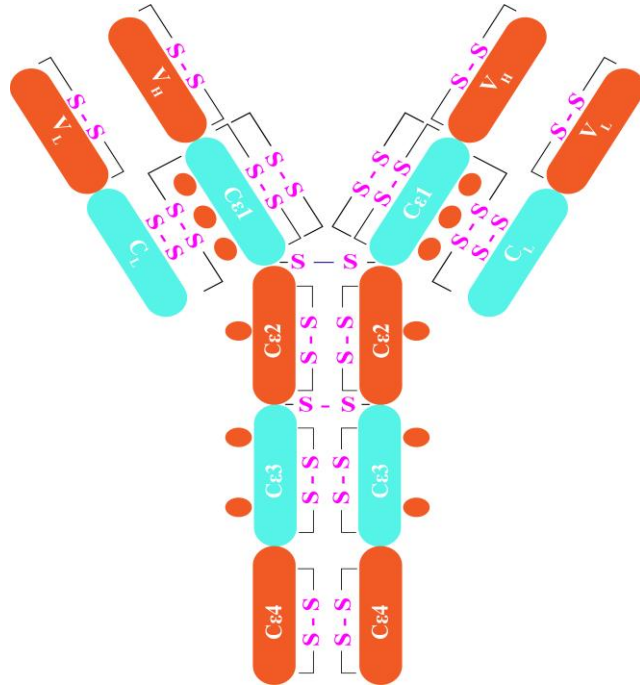
2.2.1. İmmüoglobulin E (IgE) Yapısı

Diğer herhangi bir sınıftaki antikorlar gibi IgE, dört polipeptit zinciri, iki ağır zincir ve iki λ (lambda) ya da κ (kappa) hafif zincirden oluşmaktadır, ana özellikleri Çizelge 2.2'de açıklanmıştır. IgE, IgM'nin μ (mü) zincirindekilere ($C_{\mu 1} - C_{\mu 4}$) karşılık gelen dört değişmez veya sabit (C) bölge alanı olan $C_{\epsilon 1} - C_{\epsilon 4}$ (Şekil 2.1) içeren ϵ (epsilon) ağır zincirleri ile karakterize edilir. IgE, IgG ile aynı şekilde Fab (antijen bağlayan fragman) ve Fc (kristalize olabilen fragman) parçalarına proteolitik olarak bölünebilir. Bölünme bölgesi $C_{\epsilon 1}$ ve $C_{\epsilon 2}$ arasındadır ve bu nedenle Fc fragmanı, zincir başına iki ($C_{\gamma 2}$ ve $C_{\gamma 3}$) immüoglobulin alanı yerine üç ($C_{\epsilon 2}$ - $C_{\epsilon 4}$) immüoglobulin alanı içerir [19].

Çizelge 2.2. IgE proteinin özellikleri.

Hücre Dağılımı	Kararlı ve Seçimli B Hücreleri
Moleküler Ağırlık	$\approx 190 \text{ kDa}$
Reseptör	$Fc\epsilon RI$ (yüksek afiniteli), $Fc\epsilon RII$ (düşük afiniteli), Galektin-3
Etki Alanı Yapısı – Ağır Zincir – Hafif Zincir (κ veya λ)	$V_H - C_{\epsilon 1} - C_{\epsilon 2} - C_{\epsilon 3} - C_{\epsilon 4}$ $V_L - C_L$
İzoformlar	Salgılanan ve uzun ve kısa membran formları

IgE'nin $C_{\epsilon 3} - C_{\epsilon 4}$ bölgesi ile IgG Fc arasındaki benzerlik ve IgG1 Fc'nin yüksek çözünürlüklü kristal yapısının varlığı, IgE yapısının bu bölgesinin bir modeli için temel oluşturmuştur. (Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. IgE'nin yapısı.

2.2.2. İmmüoglobulin E Reseptörleri

IgE, mast hücreleri, bazofiller ve mononükleer (tek çekirdekli) hücrelerde bulunan yüksek ve düşük afiniteli reseptörlerle etkileşime girer. IgE'ye, yüksek afiniteli IgE reseptörüne (FcεRI), düşük afiniteli IgE reseptörüne (FcεRII veya CD23) ve galektin-3'e bağlanan üç reseptör vardır [20].

2.2.3. Yüksek Afiniteli IgE Reseptörü

IgE için yüksek afiniteli reseptör, FcεRI olarak adlandırılır. Yüksek afiniteli reseptör (FcεRI) bir α, bir β ve iki γ zincirinden oluşur. IgE'nin en yüksek afiniteyle bağlandığı α zinciridir. Bu reseptör mast hücreleri ve bazofiller üzerinde ifade edilir. Bir antijen IgE tarafından tanınıp bağlandıktan sonra, kompleks yüzeydeki FcεRI reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörlerin çapraz bağlanması, aracılardan salınmasına yol açan sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar [20].

2.2.4. Düşük Afiniteli IgE Reseptörü

IgE için düşük afiniteli reseptörü, FcεRII (CD23) olarak adlandırılır. B ve T hücreleri gibi kan yapıcı hücreler gibi tip II zar proteini olarak bilinmektedir. IgE sentezinin pozitif ve

negatif düzenlemesinin yanı sıra FcεRII birçok işlevi mevcuttur. IgE-antijen komplekslerinin bağlanması yoluyla IgE'ye bağımlı antijen sunumunu kolaylaştırır [20].

2.2.5. Galektin-3

Galektinler, mast hücrelerinin yüzeyinde IgE veya FcεRI'ye bağlanabilir ve aracılardan salınmasını tetikleyebilir. Galektin-3, yalnızca çözünmez formda bulunan IgE için düşük afiniteli bir reseptördür. Eozinofiller, nötrofiller, mast hücreleri ve makrofajlar, T ve B hücrelerinde ifade edilmektedir. Makrofajlar, galektin-3'ün önemli bir kaynağıdır. Galektin-3, çapraz bağlanan FcεRI yoluyla mast hücrelerinin güçlü bir aktivatörüdür [20].

2.3. Alerjik Hastalıklar

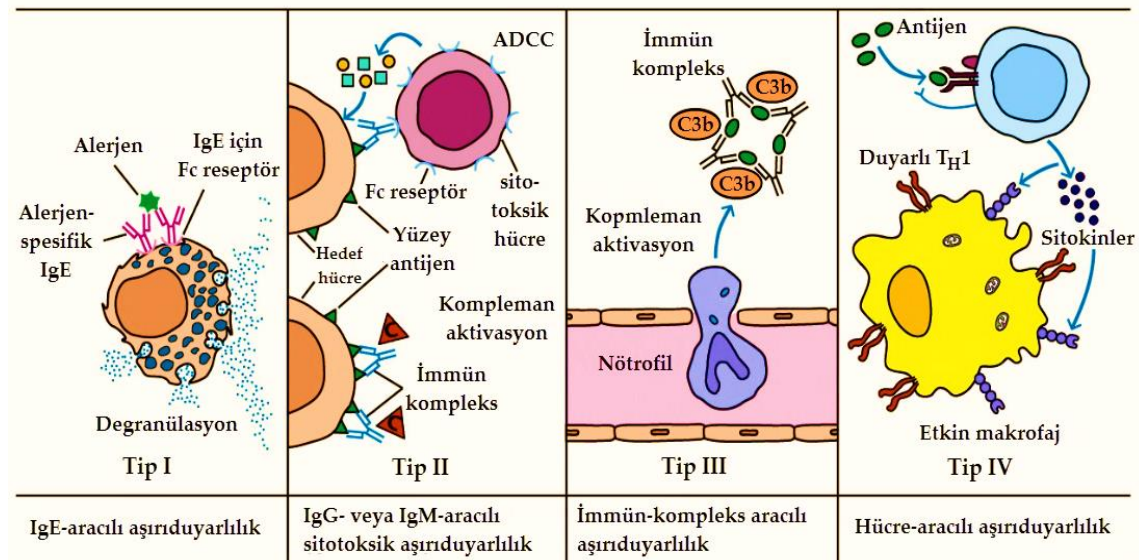
Genel olarak alerji, tanımlanması kolay bir hastalık değildir. 1906'da Viyanalı hekim Von Pirquet tanımına göre alerji, zararlı patojen ya da maddelere karşı verilen ani duyarlılık tepkisidir. İnsan vücudundaki birkaç etkileşimli sistemi içeren, bazen aşırı duyarlılık tip I, II, III veya IV olarak tanımlanan geniş bir enflamatuvar durumlar grubuna aittir. İstatistikler farklı ülkelerden ve ayrı ayrı bölgeler içinde farklılık gösterse de artık, ölçüm göstergesine bakılmaksızın, bazı sistemik alerjik hastalıklar için hastaneye başvuruların son on yılda keskin bir şekilde arttığı ve bu durumun bu koşullarda yükselen bir duruma işaret ettiği kabul edilmektedir [21].

Çizelge 2.3. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının sınıflandırılması ve aracı moleküller. [22]

Reaksiyon Aracı	Antikor
Tip I Acil Duyarlılık Reaksiyonu	IgE
Tip II Sitotoksik Antikor	IgG ve IgM
Tip III İmmün Kompleks	IgG (IgM)
Tip IV Geç Tip Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu	Lenfositler ve çeşitli miyeloid hücre tipleri

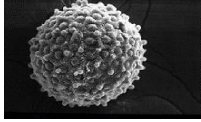
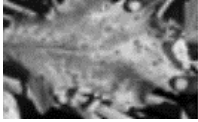










Çizelge 2.4. Gell ve Coombs'a göre aşırı duyarlılık reaksiyonlarının sınıflandırılması. [23,24]

Türü	Mekanizması	Belirti ve Bulgular	Zamanlama
Tip I	IgE aracılı ilaç-immünoglobulin kompleksinin salınmasıyla mast hücrelerine bağlanır. (Örneğin, histamin)	Ateş, döküntüler, bulantı, kusma, kızarma, ishal, nefes darlığı, ürtiker, anjioödem, sırt ağrısı, anafilaksi.	İlaç verilmesinden dakikalar ile saatler sonra.
Tip II	Antikor aracılı reaksiyon (özellikle IgG veya IgM) antikor-antijen kompleksleri ile sonuçlanır.	Hemolitik anemi / hemoliz, nötropeni, trombositopeni.	Değişken.
Tip III	Bir bağışıklık sistemi tepkisi ile ilişkili olarak, bağışıklık komplekslerinin dolaşımında olduğu ve çeşitli dokularda biriktiği, ilaç-antikor aracılı reaksiyon oluşur.	Ateş, kızarıklık, eklem ağrısı, böbrek iltihabı, damar iltihabı, ürtiker, lenf bezlerinin şişmesi.	İlaç verilmesinden 1 ila 3 hafta sonra.
Tip IV	Bağışıklık sistemindeki T hücrelerinin aktivasyonunu içeren gecikmiş reaksiyon; T hücreleri antijeni tanır ve hedeflenen hücreleri yok eder.	Greft reddi, granülom oluşumu, alerjik kontakt dermatit.	Deri ilaca maruz kaldıktan 2 ila 7 gün (veya daha uzun) sonra.



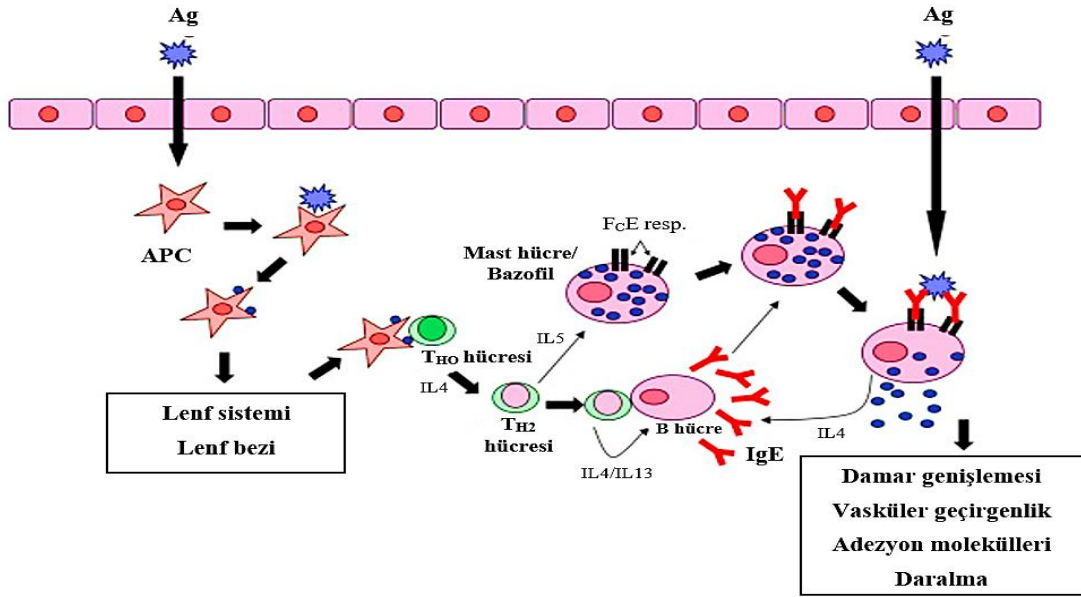
Şekil 2.5. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının şemantik gösterimi. [23]

Çizelge 2.5. Aşırı duyarlılık belirtileri. Semptomlar genellikle antijene maruz kalan atomik bölgelere yerleşir.

Maruz Kalan Bölge	Hastalık	Bilinen Alerjenler		Belirtiler
Solunum Mukozası	Alerjik rinit (nezle)			Burun kaşınması, Burun akıntısı, Tıkanıklık, Bronş ve bronşçuk kaslarının kasılması, Kronik havayolu inflamasyonu
	Astım			
Mide ve Bağırsak Mukozası	Besin Alerjisi			Kramp, Kusma, İshal, Kurdeşen, Anafilaksi
Deri	Kontakt Ürtiker			Kurdeşen, Prürit (kaşınma)
	Kontakt Dermatit			Kızarıklık, Kaşınma
Kan	Sistemik Alerji			Kurdeşen, Ödem, Karın krampları, Bronş ve bronşçuk kaslarının kasılması, Hipotansiyon

Johannson ve arkadaşları tarafından kapsamlı isimlendirme yeniden gözden geçirildikten sonra alerji [25], şu anda spesifik (hücre ve antikorla ilgili) immünolojik mekanizmaları içeren normal insanlar tarafından tolere edilen bir dozda tanımlanmış zararsız çevresel uyarana maruz kalmanın başlattığı bir dizi yeniden üretilebilir semptom (aşırı duyarlılık) olarak tanımlanmaktadır. Bu aşırı duyarlılık genellikle yaşamı tehdit eden (anafilaktik) ani ve geç reaksiyonlara neden olabilmektedir.

Solunum yollarının veya mide-bağırsak sistemin mukozal zarlarının tehlikeye girdiği kritik durumlarda, alerji, aşırı duyarlılık tip I olarak da bilinen bir TH2 sürecinde IgE sınıfı antikorlar tarafından bağışıklık hücrelerinin (mast hücreleri ve bazofiller) aşırı aktivasyonu ile karakterize edilir (Şekil 2.6). Alerjik astım atağının veya bir alerjik rinit salgınının ani aşamasının bu tipik özelliklerinin ardından genellikle mast hücresinden kemotaktik faktörlerin salınmasıyla başlayan geç bir aşama gelir [26].



Şekil 2.6. Duyarlılaşma ve sonrası alerjen teması sırasında meydana gelen immünolojik hücresel olaylar. Ag = antijen veya alerjen, APC, antijen sunan hücre; Th, T yardımcı hücre; IL, interlökin [27].

Fcε reseptörleri ve IgE sınıfı immünooglobülin molekülleri arasındaki yüksek afinite tayin noktasında büyük bir avantaj sunar. Çoğu insan parazitik antijenlere karşı IgE antikorları üretebilse de alerjik bireyler belirli zararsız yabancı makro moleküllere karşı aşırı miktarda IgE antikorları soluma, yutma veya enjeksiyon yoluyla üretme ve dolayısıyla aynı malzemeye tekrar maruz kaldıklarında alerjik semptomlar geliştirme eğilimindedir. IgE üretimini (duyarlılaşma) hızlandıran yabancı maddeler veya duyarlılaştırıcılar, atopik olarak alerjenler ve duyarlı hale gelme eğilimi olan kişiler olarak adlandırılır. Uygulamanın hassasiyetini arttırmak için mast hücreleri ve bazofillere spesifik IgE yüklenmesi mukozal membranda gerçekleşir. Yeniden maruz bırakılan alerjenler, daha sonra bazofillerin / mast hücrelerinin yüzeyindeki spesifik IgE antikorlarını çapraz bağlayarak, bir dizi iyi bilinen olaylar aracılığıyla bu hücrelerin aktivasyonunu

tetikleyerek potansiyel olarak yaşamı tehdit eden ani ve geç alerjik reaksiyonlara yol açacaktır (Şekil 2.6).

2.4. Alerjenler

Vücudun en etkili savunma birimi olan bağışıklık sisteminin en önemli silahı alerjenlere karşı gösterdiği mekanizmalardır. Belli başlı kimyasal bileşenler yaygın olarak alerjen sınıfına olsalar da, kişiye spesifik olarak da istisna alerjen bileşikler de olabilir. Genetik yatkınlığın da büyük rol oynadığı bu olayların hepsinde bağışıklık sistemi bir tepki olarak IgE antikorlarını sentezler. Soruna neden olan alerjenin belirlenmesi karmaşık ve zor olabilir. Alerjilerin çıkış noktası birçok parametreye bağlı olarak değişebilir ve bunlardan birisi de mevsim değişiklikleridir. Aslında sadece mevsimsel görülen alerjiler bile, alerjik reaksiyonları açıklamak için yol gösterici olabilir. Fakat maruziyet miktarı, hangi mevsimlerde reaksiyonların verildiği gibi farklılıklar da araştırmaya dahil edilmelidir.

Farklı hasta hikayeleri ve sayısız kontrol grubu denemeleri sayesinde şu anda halihazırda birçok alerjenin tanımlaması yapılmıştır ve bir dizi klinik bilgi elde edilerek alerjik reaksiyon mekanizmaları çıkarılabilmiş ve isimlendirilmiştir. Bu isimlendirme sisteminde aşağıdaki şablon kullanılmaktadır:

Ggg (g) s (s) n. iivv, burada **g** = cins (2–3 harf), **s** = tür (1-2 harf), **n** = alerjen numarası, **i** = izoalerjen numarası (2 hane), **v** = varyans numarası (2 hane).

Mevcut isimlendirme formatına göre örneğin, *Betula verrucosa* (huş ağacı) kaynaklı ana polen alerjeni Betv1 olarak bilinir. Betv1.0102 tarafından izoallerjen ve varyantlarından biridir. Dünya Sağlık Örgütü / Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği (WHO / IUIS) Alerjen İsimlendirme Alt Komitesi [28] tarafından yayınlanan resmi alerjen listesi, Allergome veritabanında bulunan [29] ve başka yerlerde açıklanan [30], mevcut isimlendirme ve klinik veriler için iyi başlangıç kaynaklarıdır.

2.4.1. Alerjenlerin Sınıflandırılması

Genel anlamda alerjenler şu şekilde sınıflandırılabilir [31];

Ev içi alerjenleri (toz akarlar, hayvan alerjenleri, hamamböceği ve küfler): Proteolitik enzimler (serin ve sistein proteazları), lipokalinler (ligand bağlayıcı proteinler), tropomiyosinler, albüminler, kalsiyum bağlayıcı proteinler, proteaz inhibitörleri.

Dış ortam alerjenleri (çimen, ağaç ve yabani ot polenleri ve küf sporları): Bitki patogeneziyle ilişkili proteinler, pektat liyazlar, β -ekspansinler, kalsiyum bağlayıcı proteinler (polkalsinler), defensin benzeri proteinler, tripsin inhibitörleri.

Bitki ve hayvan gıda alerjenleri (süt, yumurtalar, kabuklu yemişler, meyveler, sebzeler, balık ve kabuklu deniz hayvanları): Lipit transfer proteinleri, profilinler, tohum depolama proteinleri, laktoglobulinler, kazeinler, tropomiyosinler, parvalbüminler.

İlaç alerjenleri (böcek zehirleri ve bazı terapötik proteinler): Fosfolipazlar, hiyaluronidazlar, patogeneziyle ilgili proteinler, asparaginaz.

2.4.2. Analitler

Atopik durumları (örneğin, dermatit, astım ve rinit) birbirine bağlayan birleştirici bir ipelik, belirgin şekilde yüksek IgE antikör seviyeleri olan kişilerde ortaya çıkmasıdır. Bu nedenle, tarihsel değerleri, yaygın kullanımları ve önemi nedeniyle, IgE için immünoassayleri tanımlamak için hala halk arasında Phadebas radyoallergosorbent testi (PhRAST) kullanılmaktadır. Daha önceki sistemler için başarıyla geliştirilen antijen fazlalığı tespiti teknikleri, yeni nesil profil oluşturma araçları için hala geçerlidir.

IgE'nin kandaki maksimum plazma seviyesi hızlı değişkenlik göstermesi ve kısa yarılanma ömrüyle hızlı bir şekilde katabolize olması onu immunoglobulin sınıfında önemli bir yere koyar. Zamana karşı spesifik değişkenlikler göstermesi sayesinde, hassas tayini yapılabildiği takdirde alerjik reaksiyonları açıklamak için oldukça umut verici bir yöntemdir. Klinik uygulamalarda bu tayin iki türlü yapılmaktadır [32]. Bunlardan birincisi toplam serum IgE ölçümüne dayalıdır, diğeri ise spesifik serum IgE ölçümü üzerinden yapılmaktadır.

2.4.3. Referans Aralıkları

WHO'nun biyolojik materyaller için standartların oluşturulmasına ilişkin kurallarına göre, 1968'de IgE için Uluslararası Referans Hazırlama merkezi kuruldu. WHO Uluslararası İmmünoglobulin Referans Merkezi, beşinci bir immünoglobulin izotipi olan IgE'nin varlığını duyurdu [33]. IgE, ε ağır zincirini içeren antikor izotipidir ve immünoglobulin yapısında beş alanlı bir monomerdir. Plazmada 1 µg/mL'den daha düşük bir derişimde bulunur. Serumda yaklaşık olarak 2 günlük bir yarı ömre sahiptir [34]. Çok düşük serum IgE seviyelerini ifade etmedeki zorlukları azaltmak için periferik kandaki IgE seviyesini yeni bir birim (kU/L veya IU/mL) ile ifade edildi. Bu birim yaklaşık olarak 1,0 kU/L, 2.4 ng/mL'ye eşit olduğu belirtildi. Referans Değerler: 0-1 yaş: 0-65 U/L 2-12 yaş:0-150 13-15 yaş: 1-200 >15 yaş: 1-100 [35].

2.4.4. Toplam Serum IgE Antikoru

Klinik rolleri giderek daha fazla tartışılrsa da [36], tarihsel alışkanlıklar, otomasyon ve iyi tekrarlanabilirlik, atopik hastalıkların klinik teşhisinde bir yardımcı olarak toplam serum IgE için immünolojik testleri popüler hale getirmiştir. Toplam serum IgE miktarının belirlenmesi, rekabetçi çift antikor testi, katı fazlı radyoimmünoanalizler (RIA) gibi testler ile bulunmaktadır. Bu testler sonucunda ölçülen sinyaller radyoaktivite, renk, floresan vb. olabilmektedir.

2.4.5. Alerjene Özgü IgE Antikoru

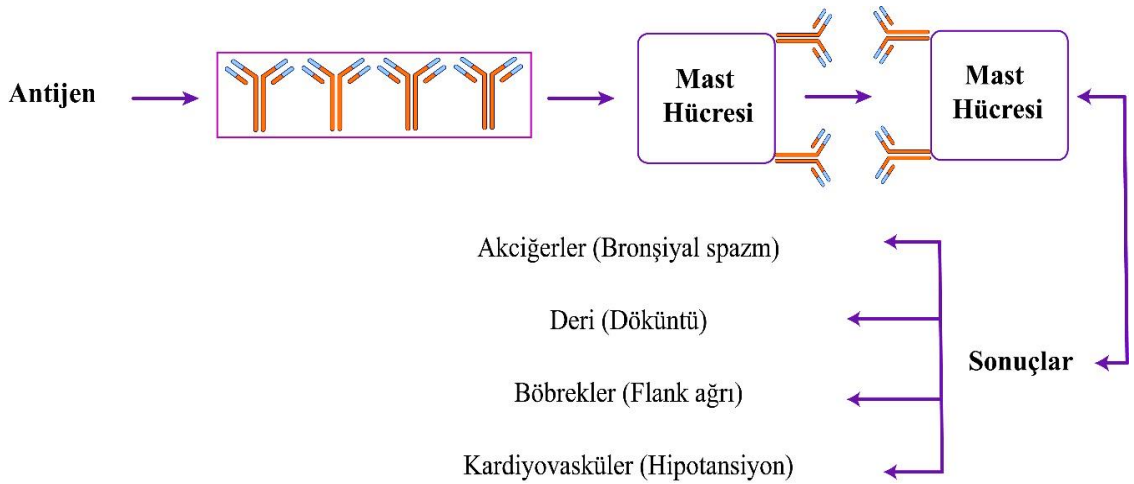
Ölçümler yapılırken dikkat edilmesi gereken nokta, sadece aynı sınıftaki antikorların olduğu ortamda ölçüm yapılmaması gerektiğidir. Çünkü tayin sırasındaki mühim nokta, antijen bağlama bölgelerinin, sınıfa özgü epitoplara ile spesifik etkileşimidir. IgE durumunda, serumdaki beş immünoglobulin izotipinden herhangi birinin en düşük derişimine sahip olarak, spesifik antikor derişimi, numunelerde mililitre başına pikogramlara kadar ölçülebilir olmalıdır. Toplam IgE ve diğer sınıfların rekabet eden antikorlarını mililitre başına mikrogram aralığında içerebilir.

Erken spesifik alerjen tespit testleri, esas olarak kapsamlı ekstraksiyon (özütleme) prosedürlerini takiben alerjenlerin tutarlılıklarındaki büyük değişkenlik istikrarsızlığı

nedeniyle tekrarlanabilirlikten yoksundur. Geçtiğimiz on yıllar boyunca, spesifik IgE tespiti için birçok platform geliştirilmiştir [37], ancak Phadebas (a-amilaz enziminin hem kalitatif hem de kantitatif değerlendirmesi için kullanılan sentetik bir biyokimyasal substrattır) RAST (radyoallergosorbent), spesifik IgE'nin tespit etmek kullanılan testler arasında yer almaktadır.

2.4.6. Klinik Bulgular

Aşırı duyarlılık reaksiyonları, anafilaksi gibi sistemik reaksiyonlar da dahil olmak üzere herhangi bir organ sisteminin tutulumu ile ortaya çıkabilir. Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonlarının belirti ve semptomları, lokal reaksiyonlara veya sistemik anafilaksiye yol açan hedef organlar (örn. Deri, akciğerler veya kardiyovasküler sistem) üzerindeki aracılardan bir sonucudur. Antijene spesifik IgE bağlanır mast hücrelerinin ve antijen (bunları duyarlı hali için Şekil 2.8) duyarlı hale getirilmiş mast hücresinin daha sonra antijene maruz kalması, mast hücresinin degranülasyonuna ve aşırı duyarlılık reaksiyonunun aracılarının salınmasına neden olan bir dizi reaksiyona neden olur.



Şekil 2.8. Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonları.

Tip I reaksiyonların semptomları arasında ateş, mide bulantısı, kusma, kızarıklık, kızarıklıklar, ürtiker, anjiyoödem, bronkospazm (astım), sırt ağrısı, nefes darlığı ve kalp atış hızı ve kan basıncında değişiklikler yer alır. Anafilaktik (alerjik şok) reaksiyonları, hava yolu ve dolaşımın çökmesi ile potansiyel olarak yaşamı tehdit etmektedir. Anafilaksinin gelişimini ve ciddiyetini etkileyen faktörler arasında antijenin giriş yolu

(IV uygulamasında daha sık), eklenen antijen miktarı, antijen emilim hızı ve bir kişinin bir ilaca aşırı duyarlılık derecesini belirler (aşırı duyarlılık reaksiyonunun gelişimi).

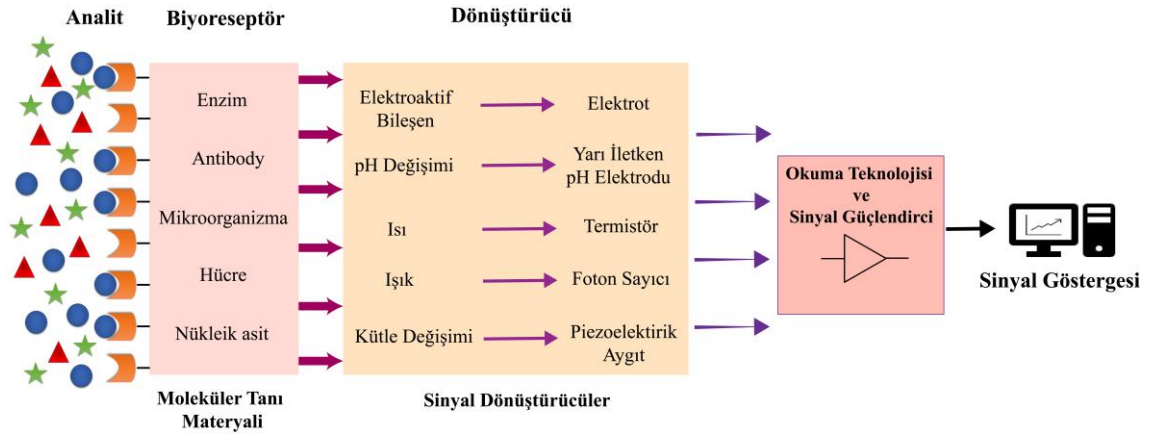
2.4.7. Antibody Tayin Yöntemleri

Antibodylerin tayini için en sıklıkla kullanılan yöntem katı faz bağlanma immüno tayinleridir. Serum ve plazma örnekleri mikrotitre plakalardaki kuyucukların yüzeyine önceden immobilize edilmiş antijenle inkübe edilirler. Bağlanan antibody daha sonra radyoetiketle veya enzim etiketle uygun spesifitedeki anti immünoglobulin reaktifiyle tayin edilir. İkinci yöntem ELİSA yöntemi olarak bilinmektedir. Genel olarak bu tür yöntemler antibody tayini için oldukça duyarlı yöntemlerdir. Ancak bu tür tayinlerin spesifik olmayan bağlanma, etiketli antibody gereksinimi, uygulamada birçok reaktif eklenmesi gerekliliği, düşük afiniteli antibodylerin yıkama sırasında ayrılıp uzaklaşabilmesi gibi birçok dezavantajı vardır.

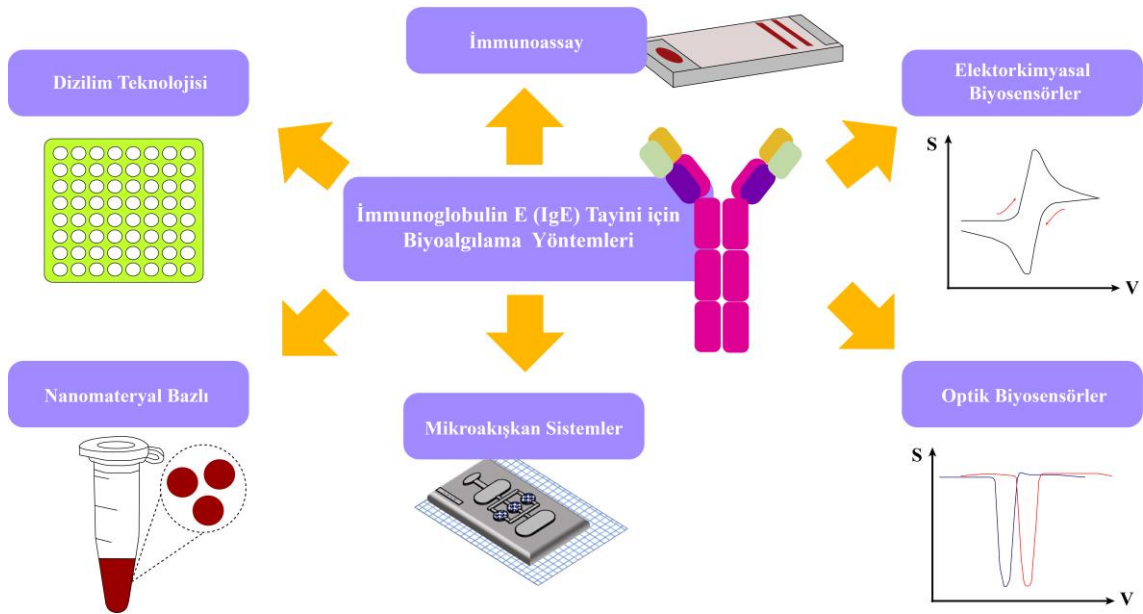
Yüzey plazmon rezonans (SPR) yöntemi son zamanlarda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında popüler olduğunu göstermiştir. Bu sensörlerin en önemli avantajı hızlı cevap süresi ve aynı anda birçok analiti analiz etme olanağı sunmasıdır. Uygulama alanları arasında biyolojik moleküllerin tayini ve biyomoleküller arası etkileşimlerin etiketleme olmaksızın incelenmesi sayılabilir [38].

2.5. Biyoalgılama teknolojileri

Biyosensörler, izole edilmiş enzimler, immüno sistemler, nükleik asitler, dokular, organeller veya tam hücrelerin aracılık ettiği çok sayıda alanda çok çeşitli hedeflerin tespiti için son teknoloji analitik cihazlardır. Tanıma sistemi için biyokimyasal bir mekanizmanın tercih edildiği kimyasal sensörler grubudur. Tipik bir sensör cihazı üç ögeye sahiptir: (1) Analitik yüzey üzerinde hareketsizleştirilmiş bir analit biyo-alıcı; (2) Kimyasal veya fiziksel verileri ölçülebilir sinyallere dönüştürebilen bir dönüştürücü; (3) Bir sinyal işleme ve okuma sistemi. Biyosensörler, dönüştürücü moduna sahip olması nedeniyle elektrokimyasal, optik, manyetik, kütle algılama, elektro-mekanik, vb. olarak kategorize edilir. Seçici yarı-nicel veya nicel analitik bilgi sağlarlar [39].



Şekil 2.9. Herhangi bir biosensörün sinyal işlemede yer alan farklı adımların resimli açıklaması.



Şekil 2.10. Spesifik İmmünoglobulin E'lerin tayini için biyoalgılama teknolojilerinin sınıflandırılması.

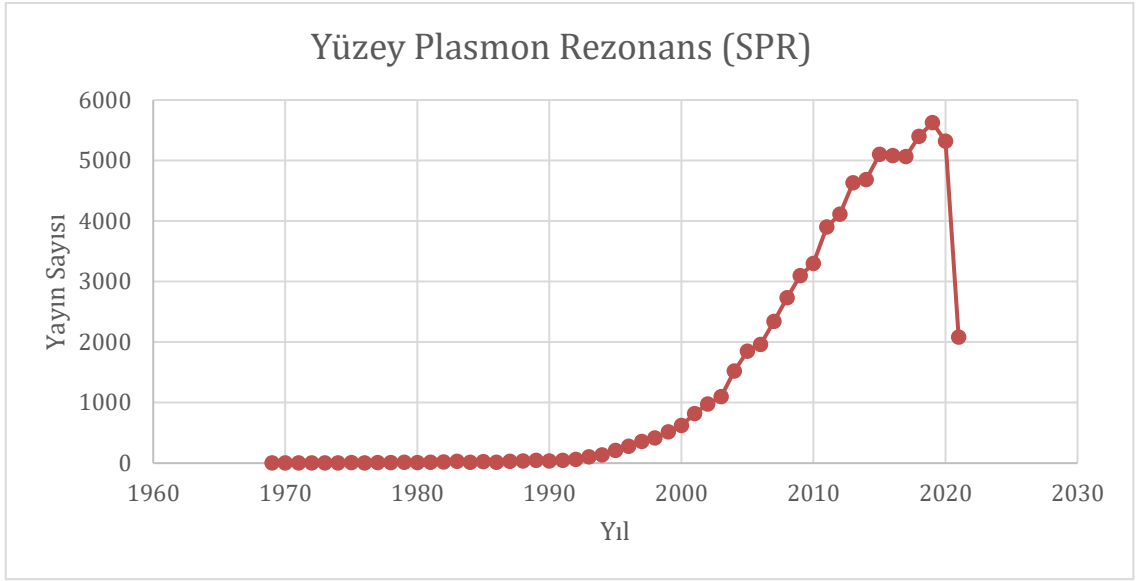
Aşağıdaki Çizelge 2.7.'de sırasıyla IgE belirleme yöntemlerine farklı yaklaşımların artıları ve eksileri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.6. Spesifik IgE'leri belirlemek için önerilen yaklaşımların analizi.

Yöntemler	Avantajlar	Dezavantajlar
İmmünokimyasal	Geleneksel enstrümanlar Düşük maliyetli Uygun maliyetli	Düşük çoğullama yeteneği Sınırlı hassasiyet Büyük miktarda numune
Elektrokimyasal	Basit dönüştürücüler Minyatürleştirilmesi kolay Seri üretim imkânı	Az sayıda çalışma Düşük çoğullama kapasitesi
Dizilim	Çoğullama yeteneği Düşük reaktif kullanımı Yüksek verim	Yüksek maliyetli enstrümantasyon
Nanomateryal Tabanlı	Geliştirilmiş hassasiyet Daha kolay minyatürleştirme Çok yönlülük	Kısmen araştırılmış alan
Optik Temelli	Düşük reaktif kullanımı Daha düşük çapraz reaktivite Hızlı yanıt	Sınırlı hassasiyet Gelişmiş enstrümantasyon Düşük çoğullama kapasitesi
Mikroakışkanlar	Minyatürleştirme Düşük reaktif kullanımı Taşınabilirlik	Karmaşık tasarım Zor malzeme seçimi Reaktif saklama zorlukları
Optik Temelli Yüzeysel Plazmon Rezonans (SPR)	Yüksek güvenilirlik, Hassasiyet için etiketsiz ölçüm SPR sensör cihaz tasarımı, Minyatürleştirme, Düşük maliyet	Küçük analitleri analiz için uygun değildir. Sensör yüzeyine bağlanan malzeme kütlesini ölçtüğü için, oldukça küçük analitler oldukça küçük yanıtlar verir.

2.5.1. Yüzey Plazmon Rezonans

Yüzey Plasmon Rezonans (SPR) ilk uygulamasından itibaren neredeyse yirmi yıl önceki algılama yöntemleri için bir tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntem hem enstrümantasyon geliştirme hem de uygulamalar açısından büyük adımlar attı. 1990 yılında ilk ticari yüzey plazmon rezonans cihazının (Biacore) piyasaya sürüldü. Daha sonraki yıllar itibariyle ticari biyosensörlerden toplanan verileri içeren yayınların sayısı, Şekil 2.11'de gösterildiği gibi 2021 yılına kadar toplam 70.000'den fazla yayına yükseldi.



Şekil 2.11. Scopus, Haziran 2021 verileri göre Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) optik sensörleri ile yapılan literatür çalışmaları.

Wood, yüzey plazmonlarının metalik bir optik ağ üzerinde kırılan ışığın beklenenden daha farklı bir davranış göstermesi üzerine ilk çalışma adımlarını attı. Takip eden çalışmalarda Fano, bu farklı davranışın optik ağ yüzeyindeki elektromanyetik yüzey dalgalarının uyarılmasına bağlı olduğunu ortaya çıkardı. [40]. Daha sonra Otto, zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) yönteminde yansıyan ışık yoğunluğundaki düşüşün yüzey plazmon oluşumundan kaynaklandığını gösterdi [41]. Bununla birlikte, gaz algılama için metal yüzeylerde yüzey işlemlerinin incelenmesi için bir optik sensör olarak yüzey plazmon rezonansının ilk gösterimi ancak 1980'de gerçekleşti [42]. SPR'ye dayalı bir cihazın pazarlanması, proteinler arasındaki etkileşimleri tespit etmek için yalnızca 1990 yılında BIAcore tarafından gerçekleştirildi [43].

Yüzey plazmon rezonansı sensörleri, yaşam bilimi, elektrokimya, gaz fazı, gıda, çevre, ilaç gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Tıbbi tanı alanında, teknik, hızlı yanıt süresi, daha az biyolojik örnek içeren etiketsiz metodolojiler ve laboratuvar tarafından geliştirilen testler ile oldukça hassas ve spesifik biyosensörlerin geliştirilmesi için kullanışlıdır [44]. Gıda analizi alanında toksinlerin, patojenlerin, ilaçların ve besin katkı maddelerinin varlığı analiz edilebilir [44,45] İlaç geliştirme alanında SPR, bileşen ve hedef arasındaki etkileşimler hakkında bilgi vererek ilaç geliştirme sürecini hızlandırmaktadır.

Yakın bir zaman diliminde, biyosensörler üzerine yapılan geliştirme ve araştırmalar popüler hale gelmiştir. Çünkü enzimler, büyüme faktörleri, glikoproteinler, nükleik asitler, ilaçlar, hücreler ve virüsler gibi farklı biyomalzemelerin etkileşiminin ve hatta antijen ile antikor arasındakiler gibi biyospesifik etkileşimlerin gerçek zamanlı izlenmesine izin verirler [43]. Bu sistemle, moleküler etkileşim mekanizmaları (bağlanma), reaksiyon zamanı ve ayrışma (kinetik), ligand-analit seviyesi (afinite), analit miktarı (derişim) ve özgüllük gibi birçok bilgi çıkarılabilir. Bunun ana avantajı ise etiketsiz bir yöntem olmasıdır.

SPR, enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ve floresans analizi gibi halihazırda kullanılan geleneksel tekniklere göre bazı avantajlar sergiler. Analitin belirli özelliklere (floresans, absorpsiyon vb.) sahip olması gerekmemektedir. Floresan veya radyoaktif belirteçler gerektirmez [46,47]. Çünkü ek adımlar ve deneysel protokoller olmadan etkileşimlerin doğrudan izlenmesini mümkün kılmaktadır. SPR ayrıca, örneğin kütle spektroskopisi [48,49] ve elektrokimya gibi diğer tekniklerle kombinasyona / bağlanmaya da izin verir [50,51].

SPR teknolojisi bir çözelti içindeki tespit edilmesi hedeflenen analit/molekül ile biyosensör tanıma yüzeyinde kovalent olarak takılı spesifik ligand arasındaki bağlanma sonucu sensör yüzeyine çok yakın kırılma indisindeki değişiklikleri kullanan optik temelli bir yöntemdir [52]. Diğer bir ifadeyle, gelen ışığın açısı veya dalga boyu bir metal/dielektrik arayüzünde yüzey plazmonlarının üretilmesine izin verir. Bu teknik sensör-immobilize moleküller ve örnek molekülleri arasındaki etkileşimlerin neden

olduğu ara yüzeye yakın dielektriğin kırılma indeksindeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır.

2.5.2. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Teorisi

Çoğu SPR algılama cihazı, ortak bir model izlenerek geliştirilmiştir. Optik sensör, mikroakışkan çipler, örnekleme sistemi, veri toplama/analiz yazılımı ile birlikte bir model oluşturmaktadır [53,54]. SPR sensör tanıma yüzeyine örnek analit bağlanması için afinite deneylerinde kütle taşıma sınırlamalarını ve sabit akışı önlemek amacıyla genellikle kinetik ölçümler için sürekli akış yoluyla sağlanmaktadır [54,55]. SPR sensör tanıma elemanına yakın ortamlara (<200 nm) duyarlıdır [56-58]. Bu parametreler göz önüne alındığında mikro akış hücresinin tasarımı, iyi kontrol edilebilen, tekrarlanabilir örnek geçişi ve düşük örnek hacmi elde etmek çok önemlidir [59]. Sıcaklık değişimleri sadece SPR sensör sinyal tepkisini değil, aynı zamanda biyomoleküler etkileşimlerin kinetiği ve afinitesi de büyük ölçüde etkilediğinden bir izotermal düzeni de korunmak diğer bir önemli noktadır [60].

SPR sensörünün temel bileşenleri bir ışık kaynağı ve optik sistemi, optik bağlantı bileşenleri (prizma, çip hücresi, dalga kılavuzu veya optik fiber), bir görüntüleme optik sistemi ve bir foto dedektördür [59,61]. Bağlantı bileşenlerinin konfigürasyonundan ve ışık dalgası modülasyonu türünden başlayarak, daha sonra gösterileceği gibi, hassasiyeti ve çözünürlüğü geliştirmek için hem SPR hem de SPRi (yüzey plazmon rezonans görüntüleme) yaklaşımları için çeşitli formatlar yakın zamanda geliştirilmiştir.

"Yüzey plazmonları" ve "polaritonlar" terimleri, öncelikle bol miktarda serbest elektron veya metal içeren maddelerin yüzeyinde bulunan dalga-parçacık ikiliği (fotonlar ve fononlar gibi) sergileyen bazı yarı parçacıklara atanır [57]. Plazmon terimi bir metaldeki sabit pozitif iyonlara göre serbest elektron yoğunluğunun salınımını olarak ifade edilmektedir. "Yüzey plazmonu" terimi, metalin yüzeyi boyunca yayılan yük yoğunluğu dalgasını belirtir [62]. Metal yüzeye çarpan fotonların yüzey plazmonları ile etkileşimi hem yüzey plazmonlarından hem de fotonlardan oluşan yarı parçacıklarına sahip yüzey plazmon polaritonlarını (SPP'ler) verir [63]. Fotonların dalga boyları, dağılım yoluyla ortamın kırılma indisi n ile değişir, ancak salınım frekansları değişmeden kalır. Bir yarı-

parçacık için, yayılma dalga boyunun λ kendi salınım frekansına ω bağımlılığı şu şekilde verilir:

$$\lambda = \frac{2\pi c}{\omega} \quad (2.1)$$

Burada c ışığın boşluktaki hızıdır. Sonuç olarak, dalga yayılma sayısı β şöyle olur:

$$\beta = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.2)$$

SPP'lerin dağılımı, SPP'lerin salınım frekanslarının arayüz ile birlikte yayılma sayısı olan β ile ilgilidir [64,65]. SPP'leri destekleyen en basit geometri, sırasıyla dielektrik sabitleri ϵ_1 (karmaşık) ve ϵ_2 (gerçek) olan bir metal (1) ve bir dielektrik ortam (2) arasındaki düz bir arayüzdür [63,66,67]. Yalnızca bir p-polarize elektromanyetik (EM) veya enine manyetik (TM) dalga SPP'leri sürdürebilir. Metal-dielektrik yüzey arayüzündeki bir SPP'nin elektromanyetik alanı Maxwell dalga denklemlerini çözerek elde edilir [53,65,68]. Bu nedenle, SPP'lerin $\beta=2\pi/\lambda_x$ arayüzü boyunca yayılma sayısı, arayüz metal-dielektrik ortamı ϵ_1 ve ϵ_2 'nin iki dielektrik sabiti yoluyla salınım frekanslarıyla ilişkilidir (gelen ışığın belirli bir salınım frekansı için ω)[57,60].

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (2.3)$$

SPP'lerin EM alanının yoğunluğu, arayüzden uzaklık arttıkça hızlı bir azalmaya uğrar ve SPP uyarımının kendisi yakın alanda sınırlandırılır. Gelen ışıkla etkileşimi takiben, SPP'ler gelen fotonlardan gelen enerjiyi emer ve dalga yayılma sayısı β ile yüzey boyunca yayılır. Bu nedenle, yansıyan ışığın yoğunluğu olayın yoğunluğundan daha azdır ve sonuç olarak ortaya çıkan yansımaya (R) birden küçüktür. SPP dalgaları, 100 nm ila 600 nm arasında değişken bir penetrasyon (nüfus etme) ile her iki ortamdaki mesafeyle katlanarak azalan maksimum yoğunluklar gösterir (görünür VIS ve yakın kızılötesi NIR dalga boyları için) [68].

Belirli bir monokromatik ışık kaynağı için SPP'lerin uyarılabileceği ve rezonansa girebileceği belirli bir açı (SPR açısı) vardır [62,64]. Kırılma indeksi (RI), kimyasal reaksiyonlar, sıcaklık değişimi, taşıma, buharlaşma, veya reseptör-ligand etkileşimi gibi yakın alan olayları ile ilişkili olan en hassas değişkenlerden birisidir [56,63,69]. Bir SPR sensörü için hassasiyet, sensör çıkışındaki değişimin ölçülecek miktardaki kırılma indisi ile tanımlanırken, çözünürlük ise sensör çıkışında tespit edilebilir bir değişim oluştuğundan itibaren kırılma indisindeki en küçük değişikliği tanımlar [70]. SPR yaklaşımı ile elde edilen tayin sınırı, sensör tanıma yüzeyine bağlı biyolojik malzemeler için 1 pg.mm^{-2} olarak tahmin edilmektedir [54]. Bu hassasiyet proteinler, DNA veya antikolar gibi yüksek makromoleküler ağırlıklı bileşikler içeren biyolojik analizler için yeterlidir [71-73]. Yine de mikotoksinler, ilaçlar, vitaminler gibi düşük moleküler ağırlıklı hedefler (tipik olarak 500 Da'dan az) için ve ayrıca ultra düşük miktarlarda bile patojenik olan örneğin bakteri ve virüsler gibi daha büyük düşük kopya sayılı hedefler için duyarlılığın geliştirilmesi gerekmektedir [74]. Altın nanopartiküller (AuNPs) kullanılarak SPR biyosensörlerin hassasiyeti arttırılabilir ve hedef analitler için daha düşük tayin sınırı elde edilebilir [75].

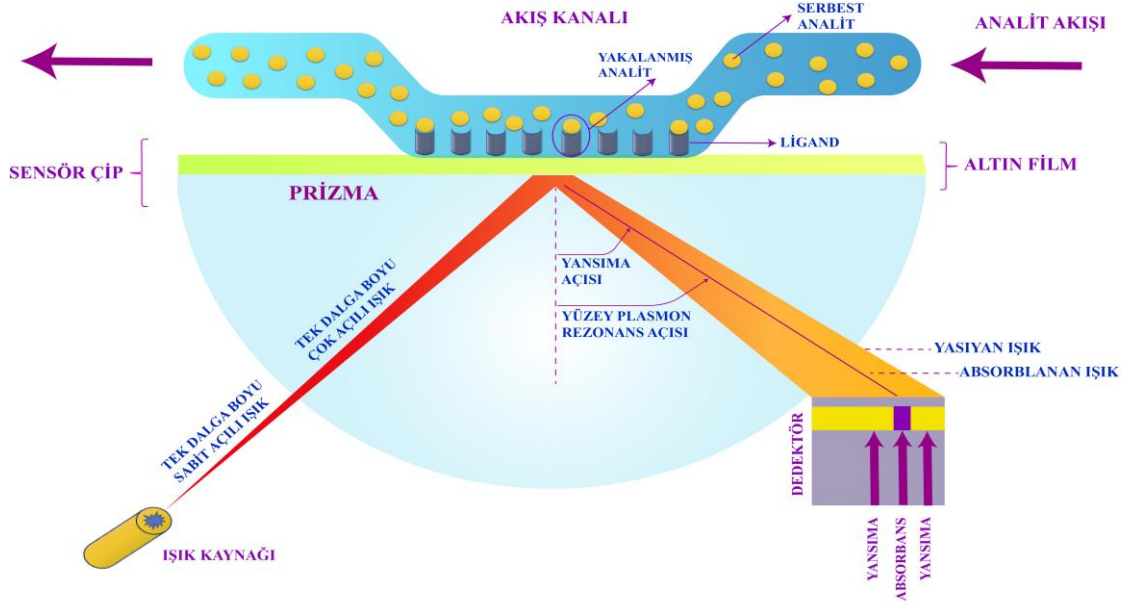
2.5.3. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

Yüzey plazmon rezonansı terimi etkileri günlük yaşamın bir parçası olarak görülmektedir. SPR'nin bir sonucu olarak dünyanın büyük katedrallerindeki vitray pencereler, yüzyıllar boyunca canlılığını korumuştur. Orta Çağ'daki zanaatkârlar, cam ve metalik oksidin belirli koşullar altında karıştırarak parlak vitray paneller ürettiler. Zanaatkarların bilmediği bu sonuç, kullandıkları metalik oksit camdaki plazmon rezonansının sonucuydu [76].

Plazmonik temelli sensörler, optik sensörler sınıfıdır. Yüzey plazmonlarını desteklemek için metal ve/veya metal-dielektrik yapılar içeren ve bir analiti bağlayabilen tanıma elemanlarından oluşan algılama platformlarıdır [77].

SPR, bir dielektrik ve bir iletken malzeme arayüzünde ışıkla uyarılan yüzey plazmon rezonansı (SPR) şekil 2.12.'de gösterilmiştir. SPR, gelen ışık tarafından uyarıldığında negatif (dielektrik) ve pozitif (örneğin, metaller) geçirgenlik malzemeleri arasındaki arayüzde meydana gelen serbest elektronların rezonans salınımıdır. Arayüze paralel olarak yönlendirilen gelen ışığın dalga vektör bileşeni, yüzey plazmon dalgasının yayılma

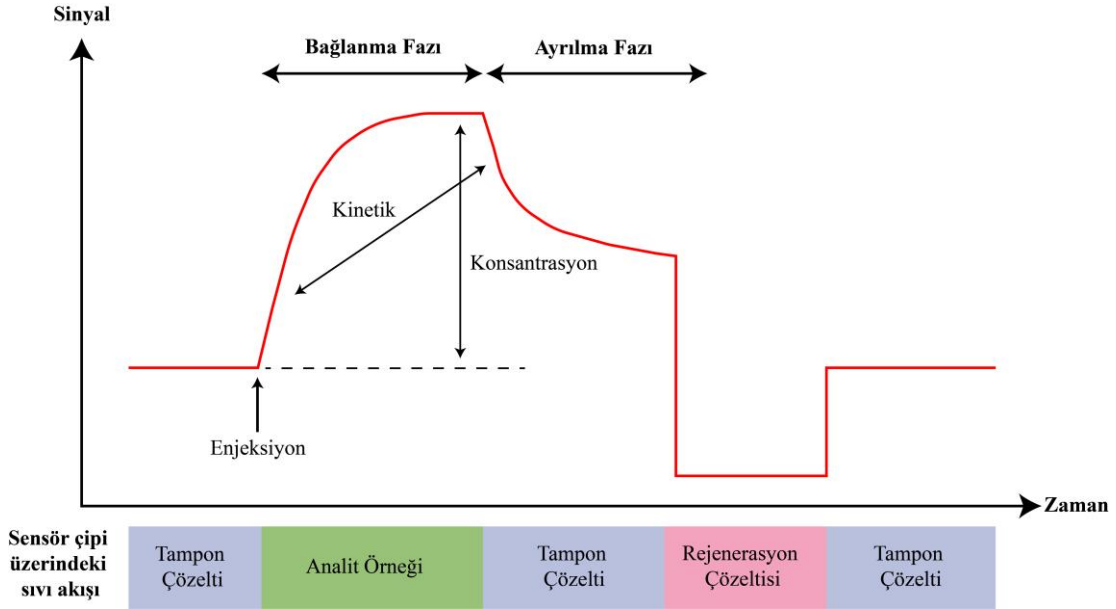
sabitiyle eşleşirse, SPR oluşur. Gelen enerjinin çoğu yüzey plazmon alanına bağlanır, bu da rezonans açısı ve dalga boyunda kaymalar sebep olmaktadır. Bu kaymalarla birlikte yansıyan ışığın yoğunluğu ve fazındaki değişikliklerle sonuçlanır [78].



Şekil 2.12. Bir dielektrik ve bir iletken malzeme arayüzünde ışıkla uyarılan yüzey plazmon rezonansının (SPR) gösterimi.

Azalan alanın oluşumundaki farklılıklara rağmen, temel bağlanma deneyi temelde tüm optik biyosensörler için aynıdır (Şekil 5.3). Etkileşen ortaklardan biri olan reseptör, sensör yüzeyine bağlanırken analit, serbest solüsyondan reseptöre bağlanır. Sensör, gerçek zamanlı olarak meydana gelen kırılma indisi değişikliklerini izlediğinden, reseptör miktarı, analit ve bağlanma oranı belirlenebilir. Aslında, etkileşim kinetiği, bu tekniğin temel avantajlarından biridir. Bir optik biyosensörün hassasiyeti iki ana faktöre bağlıdır: algılama katmanının analiti bağlama kapasitesi ve cihazın optik saptama sınırını (Bir sinyali tetikleyebilecek minimum analit miktarı). Birincisi, etkileşimin afinitesine ve analit tarafından erişilebilen bağlanma yerlerinin sayısına bağlıdır. İkincisi, analitin moleküler ağırlığına, sinyal-gürültü oranına ve sapmaya bağlıdır [78].

Analit sensör yüzeyine bağlandığında, sensör yüzeyindeki kütle artışına göre kırılma indisi ve SPR açısı değişir [79]. Analit ve hareketsiz reseptör arasındaki etkileşim sensör yüzeyinde meydana geldiğinde, Şekil 2.13'te gösterildiği gibi sinyal zamana karşı çizilerek gerçek zamanlı olarak bir sensorgram elde edilir.



Şekil 2.13. SPR biyosensör ile analitin bağlanmasının izlenmesi için tipik bir sensorgram.

Şekil 2.13'de görüldüğü gibi, denge adımından sonra bağlanma için biyosensör sistemine analit çözeltisi gönderilir. Ayrılma adımında, tampon çözelti, analit çözeltisinin yerini alır ve biyosensör üzerindeki bazı analitler ayrılır. Bir sonraki deney için, biyosensör üzerindeki tüm analitler rejenerasyon adımında uzaklaştırılır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

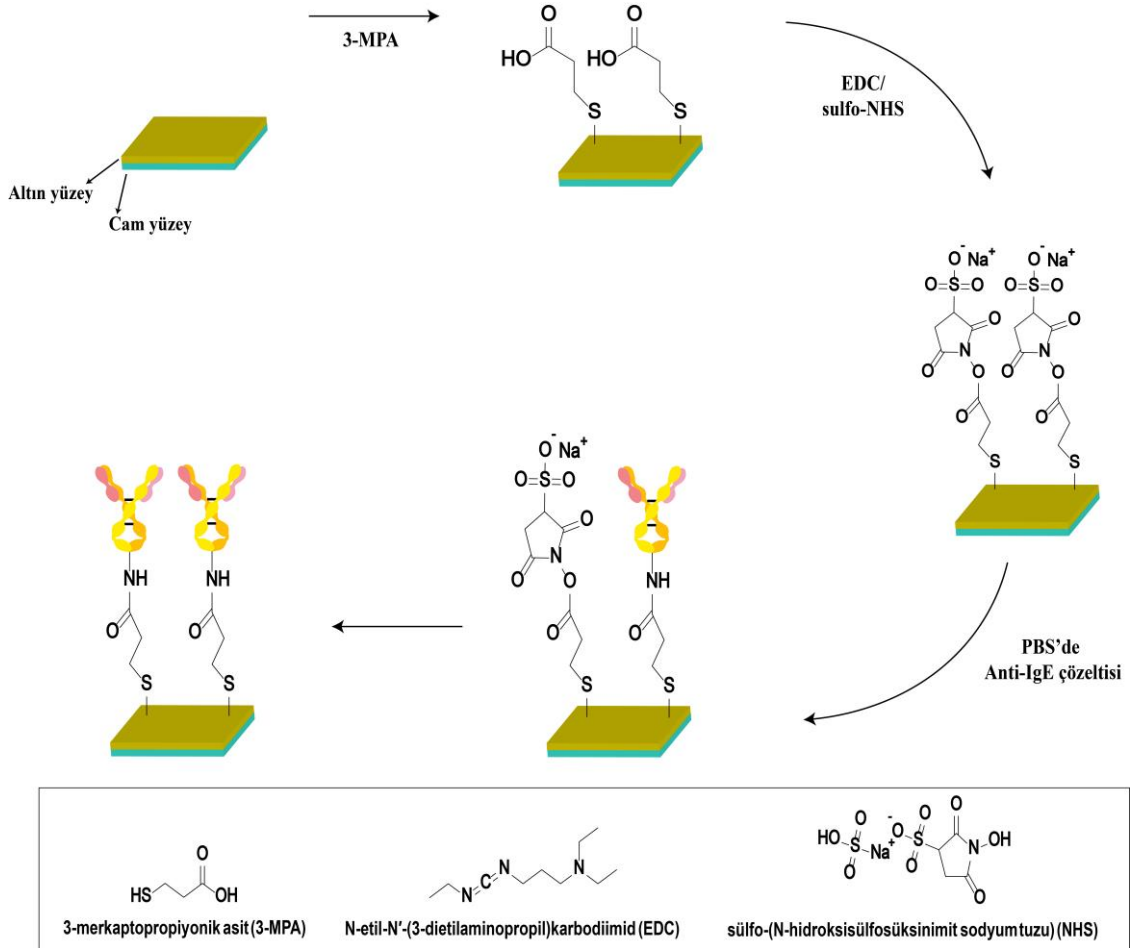
3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA), N-etil-N'-(3-dietilaminopropil)karbodiimid (EDC), N-hidroksisülfosüksinimit (NHS), glisin ve fosfat tamponlu salin (PBS) tablet Sigma-Aldrich MERK (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Miyogloblin (Myb), sığır serum albümin (BSA) ve Anti-Immunoglobulin E Sigma-Aldrich Chemical Co. firmasından temin edilmiştir. Total immunoglobulin E proteini Immulite System (Lianberis, UK) firmasından temin edilmiştir. Hidroklorik asit (HCl), asetik asit, sodyum hidroksit (NaOH) ve diğer kimyasal malzemeler analitik saflıkta olup MERK (Darmstadt, Almanya) firması tarafından temin edilmiştir. Immunoglobulin G (IgG) Clairyg firmasından temin edilmiştir. Deneylede kullanılan deiyonize su direnci 18 MΩ/cm'dir ve Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2. SPR Biyosensör Altın Çip Yüzey Modifikasyonu

SPR biyosensör yüzeyi modifiye edilmeden önce ilk adım olarak SPR biyosensör altın yüzeyi sıcak asidik pirana çözeltisi (3:1 H₂SO₄:H₂O₂, v/v) ile temizlenme işlemi yapılmıştır. Asidik pirana çözeltisi çip altın yüzeyde 10 saniye bekletilmiştir. Daha sonra SPR biyosensör çip yüzeyi saf su ve etil alkol ile yıkanmıştır ve etüvde 40°C sıcaklıkta 1 saat boyunca kurutulması sağlanmıştır. Yüzeyi temizlenen SPR biyosensör çip altın yüzeyine 50 µL 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA) çözeltisi damlatılmıştır ve bir gece boyunca yüzeyin işlevleştirilmesi için bekletilmiştir. Modifiye edilmiş SPR sensör yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve etüvde 40°C sıcaklıkta kurutulmuştur.

Daha sonra altın yüzey N-etil-N'-(3-dietilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve sülfonhidroksisülfosüksinimit (NHS) ile aktive edilmesi için 1:1 oranında EDC/NHS çözeltisi pH 7.4 PBS tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Yüzeyde karboksilik asit grupları oluşturarak anti-IgE kovalent olarak bağlanması gerçekteştirilmiştir. 3-MPA ile işlevleştirilmiş SPR çip yüzeyine 100 µL EDC/NHS karışımı damlatılmıştır ve yüzeyde 15 dakika bekletilmiştir. Bu işlem ard arda 3 defa tekrarlanmıştır. Daha sonra SPR biyosensör çip saf su ile yıkanmıştır ve etüvde 40°C sıcaklıkta 1 saat boyunca

kurutulmuştur. Son adımda anti-IgE'nin yüzeye tanıtılması için SPR çip yüzeyine damlatılmıştır ve kovalent olarak bağlanması gerçekleştirilmiştir. SPR biyosensör çipin hazırlanması için planlanan yüzey modifikasyonu adımları Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. SPR biyosensör çip yüzeyinin hazırlanmasının şematik gösterimi.

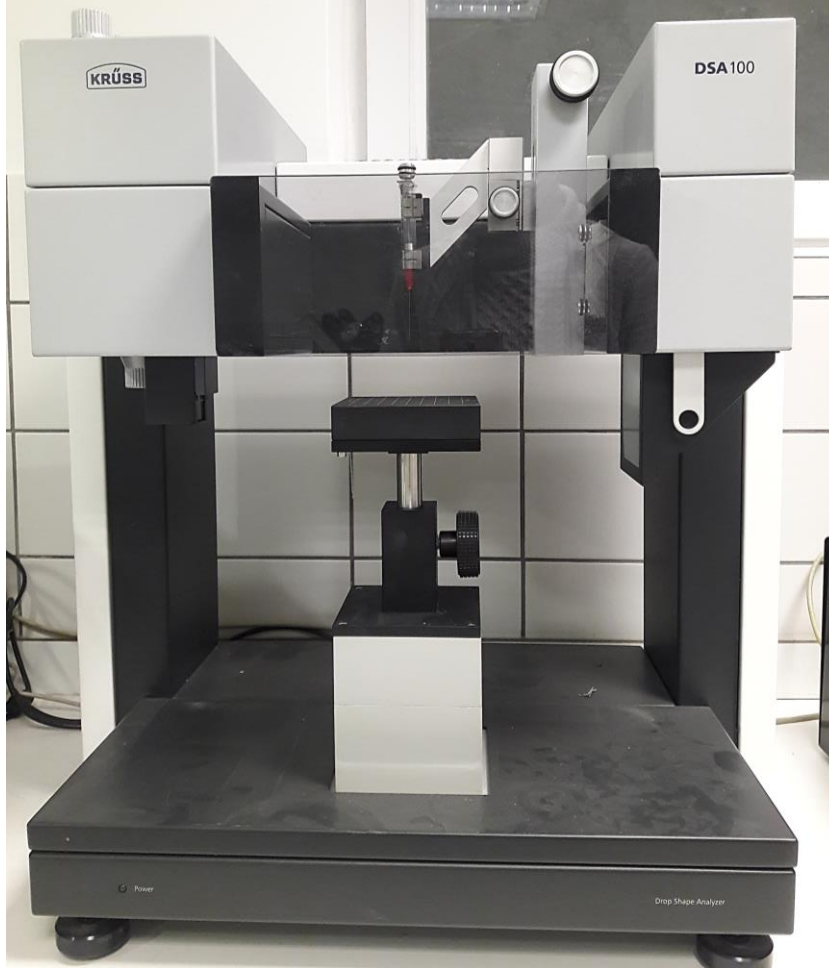
3.3. SPR Biyosensör Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan SPR biyosensör çip yüzeyi temas açısı, atomik kuvvet mikroskopu ve elipsometre kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.3.1. Temas Açısı

Temas açısı ölçümleri sırasında Krüss DSA 100 cihazı (Krüss GmbH, Hamburg, Almanya) kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan SPR biyosensör

ip yüzeyinin hidrofobikliği/hidrofilikliği özellikleri temas açısı ile analiz edilmiştir. Bu analizde bir şırınga içerisinde bulunan deiyonize su damlacıkları iğne yardımı ile SPR sensör ip yüzeyinin farklı noktalarına damlatılır. Katı yüzey ile deiyonize su arasında aı (θ , aı) oluşmaktadır.



şekil 3.2. Temas Açısı Krüss DSA cihazı görünütüsü.

3.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

SPR sensör çiplerinin altın yüzeyinin topografyasını belirlemek için atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Nanomagnetics Instruments, Oxford, UK) kullanılmıştır. AFM, katı yüzeylerin topografisini yüksek znrlkte görüntülemek için kullanılır. SPR biyosensör çipi, örnek tutucuya tutturulmuş ve görüntüleme çalışmaları hava ortamında ve non-contact mod ile yapılmıştır. Bu amaçla modifiye edilmiş SPR ip ve modifiye edilmeyen SPR çipler yüzey topografyalarının incelemesi non-contact mod ile

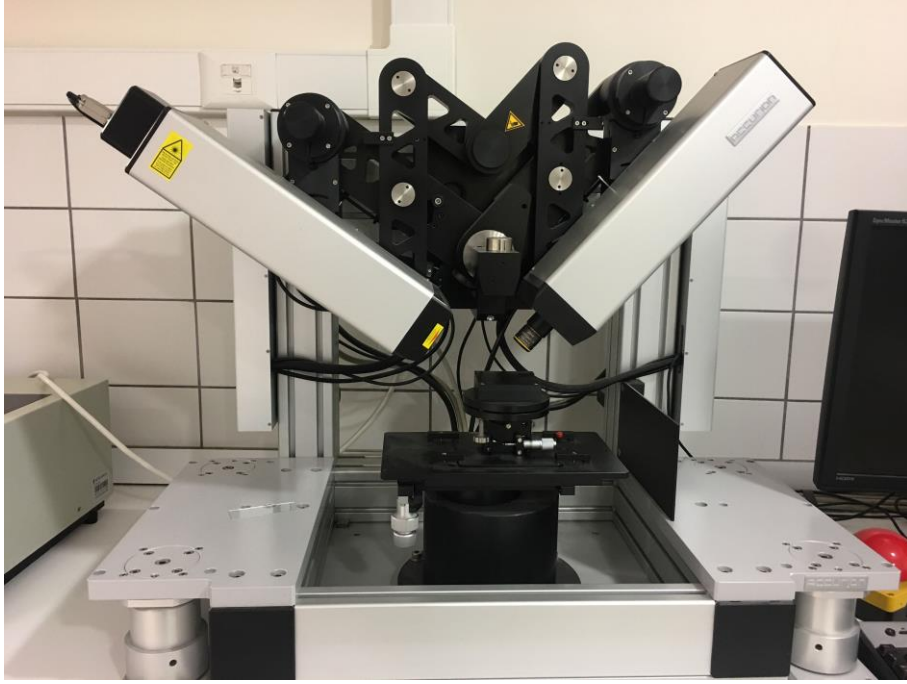
yapılmıştır. Farklı ölçek oranlarında yüzey görüntüleri alınmıştır ve yüzey pürüzlülük değerleri kaydedilmiştir.



Şekil 3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) cihazı görüntüsü.

3.3.3. Elipsometre

Hazırlanan boş ve modifiye edilmiş SPR biyosensörlerin ortalama yüzey kalınlık ölçümleri Nanofilm-EP3Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı kullanılarak karakterize işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yüzey kalınlıklarına ait ölçümler 532 nm dalga boyun ve 62°'lik geliş açısı kullanılmıştır. SPR biyosensör çip lazer ışık kaynağı altında bulunan platforma yerleştirilmiştir ve yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 prizma+50 nm altın yüzey veri olarak öngörülerek boş ve modifiye edilmiş SPR biyosensör çip yüzeyinden 6 farklı ayrı noktada ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanarak sonuçların ortalaması verilmiştir. Şekil 3.4'de Elipsometre cihazı görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Elipsomerte cihazı görüntüsü.

3.4. IgE Tayini için Kinetik Çalışmaları

3.4.1. Optik Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi

IgE tayini için kinetik çalışmalar SPR imager II (GWC Technologies, WI, USA) biyosensör cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Altın kaplı SPR çip (SPRchip™) aynı firmadan temin edilmiştir. Boş çipin altın yüzey kalınlığı ~50 nm'dir. SPR biyosensör sistemi ve altın çip görüntüsü Şekil 3.5'de sunulmaktadır.



Şekil 3.5. SPR biyosensör sistemi ve altın çip görüntüsü.

3.4.2. pH Etkisi

pH ortamı biyolojik reaksiyonlarda oldukça belirleyici bir etmen olarak karşımıza çıkmaktadır. Gerek sensör kapasitesinin ölçümünde gerekse hassasiyetinin belirlenmesinde optimum pH'yı saptamak adına pH taraması yapılmıştır. pH skalası olarak 4, 5, 6, 7.4 ve 8 seçilmiştir. 100 ng/mL derişimlerde hazırlanan IgE çözeltileri sırayla belirtilen pH'larda sisteme verilmiştir ve elde edilen sensogramlar kaydedilmiştir.

3.4.3. IgE Tayini

SPR biyosensör hazırlanmasından sonra IgE tayini için kinetik çalışmalara yürütülmüştür. IgE tayini çalışmalarının kinetik çalışmalar kısmı SPR imager II sensör sistemi ile 25 °C'de yapılmıştır. Öncelikle farklı derişimlerde IgE örnekleri pH 7.4 PBS tamponunda hazırlanmıştır. 1.0 ng/mL-1000 ng/mL derişim aralığında hazırlanan total IgE örnekleri sensöre entegre peristaltik pompa aracılığıyla SPR sensör çip yüzeyinden verilmiştir ve alınan sinyal yanıtları kaydedilmiştir. SPR biyosensör sistemine örneklerin verilmesi aşamalarını sırasıyla şu şekilde sıralayabiliriz: Öncelikle SPR biyosensör çip yüzeyi 20 mL deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra SPR biyosensör çip pH 7.4 PBS tamponuyla yaklaşık 45 dakika boyunca oda sıcaklığında dengelenmiştir. Bu denge basamağından sonra SPR biyosensör sisteminin rezonans açısı ayarlanmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan IgE örnekleri (3 mL örnek/150 µL/dakika akış hızı) sensör sistemine teker teker verilmiştir. Rezonans frekansındaki yani kırılma indisindeki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiştir ve işlem tekrar denge durumuna geldiğinde (~8 dak) sisteme 20mL ve 150 µL/dakika akış hızında 0.1 M pH 2.5 Glisin-HCl çözeltisi verilerek desorpsiyon basamağı gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonraki her bir derişim değerine ait sensorgramlar kaydedilmiştir. Her bir örnek tayininin ardından SPR sensör sistemi öncelikle su ve PBS tamponuyla birkaç tekrar ile yıkanarak temizlenmiştir. Denge durumunda getirilen SPR sensör sistemine farklı derişimlerdeki IgE örnekleri verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-denge adımları aynı işlemlerden geçerek tekrarlanmıştır.

3.4.4. Seçicilik Çalışmaları

Yüzey plazmon sensör sistemlerinin alameti farikası daha önceden de çok kez bahsedildiği gibi afiniteye son derece uygun olması ve dolayısıyla oldukça spesifik tayinleri yapabilmesidir. Seçicilik çalışmaları da tasarlanan sensörün hedef moleküle olan hassasiyetini gözlemlemede en önemli parametrelerden birisidir. Bu çalışmada sensör seçiciliğinin saptanması adına IgE molekülüne benzer özellikler gösteren HSA, MYB, IgG molekülleri kullanıldı. IgE, PBS tampon içerisinde ayrı ayrı BSA, Myb ve IgG ile sensör yüzeyinden geçirilmiştir ve elde edilen sensogramlar grafikleri elde edilmiştir.

3.4.5. Yapay Plazma Çalışmaları

Klinik uygulamalarda kullanılması amaçlanan her biyosensör için doğal duruma olabildiğince eş ortamlarda analizlerin yapılması gerekmektedir. Bu sebepten yapay plazma çalışmaları tıbbi metodolojilerde son derece büyük önem taşımaktadır. Bu durum göz önünde bulundurularak tasarlanan SPR biyosensör sisteminin gerçek örneklerdeki sonuçlarını incelemek adına tedarik edilen 1.0 mg/mL derişimindeki yapay plazma örnekleri sensör sisteminden geçirilerek IgE spesifik bağlanmasının kontrolü yapılmıştır.

3.4.6. Tekrar Kullanılabilirlik

Bir biyosensör tasarımı, teorik ve pratik olarak tüm beklentileri karşılarsa da seri üretime ve standart uygulamaya katılabilmesi için çok önemli bir özelliğe daha sahip olmalıdır; bu önemli tasarımın ekonomik sürdürülebilirliğidir. Ekonomik boyut hem tedavi hem de teşhis noktasında bir çalışmanın gerçekçiliğini de ortaya koyar. Bu çerçevede tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının önemi bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Tasarlanan SPR biyosensörün eşit derişimde IgE çözeltileri pH 7.4 PBS tampon ile 5 kez sisteme verilmiştir ve her adsorpsiyon adımından sonra Glisin-HCl ile desorbsiyon işlemi yapılmıştır.

3.5. Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Bir adsorpsiyon izotermi, bir maddenin sulu gözenekli ortamdan veya su ortamından sabit bir sıcaklık ve pH'ta bir katı faza tutulmasını (veya salınmasını) veya hareketliliğini

yöneten fenomeni tanımlayan bir eğridir [80,81]. Adsorpsiyon dengesi (adsorbe edilen miktar ile solüsyonda kalan arasındaki oran), adsorblayıcı içeren bir faz adsorban ile yeterli bir süre temas ettirildiğinde, yığın solüsyondaki adsorblayıcı derişimi ile arayüz derişimi ile dinamik bir dengede olduğunda kurulur [82,83]. Tipik olarak, adsorpsiyon sistemlerinin modelleme analizi, tasarımı ve uygulanabilir olmasına yönelik önemli bir rol oluşturan matematiksel korelasyon, genellikle katı fazın derişimine karşı grafiksel olarak ifade edilmesiyle gösterilir [84]. Altta yatan termodinamik varsayımlarla birlikte fizikokimyasal parametreleri, adsorpsiyon mekanizması, yüzey özellikleri ve ayrıca adsorbanların afinite derecesi hakkında bir fikir verir [85]. Bu nedenle literatürde adsorpsiyon olayını açıkladığı bildirilen çeşitli adsorpsiyon modelleri bulunmaktadır. SPR uygulamalarında adsorpsiyon modelleri arasında en çok kullanılan Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri bulunmaktadır. Adsorpsiyon izoterm modelleri Çizelge 3.1 de verilen denklemlerle temsil edilir:

Çizelge 3.1. Adsorpsiyon modelleri.

Scatchard	$\Delta m_{eq} / [C] = K_A (\Delta m_{max} - \Delta m_{eq})$
Langmuir	$\Delta m = \{ \Delta m_{max} [C] / K_D + C \}$
Freundlich	$\Delta m = \Delta m_{max} [C]^{1/n}$
Langmuir - Freundlich	$\Delta m = \{ \Delta m_{max} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n} \}$

burada Δm , SPR sensörünün birim alanındaki artan kütle miktarıdır ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$); C, IgE'nin derişimidir ($\mu\text{g}/\text{mL}$); $1/n$, Freundlich üssüdür; K_A ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ve K_D ($\text{mL}/\mu\text{g}$) ileri ve geri denge sabitleridir; eq ve max alt simgeleri sırasıyla dengelyi ve maksimumu gösterir.

Adsorbsiyon izoterm modeli parametreleri belirlemek için total IgE tayini kinetik analizlerinden elde edilen SPR biyosensör sinyal yanıtları kullanılmıştır. SPR verilerinin denge kinetik analiz modeline uygunluğu kinetik parametreler değerlendirilerek hesaplanmaktadır. Bu sebep için, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri hesaplanmaktadır. Freundlich izoterm modeli, analit

moleküllerinin çok katmanlı bağlanmasını gösterirken, Langmuir izoterm modeli, bağlanma bölgelerinin homojen olduğu varsayımına dayanır. Langmuir-Freundlich modeli, Langmuir ve Freundlich izoterm modellerinin sınırlayıcı davranışından türetilmiştir [86].

Hem fiziksel hem de kimyasal adsorpsiyon için en basit ve hala en kullanışlı izoterm Langmuir izotermidir. Adsorban yüzeyinde sadece tek bir molekül tabakası absorbe edilir, adsorban yüzeyi homojendir ve adsorpsiyon enerjisi tüm bölgeler için aynıdır ve yüzey düzleminde adsorbat geçişi yoktur.

Moleküller arası kuvvetler, mesafe arttıkça hızla azalır. Adsorbe edilen moleküller arasında etkileşim yoktur, yüzeydeki adsorpsiyon lokalizedir, bu da adsorbe edilen atomların veya moleküllerin belirli ve lokalize bölgelerde adsorbe edildiği anlamına gelir. Bu varsayımlara dayanarak, Langmuir izotermi denklemi şu şekilde ifade edilir:

$$Q_e = \frac{Q_e b C_e}{1 + b C_e}$$

Burada C_e denge analit (adsorbat) derişimini ifade etmektedir. Q_e teorik tek tabakalı kapasitesidir. b , adsorbat yüzeyinin aktif bölgelerine adsorbe etme eğiliminin bir kriteri olan denge sabitidir (L/mg). Daha büyük bir b değeri, daha yüksek adsorpsiyon enerjisini temsil eder.

Freundlich izoterm modeli Langmuir'in çok katmanlı adsorpsiyona uygulanabilen başka bir şeklidir. Bu model, adsorbanın yüzeyinin heterojen ve aktif bölgeler olduğunu ve enerjilerinin üstel olarak dağıldığını varsayılır.

Adsorpsiyon işleminin tamamlanmasıyla adsorpsiyon enerjisi katlanarak azalana kadar ilk önce daha güçlü bağlanma bölgelerine doğru arttığını ve çözeltildeki analitin derişimi

ile adsorban yüzeyindeki analit derişimin de arttığını varsaymaktadır. Freundlich izotermi denklem şu şekilde ifade edilir.

$$q_e = K_F C_e^{1/n}$$

burada K_F adsorpsiyon katsayısıdır ve adsorbat maddenin adsorban üzerine yapışma kabiliyetini temsil eder (adsorbanın nispi adsorpsiyon kapasitesi). $1/n$, adsorbat maddenin adsorban üzerine adsorpsiyon yoğunluğunu veya yüzey heterojenliğini gösterir. 0 ile 1 arasındaki eğim ($1/n$), uygun bir adsorpsiyon izotermi gösterir. Bu değer sıfıra yaklaştığında, adsorbanın yüzeyi daha heterojen hale gelir ve adsorpsiyon izotermi daha doğrusal olmayan hale gelirken, 1'in üzerindeki $1/n$, olumsuz adsorpsiyon izotermilerinin göstergesidir. $1/n$ 0.1'den daha küçük olduğunda, adsorpsiyon izotermi tersinmez izoterme yaklaşır.

3.6. Bağlanma Kinetik Modeli

Bağlanma bölgelerinin afinitesi hakkında daha kapsamlı bilgi elde etmek ve adsorpsiyon izotermilerinin sonuçlarını analiz etmek için, Scatchard grafik analizi uygulanır. Klasik Langmuir denkleminin diğer matematiksel dönüşümleriyle karşılaştırıldığında, Langmuir modelinin deneysel verilere iyi uyum gösterdiği denge derişim aralıkları hakkında farkındalık, aşağıdaki şekilde temsil edilen Scatchard denklemi ile daha kolay elde edilebilir:

$$\frac{q_e}{C_e} = Q^0 b - q_e b$$

burada Q^0 (mg/g) ve b (L/mg), Scatchard izoterm adsorpsiyon parametrelerini temsil eder. q_e/C_e 'nin q_e 'ye karşı Scatchard grafiğinden düz bir çizgi elde edilirse, o zaman adsorban sadece bir tip bağlanma yeri sunar (Homojen yüzey), ancak doğrusallıktan bir sapma elde edilirse, adsorbanın birden fazla tipte bağlanma yeri vardır. (Heterojen yüzey)

3.7. Denge Analizi

Toplam ligand miktarı $[B]_0$, yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanır. Tüm derişim değerleri SPR sinyali cinsinden ifade edilir. Kütlein derişime dönüştürülmesine gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücreinde sabit kaldığı yalancı- birinci derece koşulları altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$\frac{d\Delta R}{dt} = kaC (\Delta R_{max} - \Delta R) - kd\Delta R$$

Burada; $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değişim hızı; R ve R_{maks} , bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyal; C , analit derişimi (mg/mL), ka , bağlanma hız sabiti (mL/mg.s) ve kd , ayrılma hız sabiti (1/s)'dir. Bağlanma sabiti K_A (mL/mg), ka ve kd sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A=ka/kd$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\frac{\Delta R_{eq}}{C} = K_A \Delta R_{max} - K_A \Delta R_{eq}$$

Bu yüzden, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{denge}/C$ 'y karşı ΔR_{denge} grafiği ile hesaplanmaktadır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

$$\frac{d\Delta R}{dt} = kaC\Delta R_{max} - (kaC + kd)\Delta R$$

eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi eksi (-) $(kaC + kd)$ olan bir doğru vermektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir. Kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılmaktadır. R_{max} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram kullanılarak ka ve kd değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doğunluğa eriştirmek için çok yüksek analit derişimlerine gerek olduğu için R_{max} 'ın deneysel olarak belirlenmesi zordur. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleriyle ilişkili olan eğim değerini (S) vermektedir:

$$S = k_a C + k_d A$$

S'ye karşı çizilen C grafiğine ait, eğimi k_a olan bir doğru verir. Teorik değer olarak kesim noktası k_d değerini verir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem güvenilir değildir ve bu durumda daha güvenilir yöntem olan ayrılma kinetiğinin incelenmelidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0)$$

burada ΔR_0 , t_0 'daki başlangıç yanıt seviyesidir ve t zamanlarda ΔR , ayrılma eğrisi boyunca elde edilen değerleri temsil etmektedir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması kapsamında altı ana başlık incelenmiştir; i) SPR biyosensör çip yüzeyinin temizlenmesi; ii) 3-merkaptopropiyonik asit ile çip altın yüzeyinin işlevleştirilmesi; iii) EDC/NHS modifikasyonu; iv) anti-IgE'nin çip yüzeyine tanıtılması; v) SPR biosensör çiplerinin karakterizasyonu; vi) total IgE eş-zamanlı tayininin gerçekleştirilmesi.

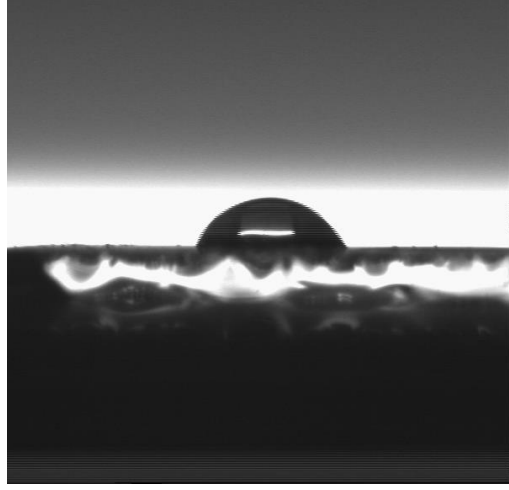
4.1. SPR Biyosensör Çiplerinin Karakterizasyonu

4.1.1. Temas Açısı Sonuçları

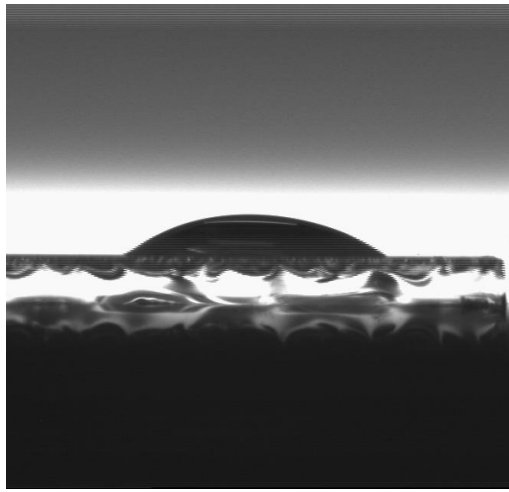
Sessile Drop yöntemiyle boş ve modifiye edilmiş olan SPR sensör çiplerinin temas açısı değerleri yüzeyine bir damla su damlatılarak incelenmiştir. SPR biyosensör çipin farklı yüzey bölgelerinin su damlatılarak üç farklı temas açısı değeri kaydedilmiş ve görüntüler alınmıştır. Temas açısı ölçümlerin sonuçları Çizelge 4.1 verilmiştir. Boş altın yüzeyi temas açısı değeri 60.5°, 3-MPA modifiye yüzey 28.13°, EDC-NHS/anti-IgE modifiye yüzey 36.38° bulunmuştur. SPR biyosensör çip Kaydedilen görüntüler Şekil 4.1'de sunulmaktadır. Yüzeyin hidrofilikliğinin artması modifikasyon işlemlerinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sonuçlara göre boş SPR çipin yüzey hidrofilikliğinin arttığı ve yüzeye hidrofilik yapıların bağlandığı söylenebilir.

Çizelge 4.1. SPR biyosensör çiplerine ait temas açısı değerleri.

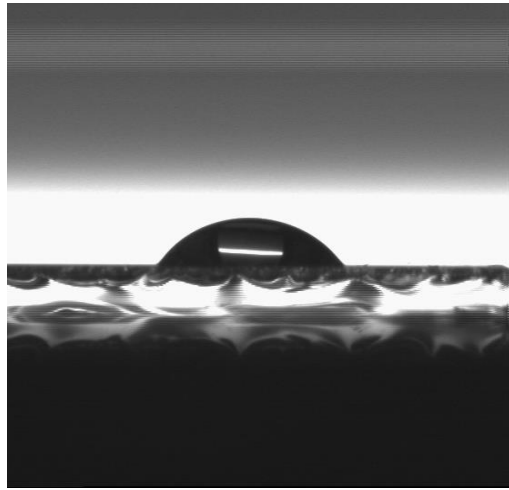
Yüzey	Temas açısı, °
Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi	60.5
3-MPA ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyi	28.13
EDC-NHS/anti-IgE modifiye edilmiş SPR biyosensör çip	36.38



(a)



(b)

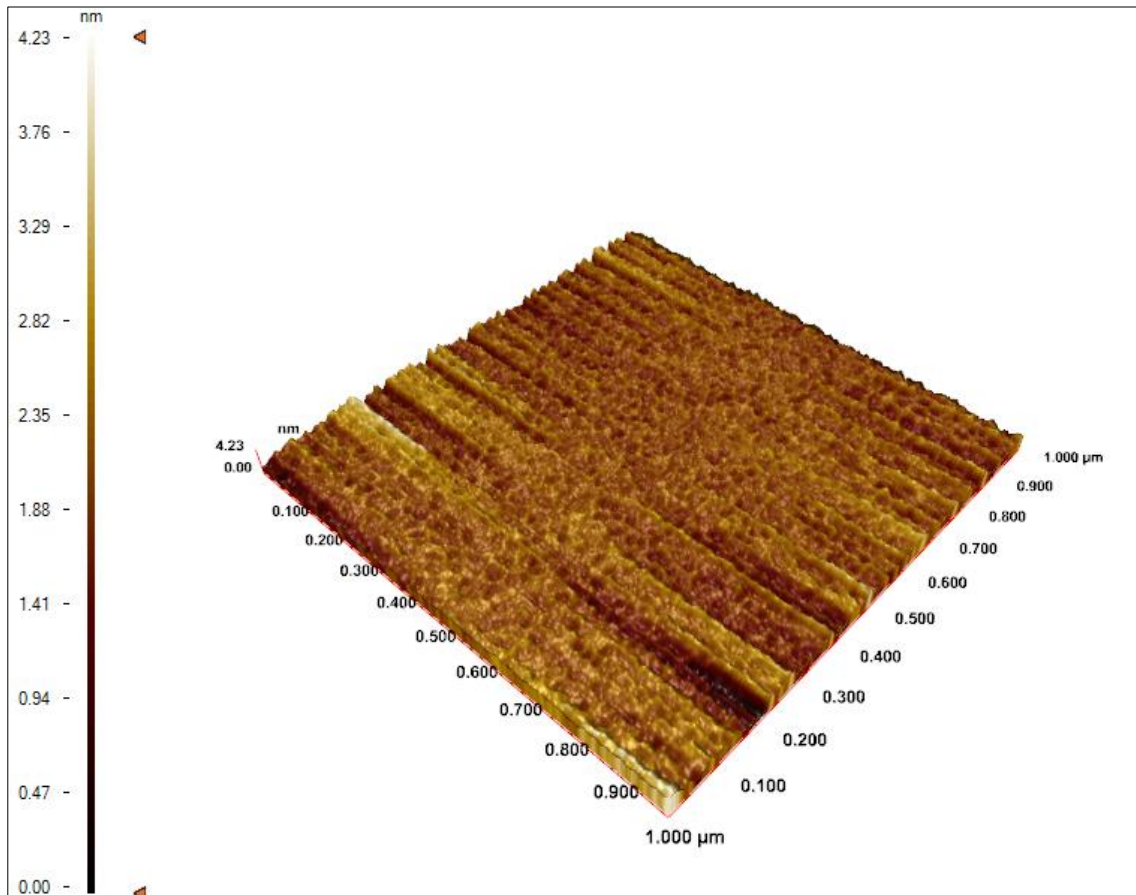


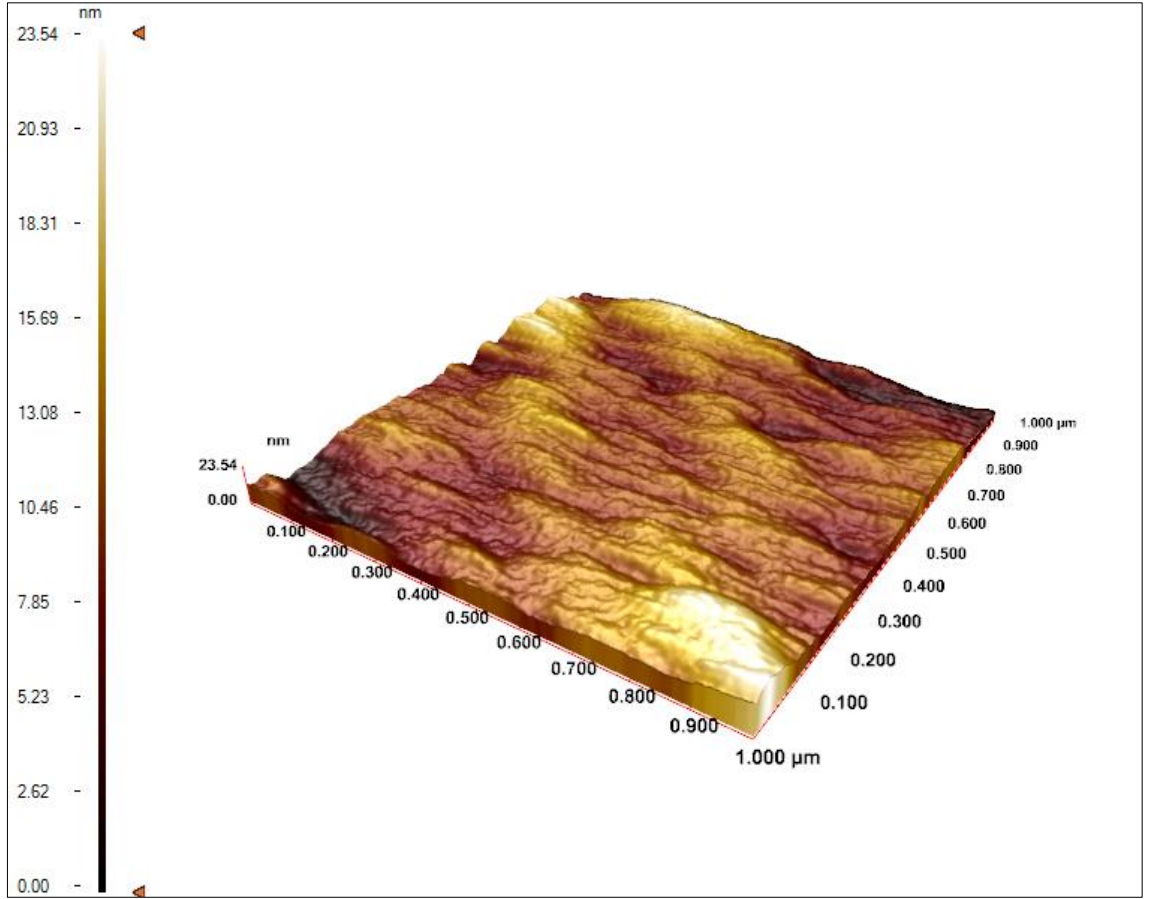
(c)

Şekil 4.1. Temas açısı sonuçları (a) boş çip yüzey görüntüsü; (b) 3-MPA modifiye edilmiş çip yüzey görüntüsü; (c) EDC-NHS/anti-IgE modifiye edilmiş chip yüzey görüntüsü.

4.1.2. AFM Sonuçları

Boş SPR biyosensör çip yüzeyi ve modifiye edilmiş SPR çip yüzey morfolojisini incelemek için atomik kuvvet mikroskobu ile karakterizasyon çalışması yürütülmüştür. Boş SPR çipinin yüzeyi asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiştir. Modifiye edilmemiş boş SPR çipin yüzey derinliği 0.28 nm olarak tespit edilmiştir. EDC-NHS/anti-IgE modifiye edilmiş SPR biyosensör çipin ortalama kalınlığı 8.36 nm olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar SPR altın yüzeyine modifikasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 4.2’de boş haldeki SPR çipi ve modifiye edilmiş SPR biyosensör çipi AFM görüntüleri sunulmaktadır.





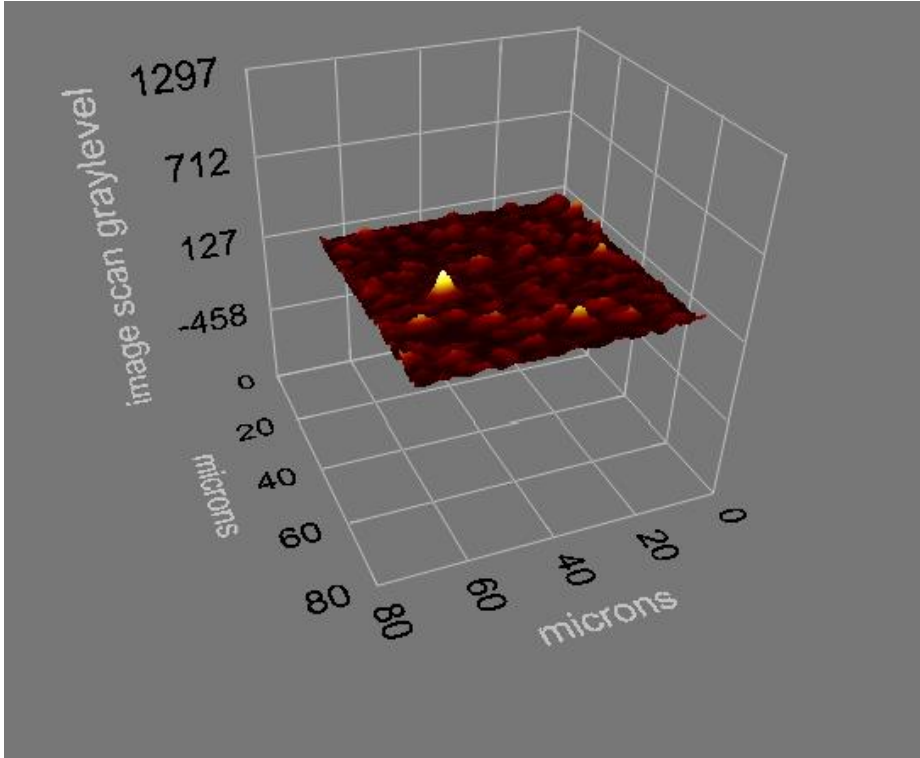
Şekil 4.2. (a) Boş çip; (b) modifiye edilmiş SPR biosensör çip.

4.1.3. Elipsometre Sonuçları

Nanofilm-EP3Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı Boş ve modifiye edilmiş SPR biyosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı için kullanılmıştır. Kalınlık ölçümleri 62°'lik geliş açısında 658 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Boş SPR altın yüzey kalınlığı 50 nm olarak ölçülmüştür. Modifiye edilmiş SPR biyosensör çipin kalınlığı ise 89.0 ± 2.8 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu sonuçların değişimi SPR çip altın yüzeyine kendi kendine düzenlenen tek tabakalar tekniği kullanılarak modifikasyon işleminin başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Yüzey kalınlıkları sonuçları SPR biyosensör sistemi ile yapılacak IgE ölçümleri için uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. SPR biyosensör film kalınlıklarının sonuçları.

Yüzey	Kalınlık (nm)
Boş altın yüzey	50
Modifiye edilmiş SPR biyosensör	89.0 ± 2.8



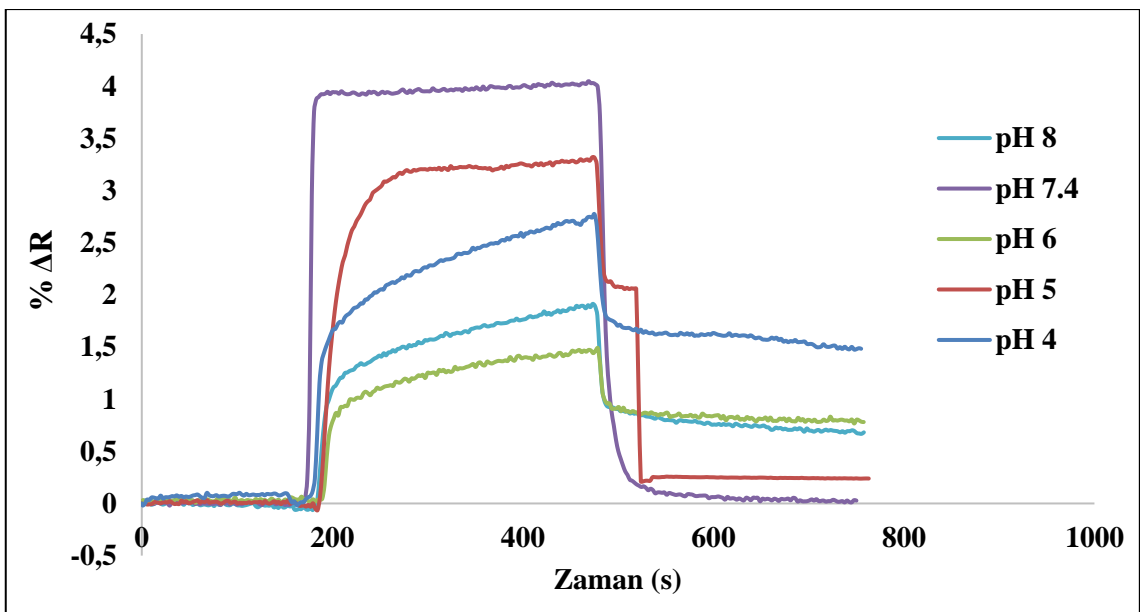
Şekil 4.3. Modifiye edilmiş çipin elipsometere görüntüsü.

4.2. Kinetik Çalışmaları

Bu çalışmada SPR biyosensör altın yüzeyi kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (self-assembled monolayers: SAMs) tekniği kullanılarak modifiye edilmiştir. Hazırlanan SAM tekniği ile hazırlanan SPR biyosensör çipi cihazına yerleştirildikten sonra çip yüzeyinin dengeye gelmesi için pH 7.4 denge PBS tamponu sistemden geçirilmiştir. Total IgE derişimi ile hazırlanan SPR biyosensör sinyal değişimi arasındaki ilişkinin incelenebilmesi için farklı derişimlerde IgE çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra SPR biyosensör çip yüzeyinde seçilen bölgelere PBS 7.4 tampon çözeltisiyle hazırlanan IgE örnekleri sisteme verilmiştir.

4.2.1. pH Etkisi Sonuçları

Farklı pH ortamında yapılan deneylerde SPR biyosensör çipi sinyal yanıtına etkisi incelenmiştir. pH 4-8 aralığında 100 ng/mL derişimde hazırlanan IgE örnekleri sisteme uygulanmıştır. Her bir ayrı pH adımında sistem denge tamponu olarak seçilen pH tampon çözeltisi kullanılmıştır. En yüksek sinyal yanıtı ΔR_{maks} 4.01 olarak pH 7.4 PBS tamponunda gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre optimum pH olarak PBS pH 7.4 seçilerek devam eden IgE tayini çalışmalar bu koşullar altında yürütülmüştür. Şekil 4.4'de farklı pH tamponu ile yapılan IgE tayini sensorgram grafiği verilmektedir.

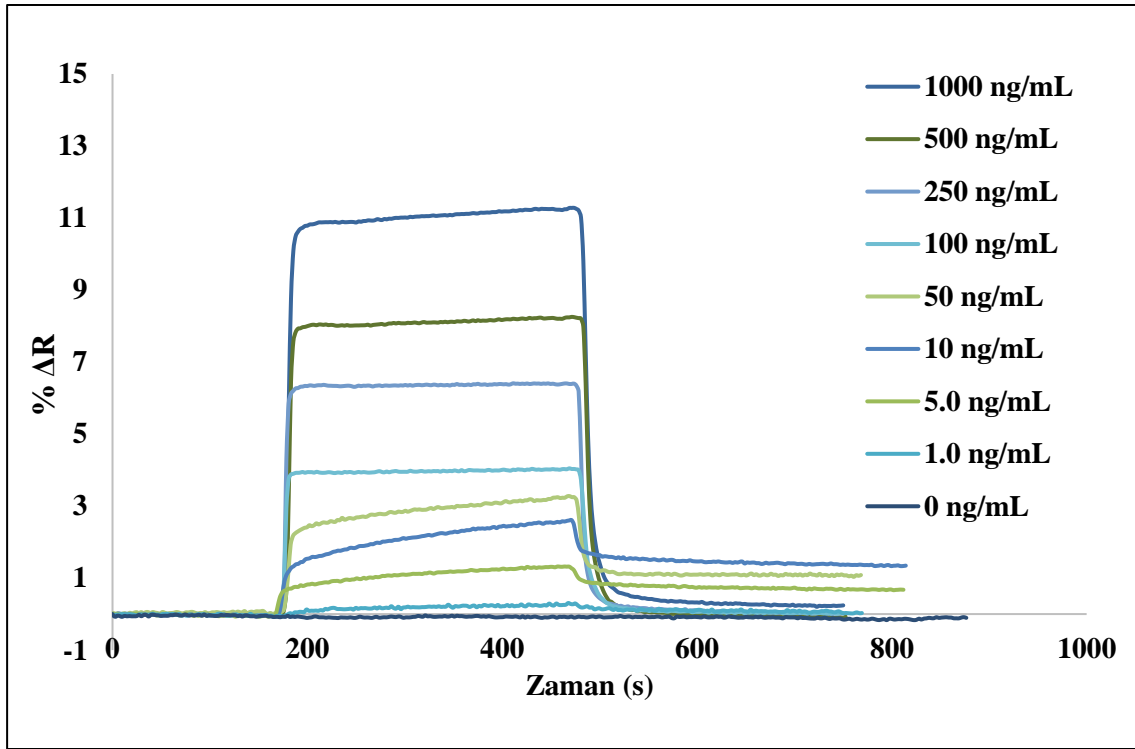


Şekil 4.4. Farklı pH tamponu ile yapılan IgE tayini sensorgram grafiği; Derişim: 100 ng/mL; Sıcaklık: 24 °C.

4.2.2. Total IgE Tayini

Total IgE derişimi ile SPR biyosensör sinyali arasındaki ilişkinin incelenebilmesi için IgE çözeltileri hazırlanmıştır. SPR çip yüzeyinde seçilen bölgelere 1.0 ng/mL-1000 ng/mL lineer ve geniş derişim aralığında PBS 7.4 tampon çözeltisiyle hazırlanan IgE örnekleri sistemden eş zamanlı olarak geçirilmiştir. Şekil 4.5'de farklı oranlara sahip derişimlerde hazırlanan IgE çözeltilerinin, SPR biyosensör arasındaki etkileşiminden elde edilen sensorgramlar gösterilmektedir. Bu sensorgramların elde edilmesi için gerçekleştirilen ölçüler sırasında; sistemden öncelikle ~3 dakika boyunca denge tamponu çözeltisi

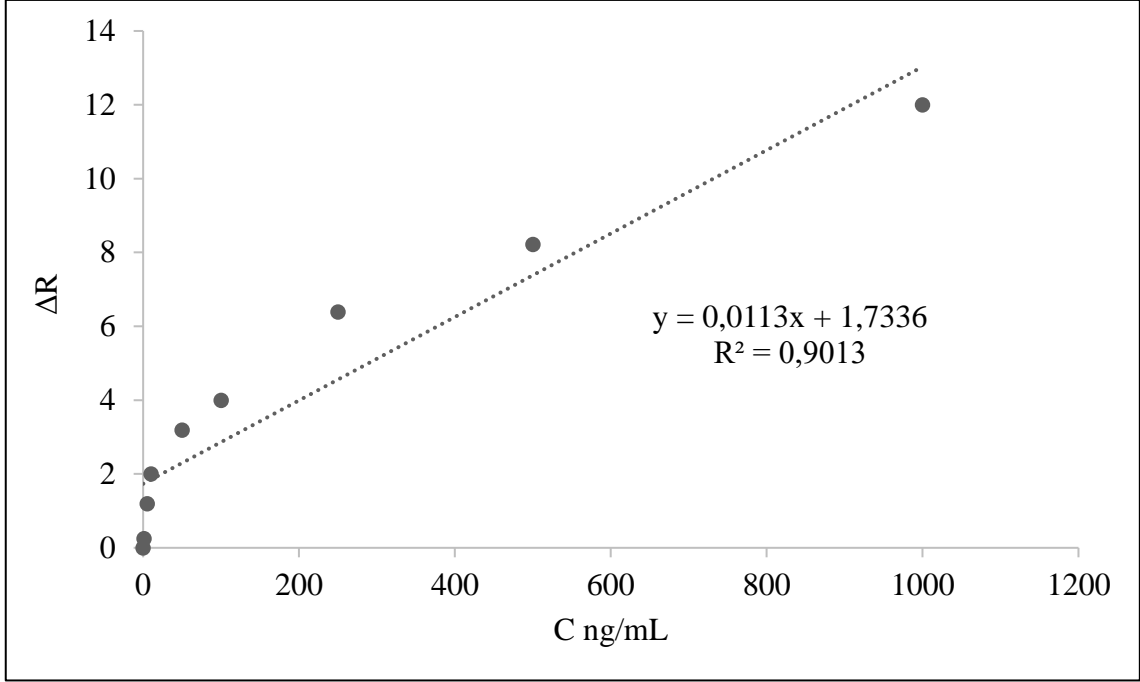
geçirilmiştir. Daha sonra ~5 dakika boyunca IgE örnekleri geçirilmiştir. Yaklaşık 8 dakika sonuna doğru sistem tekrardan dengeye ulaşmıştır. Daha sonra ~3 dakika boyunca 0.1 M pH 2.5 glisin-HCl desorpsiyon çözeltisi sistemden geçirilmiştir. Ard arda verilen ölçümler için her iki ölçüm arasında sistemin yeniden dengeye ulaşması için sisteme 15 dakika boyunca pH 7.4 PBS denge tamponu verilmiştir. Şekil 4.5’de görüldüğü gibi total IgE derişimi arttıkça ΔR_{maks} değeri artmaktadır. 0-1000 ng/mL derişim aralığında gözlenen sinyal maksimum ΔR değerleri doğru denklemi $y=0.0113x+1.7336$ olarak hesaplanmıştır. R^2 değeri 0.9013 doğrulukta IgE tayini yapılmaktadır. Total IgE tayini için hazırlanan kalibrasyon grafiği Şekil 4.6’de gösterilmektedir.



Şekil 4.5. SPR biyosensör ile 0-1000 ng/mL derişim aralığındaki total IgE örnekleri arasındaki etkileşimlere ait sinyallerin sensogram grafiği; (a) PBS 7.4 denge çözeltisi; (b) adsorpsiyon adımı; (c) desorpsiyon adımı.

SPR biosensörü ölçülebilir tayin sınırı hesaplanmıştır. Tayin sınırı (limit of detection: LOD) değeri için $LOD=3s$ olarak ifade edilmektedir. Burada s, SPR sinyal yanıtının standart sapmasını vermektedir. Total IgE tayini için geliştirilen bu sensörle LOD değeri 0.22 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (SAM) tekniği

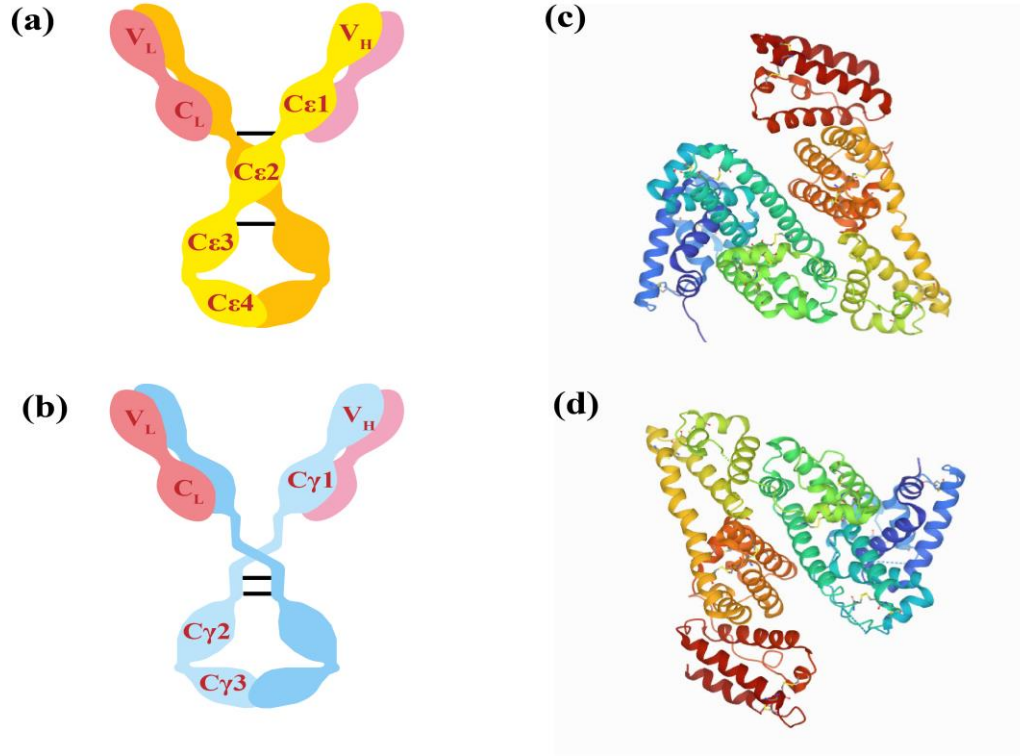
kullanılarak hazırlanan SPR biyosensörün IgE'ye oldukça seçici ve hassas olduğu görülmektedir.



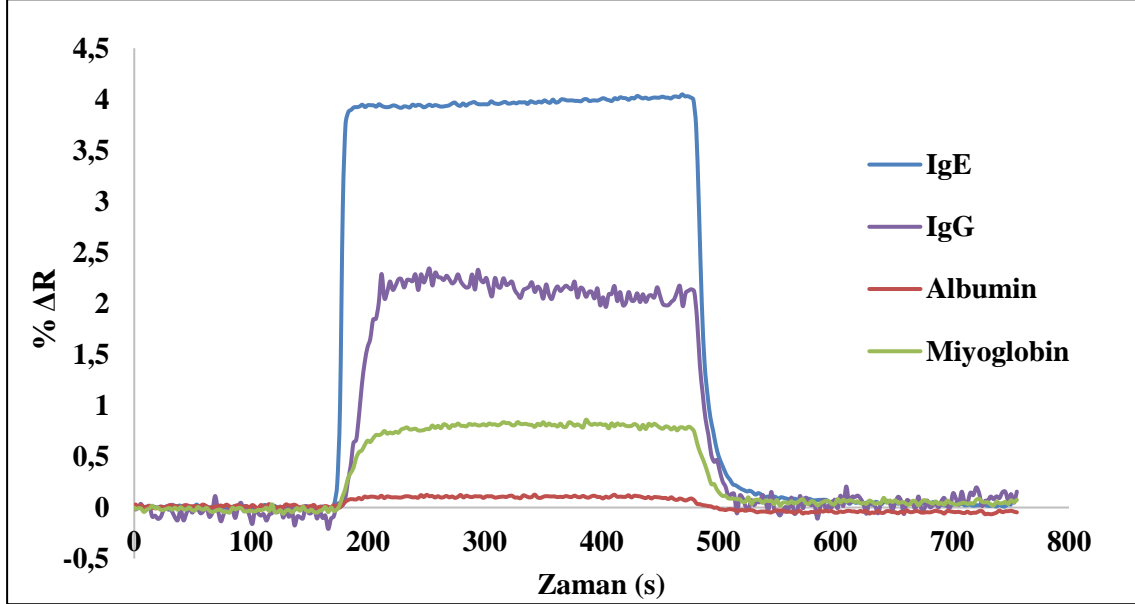
Şekil 4.6. SPR biyosensör ile derişime bağı kalibrasyon grafiğı: 0 ng/mL-1000 ng/mL IgE; PBS 7.4 tamponu.

4.3. Seçicilik Sonuçları

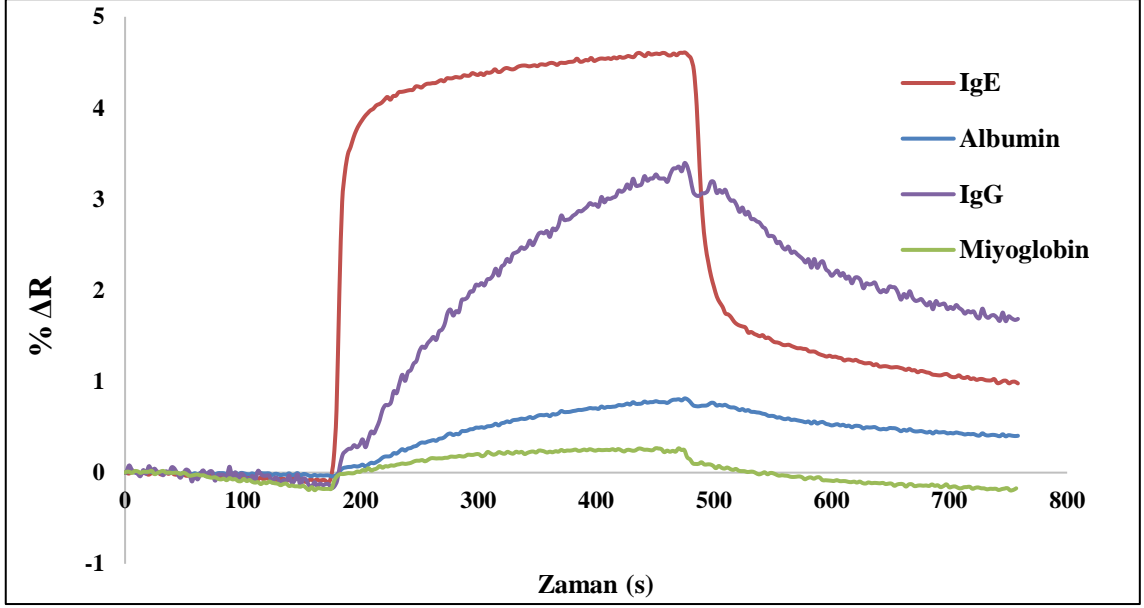
IgE için hazırlanan spesifik anti-IgE tanıtılmış SPR biyosensör çiplerin seçiciliklerinin belirlenmesi için 100 ng/mL derişiminde hem pH 7.4 PBS tamponu kullanılarak hem de yapay plazma ortamında protein çözeltileri hazırlanmıştır. SPR biyosensörün IgE'ye karşı seçiciliğini incelemek için IgE'ye benzer moleküler yapıdaki BSA, IgG ve Myb proteinleri kullanılmıştır (Şekil 4.7). SPR biyosensörden alınan sinyal değerleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'de gösterilmektedir. Şekil 4.8'da PBS tamponu ile yapılan deneyler sonucunda sinyal oranları görülmektedir. Tasarlanan SPR biyosensörün IgE bağlanma afinitesi diğer seçilen yarışmacı proteinlere göre daha yüksektir. Bu sonuçlar kendiliğinden düzenlenen tek tabaka tekniğı ile hazırlanan SPR çipin IgE için daha yüksek seçiciliğinin olduğunu göstermektedir. Şekil 4.9'de görüldüğü gibi yapay plazma örnekleri ile yapılan biyosensör çip ile IgE proteinine karşı seçici bir tayin gerçekleştiğı görülmektedir. Karmaşık bir çözelti ortamında dahi SPR biyosensörün kararlılığı oldukça yüksek olduğu söylenebilir.



Şekil 4.7. Proteinlerin yapısı: (a) IgE; (b) BSA; (c) IgG; (d) Myb.



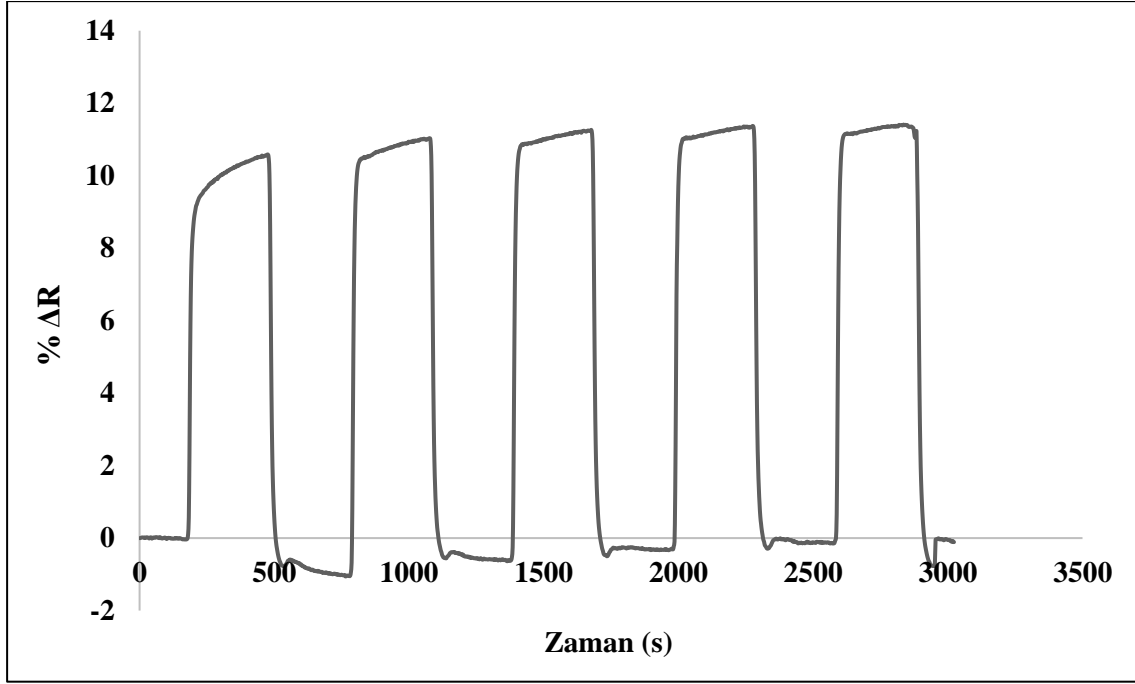
Şekil 4.8. SPR biyosensör çipin seçicilik sonuçları; Derişim: 100 ng/mL PBS pH 7.4 tamponu.



Şekil 4.9. SPR biyosensör çipin seçicilik sonuçları; Yapay plazma.

4.4. Tekrarlanabilirlik Sonuçları

SPR biyosensörlerin sağladığı en önemli avantajlardan biri tekrarlanabilir olmasıdır. Hazırlanan SPR biyosensör çipler gün içi ve gün aşırı ard arda tekrar kullanılabilmesi bu sistemlerin maliyet açısından avantajını ortaya koymaktadır. Tekrarlanabilirlik çalışmasındaki amaç; hedef analitin anında etiketsiz tayini yapılırken ölçümlerin tekrarlı çalışmalarında biyosensör sinyalinde kapasite değişimlerinin olmadığını gözlemlemektir. Bu önemli amaç doğrultusunda tasarlanan SPR çip yüzeyine 500 ng/mL IgE örneği ard arda eş zamanlı beş defa sisteme gönderilmiştir ve sinyallerdeki kararlılık gözlenmiştir. Şekil 4.10' de görüldüğü gibi IgE sensörlerde sinyal değişiminde bir azalma gözlenmeden ard arda IgE tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



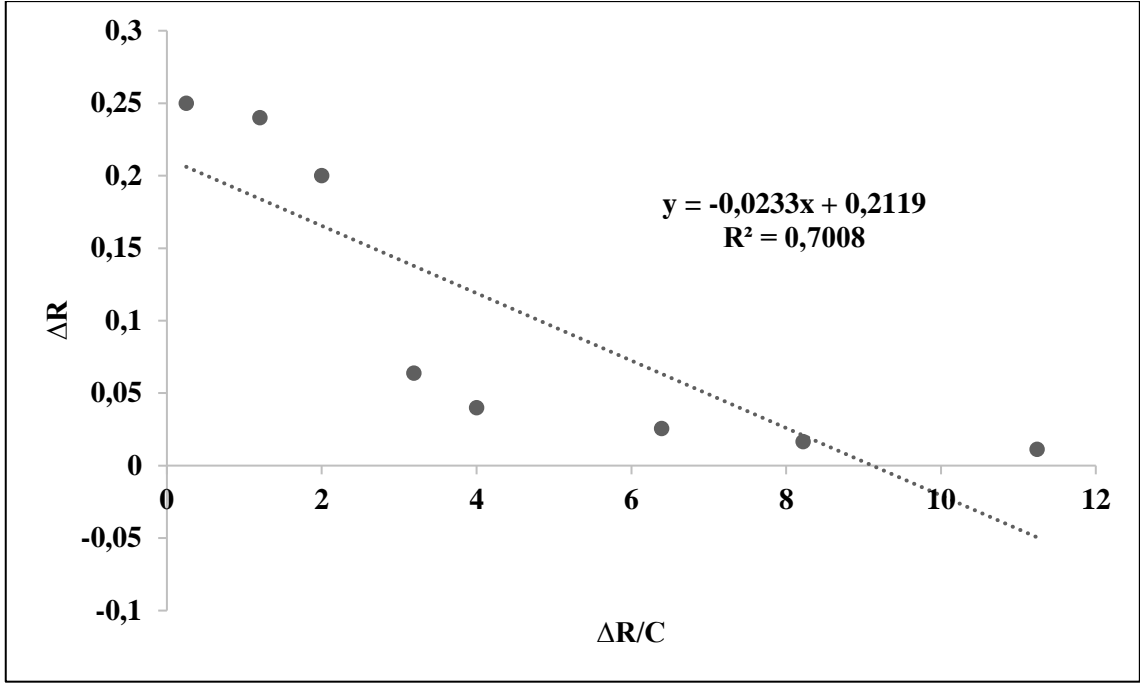
Şekil 4.10. SPR biyosensörün tekrarlanabilirlik sonuçları: Derişim 500 ng/mL.

4.5. SPR Biyosensörün Kinetik Modeli

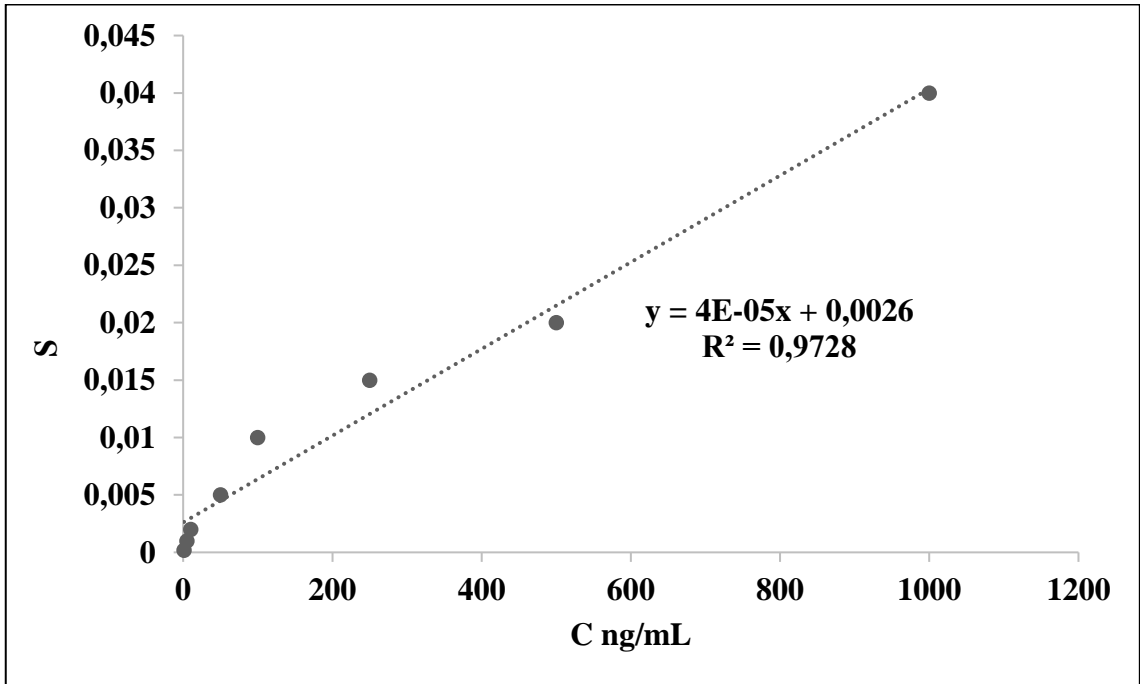
SPR biyosensörlerin kinetik analizi, hedef molekül-ile SPR çip arasındaki etkileşim için yapılmaktadır. Şekil 4.11’de denge kinetiği ve Şekil 4.12’de bağlanma kinetiği grafikleri sunulmuştur. Scatchard ve bağlanma kinetiği doğrularına ait denklemlerden elde edilen ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.3’de görülmektedir.

Çizelge 4.3. SPR çipin denge ve bağlanma kinetik parametre değerleri.

Denge kinetik Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	10.5	$k_a(\text{ng/mL})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.0004
$K_A, (\text{ng/mL})^{-1}$	0.02	$k_d (\text{s}^{-1})$	0.0026
$K_D, (\text{ng/mL})$	50	$K_D, (\text{ng/mL})$	6.5
R^2	0.7008	$K_A, (\text{ng/mL})^{-1}$	0.15
		R^2	0.9728



Şekil 4.11. SPR biyosensördeki hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel modellemeler; Scatchard izoterm modeli.

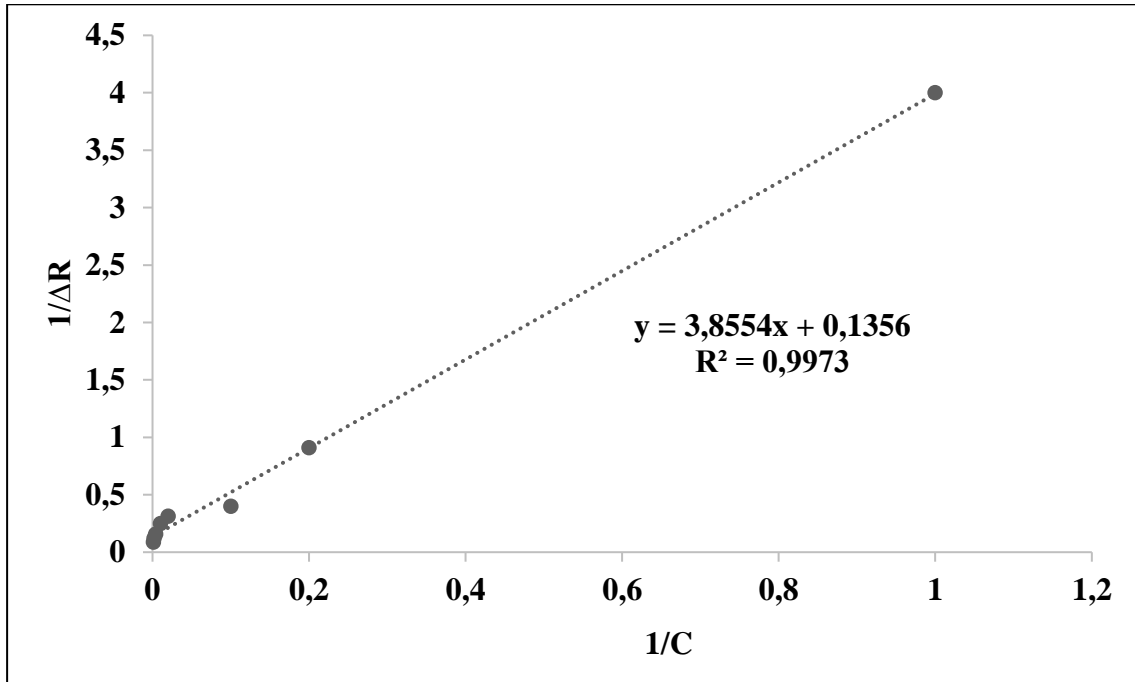


Şekil 4.12. SPR biyosensördeki hız parametrelerinin belirlenmesi için matematiksel modellemeler; Bağlanma kinetiği.

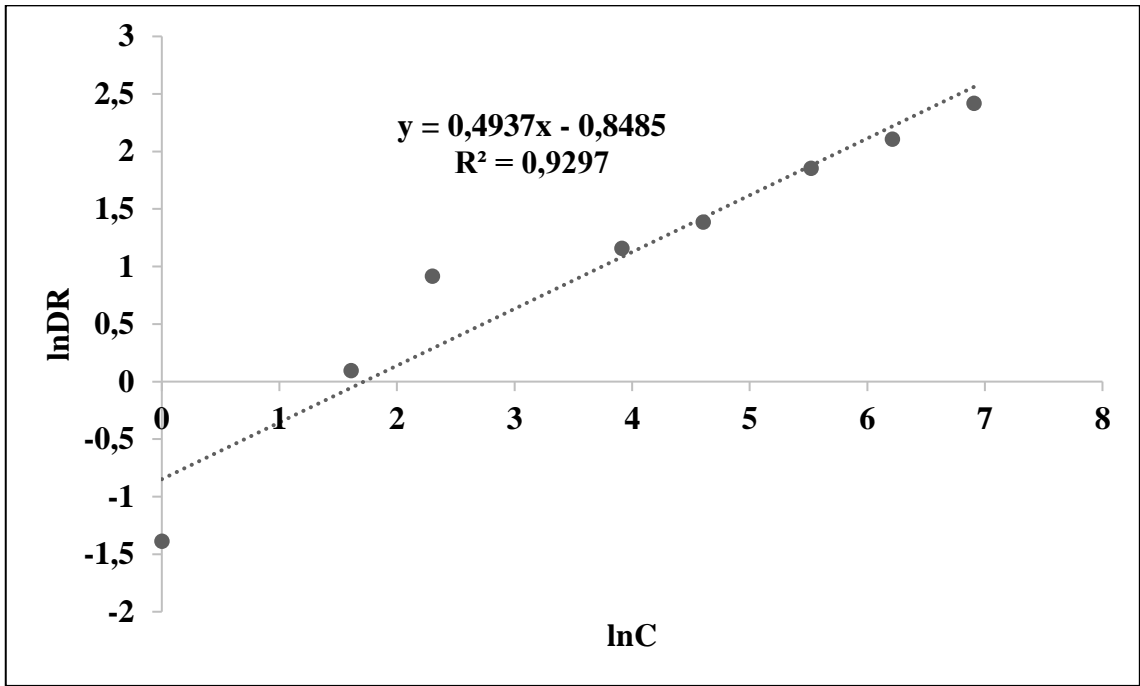
4.6. Langmuir ve Freundlich İzoterm Modeli

Denge durumunda ve sabit sıcaklığa sahip çözültide adsorplanmadan kalan çözüneneye ait derişimin, birim adsorban kütlesinde adsorplanan miktara karşı grafiğe geçirilmesiyle adsorpsiyon izotermi incelenmektedir. SPR biyosensör çipinin yüzey bağlanma homojenliğini belirlemek ve SPR biyosensör ile protein arasındaki etkileşimi incelemek ve tanımlamak için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri incelenmiştir.

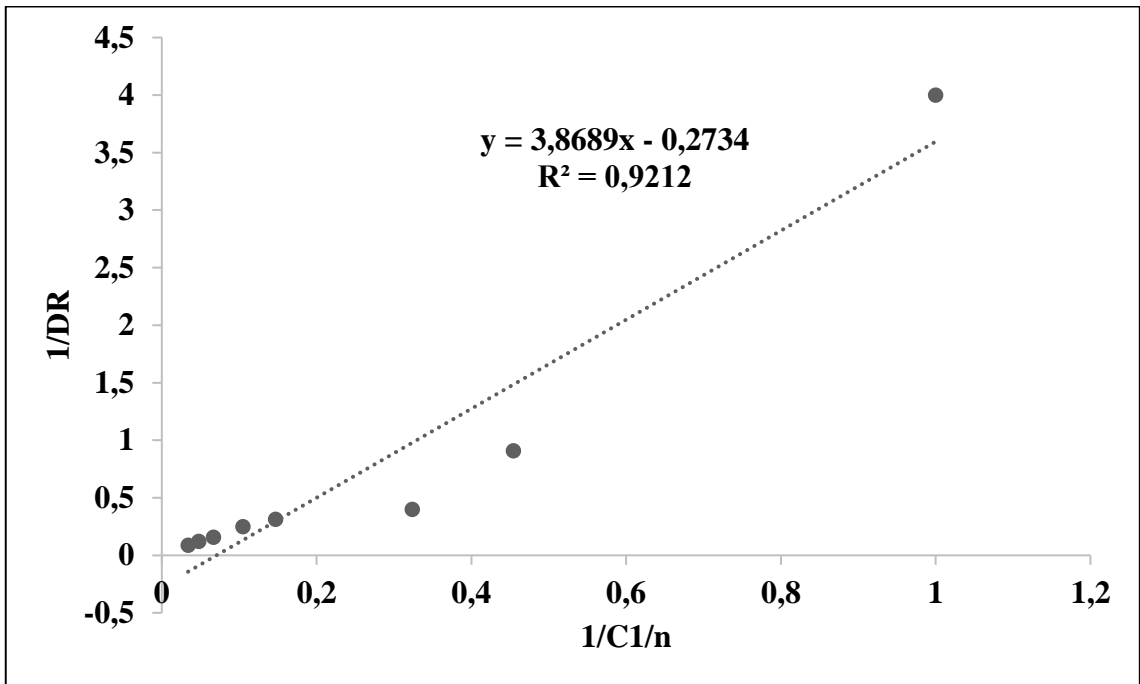
İncelenen Langmuir ve Freundlich izoterm modellerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de sunulmuştur. Çizelge 4.3'e göre IgE tayininde deneysel çalışmalar sonuçları da en uyumlu adsorpsiyon modeli Langmuir izoterm modelidir. Matematiksel hesaplamalarla IgE için $R^2=0.9973$ ve ΔR_{maks} değeri 9.09'dur. Bu sonuçlar tasarlanan SPR biyosensör çip yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlıdır. Aynı zamanda eş enerjili, tek tabakalı ve minimum düzeyde yanıl etkileşime sahip olduğunu göstermiştir. Deneysel olarak elde edilen maksimum ΔR değeri 11.24'dür. Adsorpsiyon modellerine göre bu değerin Langmuir adsorpsiyon izotermine ait modele uygun olduğu görülmüştür. Hazırlanmış olan SPR biyosensörünün yüzeyine ait etkileşimlerin tek tabakalı ve eş enerjili olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.13. Modifiye edilmiş SPR biyosensör Langmuir modeli.



Şekil 4.14. Modifiye edilmiş SPR biyosensör Freundlich modeli



Şekil 4.15. Modifiye edilmiş SPR biyosensör Langmuir-Freundlich modeli.

Çizelge 4.4. SPR biyosensörün Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modeli parametreleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{\max}	9.09	ΔR_{\max}	1.63	ΔR_{\max}	3.70
K_D , (ng/mL)	34.90	1/n	0.49	1/n	1.19
K_A , (ng/mL) ⁻¹	0.028	R^2	0.9297	K_D , (ng/mL)	14.29
R^2	0.9973			K_A , (ng/mL) ⁻¹	0.06
				R^2	0.9212

4.7. Literatür Özeti

Alerjen spesifik immünoglobulin E tayini için yüzey plazmon biyosensörlerin geliştirilmesi ile yapılan çalışmalar ile tez kapsamında alınan sonuçlar değerlendirilmiştir. Geliştirilen tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında tez kapsamında elde edilen sonuçların uyumlu olduğu ve düşük bir tayin sınırı elde edildiği bir SPR biyosensör yaklaşımı geliştirildiği görülmektedir (Çizelge 4.5).

Philippa ve ark., ters fazlı mikrodizi analizi için 8 dakikalık süre içerisinde alternatif bir kâğıt tabanlı dikey akış mikrodizi (VFM) analiz yöntemi geliştirmişlerdir. VFM platformu, tam serumda 1,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tayin sınırı ile IgE'nin saptanması için optimize edilmiştir. Daha sonra, yüksek IgE seviyeleri ile karakterize edilen nadir bir primer immün yetmezlik olan hiper IgE sendromu (hIgE) için 113 serum örneğini aynı anda taramak için optimize edilmiş koşullar kullanılmıştır [87].

Katerina ve ark., gıda ve çevredeki çok sayıda alerjene maruz kalınması nedeniyle insanlarda bulunan alerjinin (IgE) saptanması için elektrokimyasal bir sistem geliştirdiler. Geliştirilen sistem, aptamerin biyotinlenmiş bir formunu kullanarak IgE tespitini mümkün kılmıştır. Koşulların dikkatli seçimi sayesinde aptasensör, insanlarda antikor testi ($>300 \text{ ng mL}^{-1}$) için uygun seviyelerde çalışır ve bu tip antikor bazlı sensörlere benzer hassasiyet göstermektedir [1].

Margo ve ark., tarafından prob immobilizasyonundaki varyasyonu ve dizi teknolojisine özgü deneysel varyasyonları geliştirmek için kalibre edilmiş floresan geliştirme tekniği önerilmiştir. Yazarlar, insan serumundaki alerjene özgü IgE'lere yönelik ikincil antikorun 'Ara h1' (yer fıstığı majör alerjeni) ve diğer alerjenlere karşı oluşan floresan sinyaline bağlı protein miktarının güçlü bir doğrusal bağımlılığını kanıtladılar [88].

Çizelge 4.5. IgE tayini için yapılan biyosensör yöntemlerinin karşılaştırılması.

Biyosensör Tipi	Yöntem	LOD (ng/mL)	Örnek	Ref.
İmmünokimyasal	Dikey akış tahlilleri	1900	Serum	[87]
Elektrokimyasal	Aptasensör	300	Serum	[1]
Floresan	Mikroarray	49.3	Serum	[88]
Nanomalzeme	Kuantum noktaları	84	Serum	[89]
Tabanlı	Gümüş parçacık	20	Serum	[90]
	Minyatür dizi	2.4	Serum	[91]
Mikroakışkanlar	SPR	190	Tampon çözelti	[92]
	SPR görüntüleme	0.001	Tampon çözelti	[93]
Optik Temelli	SPR biyosensör	0.22	Tampon çözelti/Yapay Plazma	Bu Tez Çalışması

**LOD: tayin sınırı (1 ng/mL \equiv 0.417 kIU/L)

Geoffrey ve ark., tarafından bir serum IgE tahlilinde kaplanmış çiplerin işlevselliği test edildi ve düşük IgE seviyelerine kadar spesifik tepkiler gösterdi. Alerjene özgü IgE'nin tespiti, ng/mL seviyesine kadar hassasiyet gerektiren zorlu bir süreçtir. Alerjen kaplı çipler, alerjik ve alerjik olmayan hastalardan alınan insan serumu kullanılarak bir anti-kazein-IgE tahlili ile test edildi. Ayrıca, streptavidin konjuge kuantum noktaları ile optik sinyal geliştirmenin, 0.84 ng/mL (0.35 KU/L) IgE'nin altındaki numuneler için yanıtlar verdiği gösterilmiştir [89].

Zhoumin ve ark., çalışmalarında aptamer modifiye edici gümüş nanopartiküller kullanılarak 96 kuyulu mikrolaka dizileri için insan immünoglobulin E'nin (hIgE) hızlı, görsel bir protein algılama yöntemi geliştirmiştir. AgNP'leri modifiye etmek için spesifik olarak IgE'yi ve biyotinlenmiş oligonükleotitleri tanıyan bir aptamer kullandı. Elde edilen nanoprobalar, model analit hIgE'yi test etmek için kullanıldı. Saptama probu olarak aptamer ile modifiye edilmiş nanoparçacıklara dayalı bir "sandviç" yöntemi sundular. Gümüş güçlendirmenin kullanılması, sinyal yoğunluğunu önemli ölçüde arttırmıştır ve IgE için tayin sınırı 20 ng mL^{-1} olarak bulunmuştur [90].

Suhee ve ark., çalışmalarında IgE için SPR algılama sinyalini iyileştirmek için, biyofonksiyonel altın nanoparçacıkları (Au-Nps) ile yüzey oluşturulmuş sandviç kompleksleri kullanan, iki farklı yaklaşım tasarlanmış ve algılama performansları karşılaştırmıştır. IgE'nin (i) yüzey immobilize anti-IgE üzerine adsorpsiyonu, ardından IgE'ye özgü aptamer kaplı altın nanoparçacıklarının adsorpsiyonu ve (ii) IgE'ye özgü aptamer yüzeyi ve ardından anti-IgE kaplı altın nanoparçacıklarının adsorpsiyonu yoluyla oluşturmuşlardır. IgE'nin, anti-IgE ya da IgE'ye özgü aptamerler üzerine basit adsorpsiyonunun SPR tayin sınırı yaklaşık 1 nM olduğu bulunmuştur [92].

Amit ve ark., fıstık alerjisi için IgE antikoru için peptit ve karbonhidrat alerjen bağlayıcı kısımlar içeren ilk SPRi immünoassay çalışması gerçekleştirmişlerdir. Serum örneklerinden IgE'lerin atom altı seviyelerini saptamak için doğrudan SPRi çipi üzerindeki spesifik epitop noktalarına bağlandı. Manyetik partiküller, bağlanma parçasının kırılma indisini ve IgE'nin görünür bağlanma sabitlerini artırarak SPRi sinyallerinin tayin sınırı $0,5\text{--}1 \text{ pg mL}^{-1}$ olarak ölçülmüştür [93].

Lung ve ark., çalışmalarında, insan serumunda alerjene özgü IgE duyarlılıklarının taranması için mikroakışkan kartuş teknolojisinin performansını incelemişlerdir. Çalışmada mikroakışkan tahlil, düşük hacimli spesifik alerjen testi için hızlı otomatik analiz sağlamıştır. LOD'yi belirlemek için iki serum örneği kullanılmıştır. Test için seyreltme deneylerinden 1 IU/ml 'den (2.4 ng/ml) az olduğu tahmin edilmiştir [91].

Çizelge 4.6. İmmünglobun E tayini için elektrokimyasal biyosensörler.

Hedef	Yöntem	Reseptör	Doğrusal Aralık	Tayin Sınırı	Örnek	Ref.
IgE	Amperometri	Antibody	100–1500 ng/mL	0.09 ng/mL	Plazma	[6]
IgE	DPV	Aptamer	0.1–10 pg/mL	42 fg/mL	Serum	[94]
IgE	DPV	Aptamer	$\sim 4 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	$\sim 4 \times 10^{-6} \mu\text{g/mL}$	Serum	[95]
IgE	DPV	Aptamer	50 pM–2 nM	6 pM	Serum	[96]
IgE	DPV	Aptamer	0.5–30 nM	37 pM	Serum	[97]
IgE	DPV	Aptamer	1–10 000 ng/mL	0.52 ng/mL	Tampon	[98]
IgE	SWV	Aptamer	1–100 000 pM	0.16 pM	Tampon	[99]
IgE	SWASV	Aptamer	10–1000 ng/mL	3.6 ng/mL	Tampon	[100]
IgE	SWV	Aptamer	0.1–100 nM	60 pM	Serum	[101]
IgE	İletkenlik	Antibody	1–180 nM	1 nM	Tampon	[102]

**Tüm aptamerler, DNA aptamerleridir. DPV: Diferansiyel puls voltametri, SWV: Kare dalga voltametri, SWASV: Kare dalga anodik sıyırma voltametri

Kruezer ve ark., çalışmalarında tek kullanımlık ekran baskılı karbon elektrot teknolojisi ve alkalın fosfataz tarafından üretilen p-aminofenolün +300 mV'de Ag/AgCl'ye karşı amperometrik tespiti kullanılarak kan örneklerinde alerji antikorlarının (IgE) ölçümü için bir sensör sistemi geliştirmişlerdir. Sensör, 0.09 ng ml⁻¹ IgE tayin sınırı ile duyarlı hastalarda klinik olarak ilgili IgE aralığını içermektedir [6].

Wang ve ark., bu çalışmalarında, biyolojik numunelerde immünoglobulin E'yi (IgE) hassas bir şekilde tahlil edebilen bir kirlenme önleyici algılama arayüzü oluşturdu. Geliştirilen aptamer tabanlı elektrokimyasal biyosensör, 0.1-10 pg mL⁻¹ lineer aralığı ve 42 fg mL⁻¹ e kadar çok düşük bir tayin sınırı ile IgE'ye karşı ultra yüksek hassasiyet ve seçicilik sergilemiştir [94].

Li ve ark., bu çalışmalarında, enzim ve substrat arasında ayırıcı olarak IgE hedefi kullanılarak, bir elektronik kanal anahtarlama tabanlı (ECS) aptasensör geliştirmiştir. Geliştirilen ECS aptasensörünün, $4,44 \times 10^{-6} \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik bir tayin sınırı ve doğrusal aralığı $4,44 \times 10^{-6} - 4,44 \times 10^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$ sonuçlarını elde etmişlerdir (Klasik elektronik aptasensörlerle karşılaştırıldığında algılama hassasiyetinde 5 derecelik bir artış gözlemlenildi) [95].

Salimi ve ark., sandviç analiz yöntemi ile enzime bağlı aptamer ve redoks probu olarak titionin kullanarak bir elektrokimyasal immünoglobulin E (IgE) aptasensörü geliştirmişlerdir. Optimize edilmiş koşullar altında ve ölçüm tekniği olarak diferansiyel puls voltametri kullanıldığında, önerilen aptasensör düşük tayin sınırı (6 pM) ve yüksek hassasiyet ($1.88 \mu\text{A nM}^{-1}$) gösterdi. [96].

Somayeh ve ark., bu çalışmalarında elektrot yüzeyinde umut verici bir transdüksiyon platformu olarak MWCNTs/IL/Chit (çok duvarlı karbon nanotüpler/iyonik sıvı/kitosan) nanokompoziti ve etkili bir redoks göstergesi olarak MB (metilen mavisi) kullanarak basit ve etiketsiz bir elektrokimyasal aptasensör geliştirdi. Önerilen metodolojinin uygulanabilirliği kanıtlamak açısından bir model hedef proteini kullanılmıştır. Bu yöntem IgE'yi spesifik olarak tanımlamıştır ve IgE'nin tayin sınırı 37 nM olarak bulunmuştur. [97].

Jianlong ve ark., elektrokimyasal gösterge olarak metilen mavisi (MB) kullanarak insan immünoglobulin E'nin (IgE) ultrasensitif tespiti için bir metot geliştirdiler. Aptamer, nanomateryal ve antikorun avantajlarını birleştirilerek elektrokimyasal sandviç immünoassay tasarlayarak bir sensör geliştirmişlerdir. İnsan IgE'sinin 1-10.000 ng/ml aralığında saptanması için 0.52 ng/mL 'lik en düşük tayin sınırı ile iyi bir doğrusal ilişki elde edilmiştir [98].

Lee ve ark., çalışmalarında insan IgE tespiti için yakalama probu oldukça spesifik bir anti-insan immünoglobulin E aptamerine sahip, ultra hassas, etiketsiz, aptamer bazlı bir elektrokimyasal biyosensör geliştirdiler. İnsan IgE'sinin analizi için lineer aralığın 1 pM ile 100 pM arasında genişlemesine izin vermiştir. Tayin sınırı 0.16 pM olarak

bulunmuştur.. Üretilen aptasensör, insan IgG, trombin ve insan serum albümini 100 kat derişimlerde mevcut olduğunda bile insan IgE'sine karşı iyi bir seçicilik sergilemiştir [99].

Wei ve ark., çalışmalarında Ag nanoparçacıkları/grafen hibriti (AgNP'ler/grafen), SAM tekniğine göre üretilmiştir. Daha sonra streptavidin (SA) ile işlevselleştirildi ve sandviç tipi bir strateji aracılığıyla insan immünoglobulin E'nin elektrokimyasal tespitinde elektrokimyasal etiket olarak kullanıldı. Sonuçlar, bu elektrokimyasal biyosensörün 3.6 ng/mL'lik düşük bir tayin sınırı ile 10 ng/mL ile 1000 ng/mL doğrusal aralığa sahip olduğunu göstermiştir [100].

Jiang ve ark., bu çalışmalarında, aptamer problemlerinin yeni bir pseudoknot tasarımı kullanılarak, insan serumunda reaktifsiz ve tek aşamalı immünoglobulin E tespiti için bir elektronik sensör geliştirmişlerdir. Optimal koşullar altında, IgE için tayin sınırının 60 pM bulunmuştur. Sensör ayrıca seçicidir ve insan serum örneklerinde IgE'yi saptamak için kullanılabileceğini öngörmüşlerdir [101].

Hianika ve ark., çalışmalarında sisteamin veya sisteamin-sığır serum albumin aracılığıyla ince altın yüzeye bağlanan antikordan oluşan protein film temelli biyosensör geliştirmişlerdir. Antijen (Ag)-antikör (Ab) etkileşimi, iletkenlik ölçümü ile tespit edildi. İnsan IgE'si için tayin sınırı yaklaşık 1.0 nM'dir. Ancak yanıtın şiddeti, altın desteğe antikör eklenme yöntemine bağlı olarak değişmektedir [102].

5. YORUM

Sunulan tez çalışmasında kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar tekniği kullanılarak hazırlanan SPR biyosensörler ile eş zamanlı ve yüksek hassasiyette total IgE tayini gerçekleştirilmiştir. SPR biyosensör çip altın yüzeyi karboksilik grupların yüzeyde bulunması için 3-merkaptopropiyonik asit ile bir gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra yüzeyi işlevleştirilen SPR çip EDC/NHS karışımı ile etkileştirilmiştir. N-terminal uçların olduğu çip yüzeyine anti-IgE molekülü tanıtılmıştır. Hazırlanan SPR biyosensör ile PBS 7.4 tamponu kullanılarak total IgE tayini incelenmiştir.

SPR biyosensör çip yüzeyi pirana çözeltisiyle temizlendikten sonra 3-merkaptopropiyonik asit çipin altın yüzeyine eşit olarak damlatılmıştır. Ardından modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş SPR biyosensörlerin karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür.

SPR biyosensör çipin yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ve yüzey hidrofiliği temas açısı cihazları kullanılarak karakterize edilmiştir. Sessile Drop tekniği ile temas açısı ölçümleri yapılmıştır ve boş çip altın yüzey, 3-MPA damlatılmış, modifiye edilmiş SPR biyosensör çip yüzeyi sırasıyla 60.5°, 28.13° ve 36.38° olarak bulunmuştur. SPR biyosensör çipin farklı yüzey bölgelerine su damlatarak yüzey görüntüleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara boş SPR çipin yüzey hidrofiliğinin arttığını ve altın yüzeye hidrofilik yapıların bağlandığını temas açısı değerinin azalmasıyla göstermektedir.

SPR biyosensör çip altın yüzeyi morfolojik karakterizasyonu AFM ile incelenmiştir. Boş SPR çip ve modifiye edilmiş SPR çiplerin yüzey morfolojisi üç boyutlu yüzey görüntüleri alınmıştır. Ortalama yüzey pürüzlülüğü; Boş altın çipin 0.28 nm ve modifiye edilmiş SPR biyosensörün 8.8 nm'dir. Bu pürüzlülük sonuçları ve yüzey görüntülerinin farkı SPR biyosensör altın yüzeyine kendi kendine oluşan tektabaka yönteminin başarı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Boş ve modifiye edilmiş SPR biyosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı için Nanofilm-EP3Nulling Elipsometre cihazı kullanılmıştır. Kalınlık ölçümlerine ait veriler 62°lik geliş açısında 658 nm dalga boyunda sahip olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Boş SPR

altın yüzey kalınlığı 50 nm olarak ölçülmüştür. Modifiye edilmiş SPR biyosensör çipin kalınlığı ise 89.0 ± 2.8 olarak tespit edilmiştir.

Başarılı bir şekilde tasarlanan SPR biyosensör çiplerin karakterizasyon çalışmaları sonrasında hedef molekül IgE ile hazırlanan örnekler ile SPR cihazında kinetik çalışmaları yürütülmüştür. 1.0 ng/mL ila 1000 ng/mL arasında IgE derişimleri tayini için SPR sensor yanıt sinyali ile doğrusal bir ilişki kaydedilmiştir. IgE tayin sınırı 0.22 ng/mL olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında sunulan SPR biyosensör sistemi ile farklı sensör sistemleri ile yapılan çalışma sonuçları karşılaştırılması yapılmıştır. Geniş derişim aralığına sahip ve düşük tayin sınırı değerinin rapor edilen çalışmalar ile uyumlu sonuçlar gösterdiği görülmüştür.

Sulu çözeltilerde ve yapay plazma örneklerinde IgE tayini çok hassas bir şekilde yaklaşık 10 dakika kadar sürede gerçekleştirilmiştir.

SPR biyosensörlerin tekrar tekrar kullanılabilirliği PBS 7.4 tamponu içerisinde 500 ng/mL IgE içeren örnekler tekrarlı bir şekilde beş (5) defa gönderilmiştir ve SPR sinyal yanıtı değişimi eş zamanlı olarak izlenmiştir. Sonuç dahilinde tasarlanan biyosensörlerde sinyal yanıtının değerinde bir azalma gözlenmeden ard arda IgE numunesi verilmesi sonucunda IgE tayini gerçekleştirilmiştir.

IgE'yi spesifik tanıyan SPR biyosensörün seçiciliğinin gösterilmesi için farklı yapılarda proteinler kullanılarak incelenmiştir. Bu amaç için BSA, Myb ve IgG proteinler 100 ng/mL derişimde PBS 7.4 tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir protein çözeltisi SPR biyosensör sistemine verilmiştir. Sinyal yanıtı sensorgram grafikleri kaydedilerek IgE'ye karşı tasarlanan SPR biyosensörün diğer proteinlere verdiği düşük sinyal değerleri elde edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] K.I. Papamichael, M.P. Kreuzer, G.G. Guilbault, Viability of allergy (IgE) detection using an alternative aptamer receptor and electrochemical means, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 121 (2007) 178–186.
- [2] S.J. Galli, M. Tsai, A.M. Piliponsky, The development of allergic inflammation, *Nature*. 454 (2008) 445–454.
- [3] T. V. Rajan, The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: A re-interpretation, *Trends in Immunology*. 24 (2003) 376–379.
- [4] M. Larché, C.A. Akdis, R. Valenta, Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy, *Nature Reviews Immunology*. 6 (2006) 761–771.
- [5] Y. Yanase, T. Hiragun, T. Yanase, T. Kawaguchi, K. Ishii, M. Hide, Application of SPR imaging sensor for detection of individual living cell reactions and clinical diagnosis of type I allergy, *Allergology International*. 62 (2013) 163–169.
- [6] M.P. Kreuzer, C.K. O’Sullivan, M. Pravda, G.G. Guilbault, Development of an immunosensor for the determination of allergy antibody (IgE) in blood samples, *Analytica Chimica Acta*. 442 (2001) 45–53.
- [7] X. Su, F. Tim Chew, S.F.Y. Li, Piezoelectric quartz crystal based label-free analysis for allergy disease, *Biosensors and Bioelectronics*. 15 (2000) 629–639.
- [8] Y. Li, J. Ren, H. Nakajima, B.K. Kim, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, Flow sandwich immunoassay for specific anti-OVA IgG antibody by use of surface plasmon resonance sensor, *Talanta*. 77 (2008) 473–478.
- [9] S. Akgönüllü, H. Yavuz, A. Denizli, Surface Plasmon Resonance Based Sensors For Allergens Detection, in: A. Denizli (Ed.), *Affinity Sensors*, Palme Dizgi Grafik Birimi, Ankara, 2019: pp. 151–162.
- [10] D. Dziedzic, C.S. Wheeler, K.B. Gross, Bronchoalveolar Lavage: Detecting Markers of Lung Injury, in: *Handbook of Hazardous Materials*, Elsevier, 1993: pp. 99–111.
- [11] J.M. Cameron, C. Bruno, D.R. Parachalil, M.J. Baker, F. Bonnier, H.J. Butler, H.J. Byrne, Vibrational spectroscopic analysis and quantification of proteins in human blood plasma and serum, in: *Vibrational Spectroscopy in Protein Research*, Elsevier, 2020: pp. 269–314.
- [12] T.J. Kindt, R.A. Goldsby, B.A. Osborne, Kuby Immunology, in: *Immunology*, 6

- th ed, W. H. Freeman, New York, NY, 2007: pp. 76–105.
- [13] J.C. a Jr, N. York, G. Science, The structure of a typical antibody molecule, *Immunobiology*. (2001) 1–10.
- [14] A. Turner, M. Minunni, E. Brys, S. Tombelli, M. Mascini, Approaches to Allergy Detection Using Aptasensors, in: *Smart Biosensor Technology*, CRC Press, 2006: pp. 539–566.
- [15] S. Akgönüllü, H. Yavuz, A. Denizli, Molecularly Imprinted Based Sensors for Detection of Allergens, in: *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications*, Elsevier, 2021: pp. 309–334.
- [16] S.T. Holgate, D. Broide, New targets for allergic rhinitis - A disease of civilization, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2 (2003) 903–914.
- [17] T.A.E. Platts-Mills, The role of immunoglobulin E in allergy and asthma, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 164 (2001) 1–5.
- [18] Y.H. Kim, J.P. Kim, S.J. Han, S.J. Sim, Aptamer biosensor for lable-free detection of human immunoglobulin E based on surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 139 (2009) 471–475.
- [19] H.J. Gould, R.L. Beavil, IgE, *Encyclopedia of Immunology*. (1998) 1202–1208.
- [20] F. Khan, C. Chang, Human Autoantibodies in Urticaria, Angioedema, and Other Atopic Diseases, *Autoantibodies: Third Edition*. (2014) 93–101.
- [21] R. Gupta, A. Sheikh, D.P. Strachan, H.R. Anderson, Time trends in allergic disorders in the UK, *Thorax*. 62 (2007) 91–96.
- [22] R. Coombs, G. Philip, Clinical Aspects of Immunology., *Annals of Internal Medicine*. 71 (1969) 229.
- [23] B.H. Gobel, Hypersensitivity Reactions to Biological Drugs, *Seminars in Oncology Nursing*. 23 (2007) 191–200.
- [24] M.A. Riedl, A.M. Casillas, Adverse Drug Reactions: Types and Treatment Options, *American Family Physician*. 68 (2003) 1781–1790.
- [25] S.G.O. Johansson, T. Bieber, R. Dahl, P.S. Friedmann, B.Q. Lanier, R.F. Lockey, C. Motala, J.A. Ortega Martell, T.A.E. Platts-Mills, J. Ring, F. Thien, P. Van Cauwenberge, H.C. Williams, Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113 (2004) 832–836.
- [26] C. Svensson, M. Andersson, C.G.A. Persson, P. Venge, U. Alkner, U. Pipkorn,

- Albumin, bradykinins, and eosinophil cationic protein on the nasal mucosal surface in patients with hay fever during natural allergen exposure, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 85 (1990) 828–833.
- [27] M. Alcocer, L. Yman, Allergy, in: *The Immunoassay Handbook*, Elsevier, 2013: pp. 857–867.
- [28] WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page, (n.d.). <http://www.allergen.org/> (accessed October 9, 2021).
- [29] Allergome, (n.d.). <http://www.allergome.org/> (accessed October 9, 2021).
- [30] R. Valenta, F. Ferreira, M. Focke-Tejkl, B. Linhart, V. Niederberger, I. Swoboda, S. Vrtala, From allergen genes to allergy vaccines, *Annual Review of Immunology*. 28 (2010) 211–241.
- [31] O. Soyer, M. Akdis, Immunologic Responses to Sublingual Allergen Immunotherapy, in: *Allergens and Allergen Immunotherapy*, CRC Press, 2014: pp. 67–77.
- [32] M. Plebani, Clinical value and measurement of specific IgE, *Clinical Biochemistry*. 36 (2003) 453–469.
- [33] H.H. Bennich, K. Ishizaka, S.G. Johansson, D.S. Rowe, D.R. Stanworth, W.D. Terry, Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin., *Immunology*. 15 (1968) 323.
- [34] A. Abbas, A.H. Litchman, S. Pillai, *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, in: Elsevier, Elsevier Ltd, 2019: p. 336.
- [35] V. Seagroatt, S.G. Anderson, The second international reference preparation for human serum immunoglobulin E and the first British standard for human serum immunoglobulin E, *Journal of Biological Standardization*. 9 (1981) 431–437.
- [36] M. Kerkhof, A.E.J. Dubois, D.S. Postma, J.P. Schouten, J.G.R. De Monchy, Role and interpretation of total serum IgE measurements in the diagnosis of allergic airway disease in adults, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 58 (2003) 905–911.
- [37] N.K. Renault, L. Mirotti, M.J.C. Alcocer, Biotechnologies in new high-throughput food allergy tests: Why we need them, *Biotechnology Letters*. 29 (2007) 333–339.
- [38] G. Ertürk, Yüzey plazmon rezonans temelli immunoglobulin G sensörünün hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.
- [39] S. Morais, L.A. Tortajada-Genaro, Á. Maquieira, M.Á. Gonzalez Martinez, Biosensors for food allergy detection according to specific IgE levels in serum,

- TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 127 (2020) 115904.
- [40] J. Homola, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical Reviews*. 108 (2008) 462–493.
- [41] A. Otto, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift Für Physik*. 216 (1968) 398–410.
- [42] C. Nylander, B. Liedberg, T. Lind, Gas detection by means of surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators*. 3 (1982) 79–88.
- [43] R. Karlsson, SPR for molecular interaction analysis: A review of emerging application areas, in: *Journal of Molecular Recognition*, John Wiley & Sons, Ltd, 2004: pp. 151–161.
- [44] J. Homola, J. Dostálek, S. Chen, A. Rasooly, S. Jiang, S.S. Yee, Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk, *International Journal of Food Microbiology*. 75 (2002) 61–69.
- [45] B.K. Oh, Y.K. Kim, K.W. Park, W.H. Lee, J.W. Choi, Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*, in: *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, 2004: pp. 1497–1504.
- [46] C. Boozer, G. Kim, S. Cong, H.W. Guan, T. Londergan, Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies, *Current Opinion in Biotechnology*. 17 (2006) 400–405.
- [47] J. Homola, Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 377 (2003) 528–539.
- [48] F. Lopez, C. Pichereaux, O. Burllet-Schiltz, L. Pradayrol, B. Monsarrat, J.P. Estève, Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules, *Proteomics*. 3 (2003) 402–412.
- [49] M. Zalewska, A. Kochman, J.P. Estève, F. Lopez, K. Chaoui, C. Susini, A. Ozyhar, M. Kochman, Juvenile hormone binding protein traffic - Interaction with ATP synthase and lipid transfer proteins, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1788 (2009) 1695–1705.
- [50] A. Baba, P. Taranekar, R.R. Ponnampati, W. Knoll, R.C. Advincula, Electrochemical surface plasmon resonance and waveguide-enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers, *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2 (2010) 2347–2354.
- [51] S. Wang, X. Huang, X. Shan, K.J. Foley, N. Tao, Electrochemical surface plasmon

- resonance: Basic formalism and experimental validation, *Analytical Chemistry*. 82 (2010) 935–941.
- [52] J.M. McDonnell, Surface plasmon resonance: Towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition, *Current Opinion in Chemical Biology*. 5 (2001) 572–577.
- [53] A. McWhirter, L. Wahlström, Chapter 11. The Benefits and Scope of Surface Plasmon Resonance-based Biosensors in Food Analysis, in: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2010: pp. 333–353.
- [54] GE Healthcare, BR-1005-71 - Biacore Sensor Surface Handbook, 2008.
- [55] G. Steiner, Surface plasmon resonance imaging, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 379 (2004) 328–331.
- [56] D. Erickson, S. Mandal, A.H.J. Yang, B. Cordovez, Nanobiosensors: Optofluidic, electrical and mechanical approaches to biomolecular detection at the nanoscale, *Microfluidics and Nanofluidics*. 4 (2008) 33–52.
- [57] K.D. Kihm, Surface plasmon resonance reflectance imaging technique for near-field (~ 100 nm) fluidic characterization, *Experiments in Fluids*. 48 (2010) 547–564.
- [58] A. Olaru, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, H.Y. Aboul-Enein, Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 45 (2015) 97–105.
- [59] X. Wang, S. Zhan, Z. Huang, X. Hong, Review: Advances and applications of surface plasmon resonance biosensing instrumentation, *Instrumentation Science and Technology*. 41 (2013) 574–607.
- [60] S. Scarano, M. Mascini, A.P.F. Turner, M. Minunni, Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*. 25 (2010) 957–966.
- [61] S. Mariani, M. Minunni, Surface plasmon resonance applications in clinical analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406 (2014) 2303–2323.
- [62] S.A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and applications*, Springer US, 2007.
- [63] K.D. Kihm, S. Cheon, J.S. Park, H.J. Kim, J.S. Lee, I.T. Kim, H.J. Yi, Surface plasmon resonance (SPR) reflectance imaging: Far-field recognition of near-field phenomena, *Optics and Lasers in Engineering*. 50 (2012) 64–73.
- [64] B. Dastmalchi, P. Tassin, T. Koschny, C.M. Soukoulis, A New Perspective on Plasmonics: Confinement and Propagation Length of Surface Plasmons for

- Different Materials and Geometries, *Advanced Optical Materials*. 4 (2016) 177–184.
- [65] J.N. Anker, W.P. Hall, O. Lyandres, N.C. Shah, J. Zhao, R.P. Van Duyne, Biosensing with plasmonic nanosensors, in: *Nanoscience and Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*, World Scientific Publishing Co., 2009: pp. 308–319.
- [66] G. Spoto, M. Minunni, Surface plasmon resonance imaging: What next?, *Journal of Physical Chemistry Letters*. 3 (2012) 2682–2691.
- [67] M.J. Linman, A. Abbas, Q. Cheng, Interface design and multiplexed analysis with surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy and SPR imaging, *Analyst*. 135 (2010) 2759–2767.
- [68] A. V. Zayats, I.I. Smolyaninov, A.A. Maradudin, Nano-optics of surface plasmon polaritons, *Physics Reports*. 408 (2005) 131–314.
- [69] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications, *Sensors (Switzerland)*. 15 (2015) 10481–10510.
- [70] M. Piliarik, J. Homola, Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?, *Optics Express*. 17 (2009) 16505.
- [71] C.I.L. Justino, T.A. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 29 (2010) 1172–1183.
- [72] E. Helmerhorst, D.J. Chandler, M. Nussio, C.D. Mamotte, Real-time and label-free bio-sensing of molecular interactions by surface plasmon resonance: A laboratory medicine perspective, *Clinical Biochemist Reviews*. 33 (2012) 161–173.
- [73] E. González-Fernández, N. De-Los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, SPR evaluation of binding kinetics and affinity study of modified RNA aptamers towards small molecules, *Talanta*. 99 (2012) 767–773.
- [74] Y. Yanase, T. Hiragun, K. Ishii, T. Kawaguchi, T. Yanase, M. Kawai, K. Sakamoto, M. Hide, Surface plasmon resonance for cell-based clinical diagnosis, *Sensors (Switzerland)*. 14 (2014) 4948–4959.
- [75] P. Singh, *SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges*, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 229 (2016) 110–130.
- [76] P. Singh, *Surface plasmon resonance*, Academic Press, 2014.
- [77] S. Akgönüllü, Y. Saylan, N. Bereli, D. Türkmen, H. Yavuz, A. Denizli, Plasmonic

- Sensors for Detection of Chemical and Biological Warfare Agents, in: *Plasmonic Sensors and Their Applications*, Wiley, 2021: pp. 71–85.
- [78] S. Deng, P. Wang, X. Yu, Phase-sensitive surface plasmon resonance sensors: Recent progress and future prospects, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017) 2819.
- [79] S. Sjölander, C. Urbaniczky, Integrated Fluid Handling System for Biomolecular Interaction Analysis, *Analytical Chemistry*. 63 (1991) 2338–2345.
- [80] G. Limousin, J.P. Gaudet, L. Charlet, S. Szenknect, V. Barthès, M. Krimissa, Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement, *Applied Geochemistry*. 22 (2007) 249–275.
- [81] S.J. Allen, G. Mckay, J.F. Porter, Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems, *Journal of Colloid and Interface Science*. 280 (2004) 322–333.
- [82] K. Vasanth Kumar, S. Sivanesan, Sorption isotherm for safranin onto rice husk: Comparison of linear and non-linear methods, *Dyes and Pigments*. 72 (2007) 130–133.
- [83] M. Ghiaci, A. Abbaspur, R. Kia, F. Seyedeyn-Azad, Equilibrium isotherm studies for the sorption of benzene, toluene, and phenol onto organo-zeolites and as-synthesized MCM-41, *Separation and Purification Technology*. 40 (2004) 217–229.
- [84] M.C. Ncibi, Applicability of some statistical tools to predict optimum adsorption isotherm after linear and non-linear regression analysis, *Journal of Hazardous Materials*. 153 (2008) 207–212.
- [85] E. Bulut, M. Özacar, I.A. Şengil, Adsorption of malachite green onto bentonite: Equilibrium and kinetic studies and process design, *Microporous and Mesoporous Materials*. 115 (2008) 234–246.
- [86] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chemical Engineering Journal*. 156 (2010) 2–10.
- [87] P. Reuterswärd, J. Gantelius, H. Andersson Svahn, An 8 minute colorimetric paper-based reverse phase vertical flow serum microarray for screening of hyper IgE syndrome, *Analyst*. 140 (2015) 7327–7334.
- [88] M.R. Monroe, A.P. Reddington, A.D. Collins, C. Laboda, M. Cretich, M. Chiari, F.F. Little, M.S. Ünlü, Multiplexed method to calibrate and quantitate fluorescence signal for allergen-specific IgE, *Analytical Chemistry*. 83 (2011) 9485–9491.
- [89] G.W. Platt, F. Damin, M.J. Swann, I. Metton, G. Skorski, M. Cretich, M. Chiari,

- Allergen immobilisation and signal amplification by quantum dots for use in a biosensor assay of IgE in serum, *Biosensors and Bioelectronics*. 52 (2014) 82–88.
- [90] Z. Li, Z. Li, Q. Niu, H. Li, M. Vuki, D. Xu, Visual microarray detection for human IgE based on silver nanoparticles, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 239 (2017) 45–51.
- [91] L.W. Tai, K.Y. Tseng, S.T. Wang, C.C. Chiu, C.H. Kow, P. Chang, C. Chen, J.Y. Wang, J.R. Webster, An automated microfluidic-based immunoassay cartridge for allergen screening and other multiplexed assays, *Analytical Biochemistry*. 391 (2009) 98–105.
- [92] S. Kim, J. Lee, S.J. Lee, H.J. Lee, Ultra-sensitive detection of IgE using biofunctionalized nanoparticle-enhanced SPR, *Talanta*. 81 (2010) 1755–1759.
- [93] A.A. Joshi, M.W. Peczuh, C. V. Kumar, J.F. Rusling, Ultrasensitive carbohydrate-peptide SPR imaging microarray for diagnosing IgE mediated peanut allergy, *Analyst*. 139 (2014) 5728–5733.
- [94] Y. Wang, M. Cui, M. Jiao, X. Luo, Antifouling and ultrasensitive biosensing interface based on self-assembled peptide and aptamer on macroporous gold for electrochemical detection of immunoglobulin E in serum, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410 (2018) 5871–5878.
- [95] H. Li, C. Wang, Z. Wu, L. Lu, L. Qiu, H. Zhou, G. Shen, R. Yu, An electronic channel switching-based aptasensor for ultrasensitive protein detection, *Analytica Chimica Acta*. 758 (2013) 130–137.
- [96] A. Salimi, S. Khezrian, R. Hallaj, A. Vaziry, Highly sensitive electrochemical aptasensor for immunoglobulin e detection based on sandwich assay using enzyme-linked aptamer, *Analytical Biochemistry*. 466 (2014) 89–97.
- [97] S. Khezrian, A. Salimi, H. Teymourian, R. Hallaj, Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent attachment of aptamer onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified electrode, *Biosensors and Bioelectronics*. 43 (2013) 218–225.
- [98] J. Wang, A. Munir, Z. Li, H.S. Zhou, Aptamer-Au NPs conjugates-accumulated methylene blue for the sensitive electrochemical immunoassay of protein, *Talanta*. 81 (2010) 63–67.
- [99] C.Y. Lee, K.Y. Wu, H.L. Su, H.Y. Hung, Y.Z. Hsieh, Sensitive label-free electrochemical analysis of human IgE using an aptasensor with cDNA amplification, *Biosensors and Bioelectronics*. 39 (2013) 133–138.

- [100] W. Song, H. Li, H. Liu, Z. Wu, W. Qiang, D. Xu, Fabrication of streptavidin functionalized silver nanoparticle decorated graphene and its application in disposable electrochemical sensor for immunoglobulin e, *Electrochemistry Communications*. 31 (2013) 16–19.
- [101] B. Jiang, F. Li, C. Yang, J. Xie, Y. Xiang, R. Yuan, Aptamer pseudoknot-functionalized electronic sensor for reagentless and single-step detection of immunoglobulin e in human serum, *Analytical Chemistry*. 87 (2015) 3094–3098.
- [102] T. Hianik, M. Šnejdárková, L. Sokolíková, E. Meszár, R. Krivánek, V. Tvarožek, I. Novotný, J. Wang, Immunosensors based on supported lipid membranes, protein films and liposomes modified by antibodies, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 57 (1999) 201–212.