DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMUNGLOBULİN G TAYİNİNE YÖNELİK AFİNİTE TEMELLİ BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Yağmur DOĞAN

Temmuz, 2022

İZMİR

İMMUNGLOBULİN G TAYİNİNE YÖNELİK AFİNİTE TEMELLİ BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

Yağmur DOĞAN

Temmuz, 2022

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

YAĞMUR DOĞAN, tarafından **PROF.DR. MÜNİRE NALAN DEMİR** yönetiminde hazırlanan **"İMMUNGLOBULİN G TAYİNİNE YÖNELİK AFİNİTE TEMELLİ BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

…….

Prof. Dr. M. Nalan DEMİR

_____

Yönetici

…….……

Prof. Dr. Dilek Odacı Demirkol

_____

Jüri Üyesi

……..

Dr. Öğr. Üyesi Ali Araz

_____

Jüri Üyesi

_____

Prof. Dr. Okan FISTIKOĞLU

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, bana yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Münire Nalan DEMİR'e, deneysel çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana destek olan Dr. Hilmiye Deniz ERTUĞRUL UYGUN'a ve hayatım boyunca desteğini esirgemeyen,yanımda olduklarını hep hissettiren annem Sevilay DOĞAN, babam Halim DOĞAN, kardeşim Nevzat DOĞAN ve anneannem GÜLLÜ DURAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Yağmur DOĞAN

İMMUNGLOBULİN G TAYİNİNE YÖNELİK AFİNİTE TEMELLİ BİYOSENSOR GELİŞTİRİLMESİ

ÖZ

Bu tez çalışması kapsamında, İmmunoglobulin G tayini için, afinite temelli sensör geliştirilmiştir. Bunun için, monomer olarak pirol-3-karboksilik asit kullanılarak polihidroksi fulleren varlığında elektropolimerizasyon yöntemi ile immunoglobulin G baskılanmış altın elektrod hazırlanmıştır. Biyosensör sistemi tasarlanırken, elektrodun modifikasyon adımlarını izleyebilmek ve karakterize edebilmek için Siklik voltametri (CV) ve Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) yöntemleri kullanılmıştır. Geliştirilen sensör sisteminin performans parametreleri 25-1200 ng/mL (R^2= 0,9876) arasında kalibrasyon eğrisi ile belirlenmiş ve LOD ve LOQ sırasıyla 80 ng/mL ve 243 ng/mL olarak bulunmuştur. Optimize edilen sensör sisteminin uygulanabilirliği yapay serum örnekleri kullanılarak test edilmiştir.

Anahtar kelimler; İmmunoglobulin G, moleküler baskılanmış biyosensör, altın elektot, siklik voltametri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi

DEVELOPMENT OF AFFINITY BASED BIOSENSOR FOR IMMUNOGLOBULIN G DETERMINATION

ABSTRACT

In the scope of this thesis, a affinity-based sensor was developed for the determination of Immunoglobulin G. For this purpose, immunoglobulin G imprinted gold electrode was prepared by electropolymerization method in the presence of polyhydroxy fullerene using pyrrole-3-carboxylic acid as monomer. While designing the biosensor system, Cyclic voltammetry (CV) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) methods were used to monitor and characterize the modification steps of the electrode. The performance parameters of the developed sensor system were determined by the calibration curve between 25-1200 ng/mL (R2= 0.9876) and the LOD and LOQ were found to be 80 ng/mL and 243 ng/mL, respectively. The feasibility of the optimized sensor system was tested using artificial serum samples.

Keywords; Immunoglobulin G, molecularly imprinted biosensor, gold electrode, cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ii

TEŞEKKÜR iii

ÖZ iv

ABSTRACT v

ŞEKİLLER LİSTESİ xi

TABLOLAR LİSTESİ xii

BÖLÜM BİR- GİRİŞ……1

1.1 İmmünoglobulinlerin Yapısı…….....1

1.2 İmmünoglobulinlerin Sınıfları……..……..4

1.2.1 IgM……...5

1.2.2 IgD……5

1.2.3 IgA……6

1.2.4 IgE……...……6

1.2.5 IgG……6

1.3 İmmünoglobulnlerin Fonksiyonları…….……...……..….7

1.3.1 Enfektivitenin Nötralizasyonu…….…7

1.3.2 Aglütinasyon ve Agregasyon……...…7

1.3.3 Kompleman Aktivasyonu…….....…..8

1.3.4 Opsonizasyon (Fagositazo Duyarlı Hale Getirme)……...……...8

1.4 Antikor Tayin Yöntemleri…….……...…9

1.4.1 Radyal İmmün Diffüzyon (RID)……..…...….9

1.4.2 ELISA (Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi)…….....10

1.4.3 Radyoimmüassay (RIA) Yöntemi……..…..……...…10

1.4.4 İmmünoelektroforez…….……..……10

1.5 Antikorlar ve Bağışıklık……..……..…..…11
1.6 Biyosensörler…….……..…….…..…..12
1.6.1 Moleküler Baskılanmış Sensörler……...……...……...15
1.6.2 Moleküler Baskılanmış IgG Sensörleri Çalışma Örnekleri…….....….16
1.7 Tezin Amacı ve Önemi……..……..…….....…19

BÖLÜM İKİ- MATERYAL VE METOD……..20

2.1 Materyal…….……...…20
2.2 Kullanılan Cihazlar……..…….……20
2.3 Yöntem…….……...…..…20
2.3.1 IgG Tayini İçin Elektrot Yüzeyinin Hazırlanması……...……..21
2.3.2 Monomer/Kalıp Oranının Belirlenmesi……...…….…..22
2.3.3Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması ve Desorpsiyon Ajanı Seçimi…...…….……23
2.3.3.1 Desorpsiyon Süresinin Belirlenmesi…….….23
2.3.3.2 Desorpsiyon Ajanının Derişiminin Belirlenmesi…….…..……23
2.3.4 Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması…….…….……23
2.3.5 Elektrot Yüzeyinin Karakterizasyonu…….……....24
2.3.6 NIP Sensörünün Hazırlanması…….…..…..24
2.3.7 Sensör Cevap Süresinin Belirlenmesi…….….24
2.3.8 Sensörün Performans Parametrelerinin Ölçülmesi ve Uygulanabilirliğin İncelenemsi……..……....…24
2.3.8.1 Seçicilik…….……..….25
2.3.8.2 Depo Kararlılığın Test Edilmesi……..……25

BÖLÜM ÜÇ- BULGULAR VE TARTIŞMA…….26

3.1 IgG Tayini İçin Elektrot Yüzeyinin Hazırlanması……..……..26
3.2 Monomer/ Kalıp Optimizasyonu…….…..……27
3.3 Kalıp Molokülün Uzaklaştırılması İçin Desorpsiyon Ajanı Seçimi…...……..28
3.4 Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması…….……..……30

3.5 Elektrot Yüzeyinin Karakterizasyonu……..……..……31
3.5.1 SEM Görüntülerinin İncelenmesi…..…….……....31
3.5.2 EIS Verilerinin İncelenemsi……..……..……..……32
3.6 NIP (Non- İmprinted Polymer) Elektrodun Hazırlanması……..…..…….34
3.7 Sensör Cevap Zamanının Belirlenmesi……..…….……..……35
3.8 Seçicilik…….…….……..….35
3.9 Sensörün Performans Parametrelerinin Ölçülmesi……..……36
3.10 Depo Kararlılık Belirlenmesi…….……...…37

BÖLÜM DÖRT- SONUÇLAR VE TARTIŞMA …….……..38

KAYNAKLAR ……..……..……..40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 İmmünoglobulinlerin Yapısı……..…….…..…….2

Şekil 1.2 Antikor Molekülünün Fragmentlerine Ayılması……..……....3

Şekil 1.3 Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar…….……..4

Şekil 1.4 İmmüglobulin Kompleksleri…….…..…..…….....4

Şekil 1.5 Biyosensörler Genel Şema……..……..…....….12

Şekil 1.6 Fulleren Yapısı…….……...…….……..….15

Şekil 1.7 MIP Sensörlerin Çalışma Prensibi…….……..…….……...16

Şekil 2.1Sensör Hazırlığında Kullanılan Elektrot ve Kimyasallar…..…….……...22

Şekil 3.1 Elektropolimerizasyon CV……..……..……...……26

Şekil 3.2 Farklı Monomer/ Kalıp Oranlarında Sensörün Hazırlanması…..…..……...27

Şekil 3.3 Desorpsiyon Süresi EIS Verileri…….……..…..……..28

Şekil 3.4 Desorpsiyon Ajanı Derişimi EIS Verileri……..……..29

Şekil 3.5 Sensör Sisteminin EIS Verileri……..…….……30

Şekil 3.6 Elektrot Yüzeyinin Elektrokimyasal Devre Şeması…..…..…….…….30

Şekil 3.7 Kalibrasyon Grafiği……...……..31

Şekil 3.8 AuE ve AuE-PPy3COOH Ful-OH-IgG elektrotların SEM Görüntüleri…….……..…..……31

Şekil 3.9 İmmobilizasyon Adımları EIS…….....……...32

Şekil 3.10 Şekil 18. İmmobilizasyon Adımları CV…….…….……..32

Şekil 3.11 NIP Elektrot EIS…….……..……...…….……33

Şekil 3.12 NIP Elektrot IgG Ekleme EIS……...……..……..33

Şekil 3.13 Sensör Cevap Zamanı CI……..……...…….…….……..34

Şekil 3.14 Seçicilik CI Verileri….…….…….…...35

Şekil 3.15 Seçicilik için EIS Verileri…….……...…..……..35

Şekil 3.16 Depo Kararlılığın Belirlenmesi……..…….…….……37

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 İmmünoglobulinlerin Özellikleri…….8

Tablo 1.2 Biyosensörlerin Temel Bileşenleri ve Sınıflandırması..……..…13

Tablo 2.1 Elektrotlar için Kullanılan Monomer/ Kalıp Oranı…..……...…….…..22

Tablo 3.1 Sensörün Performans Parametrelerinin Ölçülmesi…….……...……...….36

KISALTMALAR

IgG	: İmmünoglobulin G
IgE	: İmmünoglobulin E
IgD	: İmmünoglobulin D
IgM	: İmmünoglobulin M
IgA	: İmmünoglobulin A
PAb	: Poliklonal Antikor
MAb	: Monoklonal Antikor
CV	: Siklik Voltametri
EIS	: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
RID	: Radyal İmmün Diffüzyon
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi
RIA	: Radyoimmünoassay
Kd	: Disosiasyon Sabiti
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP	: Baskılanmamış Polimer
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Limiti
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
GQD	: Grafen Kuantum Noktaları
MOF	: Metal Organik Çerçeve
SAW	: Yüzey Akustik Dalga

BSA	: Sığır Serum Albumin
XPS	: X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi
PPy3COOH	: Pirol-3- Karboksilik asit
CI	: Kronoimpedans

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

İmmünglobulinler, immünojenlere yanıt olarak plazma B hücrelerinden üretilen ve antikor olarak görev yapan glikoprotein yapılı moleküllerdir. Toplam plazma proteininin yaklaşık %20-25'ini oluştururlar.

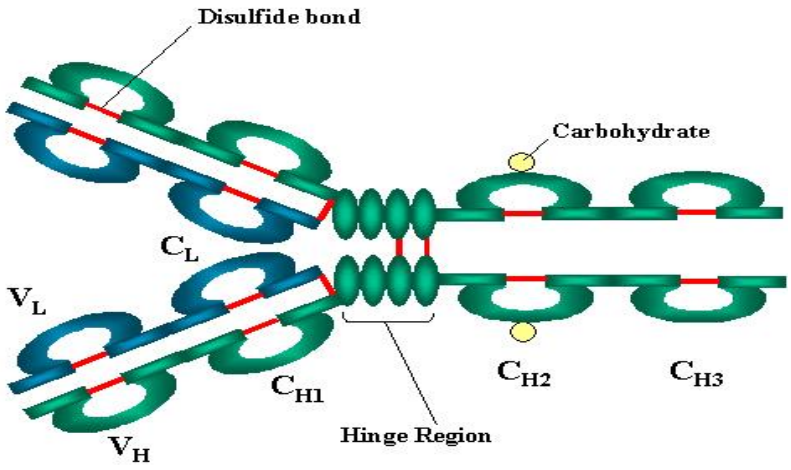
Antikorlar, insan vücut sıvılarında bulunan önemli biyolojik belirteçlerdir. Sadece plazmada değil, idrar, omurilik sıvısı, süt, tükürük, gözyaşı, lenf düğümleri ve dalak gibi diğer vücut sıvıları veya dokularında bulunabilirler (Mestecky, 1972). Antikorlar vücuda giren patojeni etkisiz hale getirirler. Temel görevleri, vücuda giren patojene (antijene) bağlanmak ve bağlanma gerçekleştikten sonra antijenin biyolojik yapısını bozup antijeni yok etmektir (Lipman, Jackson, Trudel, Weis-Garcia, 2005). Hümoral bağışıklık tepkisine katılırlar ve bağışıklık sisteminin patojene tepkisi sırasında seviyeleri artar. Yanıt olarak üretildikleri antijene ve bazen az sayıda yakın ilişkili antijene spesifik olarak bağlanırlar. Bağlandıkları yabancı molekülleri vücudun bağışıklık hücreleri için işaretleyerek etkisiz hale getirmiş olurlar (Liu vd., 2018).

1.1 Immünoglobulinlerin Yapısı

İmmünoglobülinler, glikoprotein yapısında olup %82 ile %92'si polipeptid ve %4-18'i ise karbonhidratlardan meydana gelmiştir. Karbonhidratlar basit veya kompleks yan zincirler halinde, daha çok oligosakkarit şeklindedir. Oligosakkaritler N-asetil glukozamin uçları ile polipeptid zincirindeki bir asparajine N-glikozidik bağı ile bağlanır. Oligosakkarit dallar galaktoz ile sonlanır ve N-asetil nörominik asit bu galaktoza tutunur.

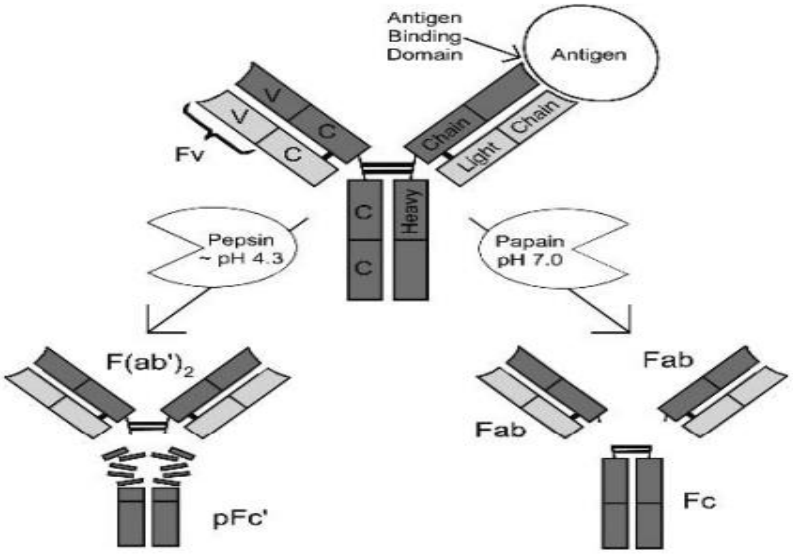
Tek bir antikor molekülü, iki özdeş hafif zincirden (yaklaşık 25.000 sahip polipeptitlerden) ve iki özdeş ağır zincirden (yaklaşık 50.000 MW) oluşur. Hafif zincir bir ağır zincire bir disülfid bağı ve hidrojen bağları, tuz bağları ve hidrofobik bağlar gibi kovalent olmayan etkileşimlerle bir heterodimer oluşturmak üzere bağlanır. Benzer şekilde kovalent olmayan etkileşimler ve disülfid köprüleri, temel dört zincirli

antikor yapısını oluşturmak için iki özdeş ağır ve hafif zincir kombinasyonunu ybirbirine bağlar (Şekil 1.1) (Megha ve Mohanan, 2020).



Şekil 1.1 İmmunoglobulinlerin Yapısı (Mayer, 2016)

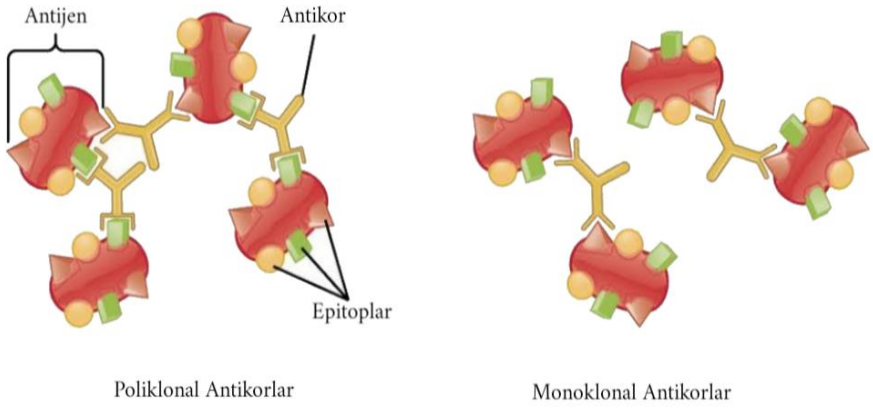
Bir antikor molekülü temelde "Y" şeklinde bir yapıdan oluşur. Zincirlerin her biri, disülfid bağları ile bağlanan çoklu sabit (C) ve bir değişken (V) bölge içerir. Antijen bağlayıcı alanlar, kolların ucunda bulunur; efektör alanları ise kuyruk bölgesinde bulunur. Çoğu antikor için bu alanlar, proteolitik sindirim ile birbirinden ayrılabilir. Fizyolojik pH altında, papain enzimi, tüm izotipleri, onları bir arada tutan disülfid bağlarının üzerindeki ağır zinciri parçalayarak Fab (antijen bağlanan alan) ve Fc (efektör alan) fragmanlarına ayırabilir. Pepsin ise bu bağların altındaki molekülü keserek $F(ab')_2$'ye ve en büyüğü pFc olarak adlandırılan Fc bölgesinin çeşitli fragmanlarına parçalayabilir (Şekil 1.2). Fab kısmı antijenle bağlanmayı sağlayan bölgeleri içerirken, Fc kısmı ise molekülün hücrelere veya komplemente bağlanmasını sağlar.



Şekil 1.2 Antikor molekülünün fragmentlerine ayrılması. (Lipman vd., 2005)

Hafif zincir üzerinde bir adet değişken (V) ve bir adet sabit (C) bölge bulunurken, ağır zincir üzerinde bir adet V bölgesi, 3-4 adet C bölgesi bulunur. V bölgeleri üzerinde üç adet aşırı değişken bölge (CDR) bulunmaktadır. Bunlar içerisinde CDR3, V ve C bölgelerinin birleştiği yere en yakın olacak şekilde konumlanmıştır ve tanıdığı antijenik çeşitlilik en fazladır.

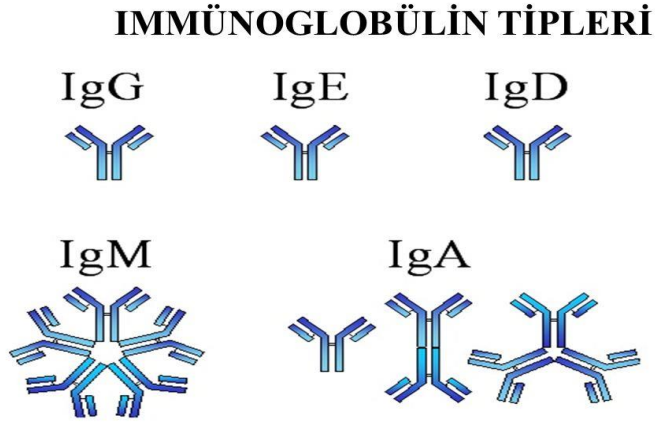
Çoğu antijenin yapısı çok karmaşık olduğundan, çok sayıda lenfosit tarafından tanınan çok sayıda epitopları vardır. Her lenfosit, plazma hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için aktive edilir ve elde edilen antikor tepkisi poliklonaldır. Poliklonal antikorlar (PAb), genellikle vücuttaki farklı B hücresi klonları tarafından üretilen heterojen antikor karışımıdır. Tek bir antijenin birçok farklı epitopunu tanıyabilir ve bunlara bağlanabilirler. Tek bir ana hücreden klonlaşmış özdeş B hücreleri tarafından üretilen antikorlar ise monoklonal antikorlardır (MAb). MAbler tek değerlikli afiniteye sahiptir ve sadece bir antijenin aynı epitopunu tanırlar (Şekil 1.3) (Lipman vd., 2005).



Şekil 1.3 Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar

1.2 İmmunoglobulin Sınıfları

İmmünglobulinler ağır zincirlerin sabit bölgelerindeki aminoasit sekanslarına göre beş farklı sınıfa ayrılır (Şekil 1.4). Bir sınıftaki tüm immünglobulinlerin ağır zincirlerinin sabit bölgeleri birbirine benzerdir.



Şekil 1.4 İmmunoglobulin Kompleksleri

1.2.1 IgM

B hücresi gelişimi sırasında eksprese edilen ilk immünoglobulindir ve birincil bağışıklık tepkisinden sorumludur. Genellikle bir immünojene veya patojene akut maruziyeti teşhis etmek için kullanılır. IgM antikorları diğer izotiplerden daha polireaktif oldukları için IgM taşıyan B hücreleri antijenlere daha hızlı yanıt verirler (Schroeder ve Cavacini, 2010).

IgM, immün yanıtta plazma hücreleri tarafından üretilir ve 10 antijen bağlama bölgesi ve birleşme (J) zinciri içeren çözünür pentamerler veya 12 antijen bağlama bölgesi içeren ve birleşme zinciri (J-zinciri) içermeyen heksamerler olarak salgılanır. IgM, sırasıyla pentamer veya heksamer için yaklaşık 900 veya 1050 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir.

IgM antikorlarının antijen bağlama afiniteleri IgG'den daha düşük olmasına rağmen, polivalanları, komplemente bağımlı hücre lizizini indüklemek için yüksek aviditeli bağlanmaya ve komplemanın etkin bir şekilde bağlanmasına izin verir. IgM antikorlarının yüksek aviditesi, onları düşük seviyelerde bulunan antijenleri ve mikrobiyal yüzeyler üzerinde bulunan karbonhidratlar veya lipidler gibi protein olmayan antijenleri bağlamada özellikle etkili kılar. Pentamerik IgM antikorları ayrıca pentamerik yapıyı stabilize eden ve birkaç reseptöre bağlanmayı sağlayan bir birleştirme (J) zinciri içerir (Keyt, Baliga, Siclair, Carroll, Peterson, 2020).

1.2.2 IgD

IgD’ler serumda çok düşük seviyelerde bulunur ve proteolitik enzimlerle kolayca parçalandıkları için serum yarı ömrü oldukça kısadır. IgD’nin antikor aktivitesi kanıtlanamamıştır çünkü ana antikor efektör mekanizmalarına katıldığı bilinmemektedir. IgD’nin B lenfositlerinin yüzeyinde bulunarak B lenfositlerinin farklılaşmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir (Schroeder ve Cavacini, 2010).

1.2.3 IgA

IgA, doğumdan sonra 2. ayda sentezlenmeye başlar ve ergenlik çağına kadar yavaş yavaş yükselerek en yüksek seviyeye ulaşır. IgA, mukozal yüzeyleri toksinlerden korumada görev alır. Virüs ve bakterileri doğrudan nötralize eder ve mukozal yüzeylere bağlanmalarını önlerler. Serum IgA seviyeleri IgG seviyelerinden oldukça düşüktür ancak mukozal yüzeyler, tükürük ve anne sütünde tam tersi bir durum gözlemlenmektedir. Çeşitli patojenik mikroorganizma türlerinin mukozal yüzeylere tutunması, IgA üzerindeki glikanların, yüzeylerindeki şekere bağımlı reseptörler veya fimbrialarla etkileşimi ile önlenebilir. Bunun yanında IgA, bağışıklık korumasını arttırmak için mukozal salgılardaki diğer doğuştan gelen savunma faktörleri ile etkileşime girebilir. Bunlara müsinler, laktoferrin ve laktoperoksidaz sistemi dahildir. Ayrıca besinler yoluyla bağırsağa ulaşan, zararlı makromoleküllerle birleşerek emilimlerini önler ve yok edilmelerini kolaylaştırır. IgA, çeşitli mikroorganizmalar oluşturduğu toksik ve litik enzimleri de etkisiz hale getirir (de Sousa-Pereira ve Woof, 2019).

1.2.4 IgE

Serumda en düşük konsantrasyonda bulunan ve en kısa yarı ömre sahip olan immünoglobulindir. Aşırı duyarlılık, alerjik reaksiyonlar ve parazitik solucan enfeksiyonlarına verilen yanıttan sorumludurlar. Alerjik reaksiyonlara aracılık etme rolleri ve Fc reseptörleri FcεRI ve FcεRII/CD23'e bağlanarak aktive olan güçlü efektör fonksiyonları ile bilinirler (Sutton, Davies, Bax, Karagiannis, 2019).

1.2.5 IgG

Serumda en fazla bulunan ve 23 gün ile yarı ömrü en uzun olan immunoglobulindir. İmmunoglobulinlere ait tüm fonksiyonları yerine getirebilirler. Antijene karşı oluşan birincil yanıtta, geç dönemde oluşurlar. Ancak sekonder bağışıklık yanıtında en çok oluşan antikorlardır. Kan, lenf, periton sıvısı, beyin omurilik sıvısında en fazla bulunan immunoglobulinlerdir ve plasentadan geçebilen tek immunoglobulindir. Hamileliğin

üçüncü ayında IgG'ler plasenta yoluyla anneden bebeğe geçmeye başlar ve bu geçiş doğuma kadar devam eder. Anneden bebeğe geçen IgG'ler doğumdan sonra enfeksiyonlara karşı bebeği korur.

%82-96 protein ve %4-18 karbonhidrattan oluşan IgG molekülleri, ağır zincir bölgesinde farklılık gösterebilir ve bu durum farklı IgG fonksiyonları orataya çıkarır. IgG molekülleri azalan bolluğuna göre IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 adlandırılan dört alt sınıfa ayrılır. IgG'nin alt sınıfları, insan IgG miyelom proteinlerine karşı spesifik tavşan antiserumlarının kullanıldığı kapsamlı çalışmaların ardından 1960'larda keşfedilmiştir. IgG alt sınıflarının amino asit düzeyleri %90'dan fazla özdeş olmalarına rağmen, her alt sınıf, antijen bağlanması, immün kompleks oluşumu, kompleman aktivasyonu, efektör tetiklenmesi, hüre yarı ömrü ve plasental geçiş açısından farlılık gösterir. (Schroeder, Cavacini,2010).

1.3 İmmümoglobulinlerin Fonksiyonları

1.3.1 Enfektivitenin Nötralizasyonu

Antikorlar, virüslerin, bakterilerin, parazitlerin ve mantarların enfektivitesini veya patogenezini bloke edebilir. Nötralizasyon genellikle bir organizmanın konak dokulara bağlanmasına müdahale edilmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Greenspan ve Cavacini, 2019)

1.3.2 Aglütinasyon ve Agregasyon

Bazı antikorların, organizmalara bağlanarak ve onların kümelenmelerine neden olarak enfektiviteyi engellediği gösterilmiştir.

Örneğin IgA agregasyon veya aglütinasyon ile, bakterilerin mukusta daha verimli bir şekilde tutulmasına ve ardından peristalsis tarafından temizlenmesine olanak sağlar.

IgG antikorları ise çocuk felci virüslerinin agregasyonunu sağlar ve bu durum virüs ve konakçı hücreler arasındaki karşılaşma sayısını azaltarak daha az enfektiviteye yol açar (Greenspan ve Cavacini, 2019)

1.3.3 Kompleman Aktivasyonu

Kompleman kaskadının antikor tarafından aktivasyonu, organizmaların veya enfekte olmuş hücrelerin lizizine neden olur. Ayrıca kompleman aktivasyonu, lökositleri enfeksiyon bölgelerine toplayıp aktive ederek patojenler üzerinde dolaylı bir etkiye de sahiptir. IgG ve alt sınıfları, kompleman aktivasyonunun ana belirleyicileridir (Greenspan ve Cavacini, 2019)

1.3.4 Opsonizasyon (Fagositoza Duyarlı Hale Getirme)

Spesifik olmayan otolog antikorlar, parazitlenmiş eritrositleri opsonize edebilir, komplemanı aktive edebilir ve enfekte olmuş hücreleri fagositoz yoluyla temizleyebilir. (Greenspan ve Cavacini, 2019)

Tablo 1.1 İmmunoglobulinlerin Özellikleri

	Serum (%)	Yapı	Kompleman Fiksasyonu	Opsonizasyon	Plasentadan Geçiş
IgG	75	Monomer	Var	Var	Var
IgG1	67 (Toplam IgG2de)	Monomer	Var	Var	Var
IgG2	22 (Toplam IgG'de)	Monomer	Var	Var	Var
IgG3	7 (Toplam IgG'de)	Monomer	Var	Var	Var
IgG4	4 (Toplam IgG'de)	Monomer	Yok	Yok	Var
IgM	10	Pentamer	Var	Var	Yok
IgA	15	Monomer, Dimer	Yok	Yok	Yok
IgD	0,5	Monomer	Yok	Yok	Yok
IgE	0,01	Monomer	Yok	Yok	Yok

Antikorlar, bifonksiyonel moleküllerdir. Antijene bağlanma özelliği gösterirken bir yandan da efektör fonksiyonu gösterirler ve mast hücrelerinden histamin salınımını sağlarlar. İmmünoglobulinin efektör fonksiyonu, hedef dokuya veya immün sistem hücrelerine bağlanma ve kompleman aktivasyonunu içerir. Aynı zamanda fagositozu kolaylaştıran ve transplasental olarak geçen immünoglobulin çeşitleri vardır.

1.4 Antikor Tayin Yöntemleri

Antijen-antikor arasında reaksiyonun gerçekleştiğini bilmemizi sağlayan tek yol direkt veya indirekt olarak anitjen ve antikor kompleksini tespit etmektir.

İmmunoglobulinlerin tayin yöntemleri iki gruba ayrılabilir;

1. Antijen-antikor kompleksinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak ölçüm yapan metodlar (Türbidimetri, Jel Presipitasyonu, Nefelometri vb.).
2. Antijen- antikor kompleksinde bir işaretleyici ajan yardımı ile ölçüm yapan metodlar (Radyoimmünoassay, Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi vb.) (Mayer, 2016)

IgG'nin kantitatif tayini için kullanılan yöntemler ise aşağıdaki gibidir:

1.4.1 Radyal İmmün Diffüzyon (RID) Yöntemi

Radyal immünodifüzyonda, antikor agar jel hazırlanırken eklenir ve antijenin farklı dilüsyonları agar kuyucuklarına yerleştirilir. Antijen jelin içine difüze oldukça antikor ile antijen eaksiyona girer ve eşdeğer noktasında halka şeklinde presipitasyon oluşur. Halkanın çapı, antijen konsantrasyonu ile orantılıdır. Böylece, standart bir antijenin farklı konsantrasyonu çalışılarak standart bir eğri oluşturul ve bilinmeyen örnekteki antijen miktarı tespit edilir. Eğer testte birden fazla halka ortaya çıkarsa, birden fazla antijen/antikor kompleksi oluştuğu anlamına gelir. RID yöntemi, hasta örneklerinde immünglobülin seviyelerini tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. (Mayer, 2016)

1.4.2 ELISA (Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi

ELISA, antikorlara alkalen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesiyle antijen-antikor bağlanmasının gösterildiği immünokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarını ölçebiliriz. ELISA yönteminin, doğrudan, dolaylı ve sandviç ELISA şeklinde farklı türleri bulunmaktadır. (Pang vd., 2022)

1.4.3 Radyommünoassay (RIA) Yöntemi

Radyoimmunoassay yöntemiyle, radyoizotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile özgül olduğu antikor veya antijenin varlığını ve miktarını tespit edilebilir. En fazla kullanılan madde radyoaktif iyottur (125I veya 131I). (Sharma, Pillai, Gautam, Hajare, 2014).

1.4.4 İmmünoelektroforez

İmmünoelektroforezde, agara kuyucuklarına antijenlerin kompleks bir karışımı yerleştirilir ve antijenler eletroforeze tabi tutulur, bu şekilde antijenler yüklerine göre ayrılırlar. Elekroforez işekemi sonrası, kuyucuklar kesilir ve antikor eklenir. Antikorlar jel içine doğru difüze olurken, antijen-antikor reaksiyonu gerçekleştiğinde eşdeğer bölgede presipitasyon çizgileri oluşur. Bu yöntem kullanılarak çizginin kalınlığı ile kabaca miktar tayini yapılabilmektedir. Ayrıca hasta serumunun bileşenlerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Mayer, 2016)

1.5 Antikorlar ve Bağışıklık

Bir patojene karşı bağışıklık gelişmesi, birkaç hafta süren çok aşamalı bir süreçtir. Vücut, viral bir enfeksiyona önce, makrofajların, nötrofillerin ve dendrtik hücrelerin virüsün ilerlemesini yavaşlattığı ve semptomları önleyebildiği, doğuştan gelen bir yanıtla tepki verir.

Bu yanıtı sonradan kazanılan, B hücrelerinin virüse özgü antikor ürettiği bağışıklık yanıtı takip eder. B hücreleri kanda ve lenf sisteminde antikor üretmeden dolaşırlar. Bir antijenle karşılaştıkları zaman iki farklı B hücresi tipinden birine farklılaşırlar. Bu hücre tipleri;

- Plazma B hücresi, antijene bağlanması için antikor üretir, böylece antijenler fagositler için hedef haline gelir.
- Bellek B hücresi, daha önce karşılaşılan antijene özgü oluşur ve bir süre canlı kalırlar.

Bu spesifik antikorlar patojenlere bağlanabilir ve hücreleri enfekte etmelerini engelleyebilirler. Sonradan kazanılan bağışıklık, vücudu patojenden temizleyebilir ve eğer yanıt yeterince güçlü ise hastalığın ilerlemesini ve aynı virüsün daha sonra vücudu tekrar enfekte etmesini önleyebilir. Bu durum genellikle kanda antikorların varlığı kontrol edilerek ölçülür. Yani bağışıklık tepkisi yeterince güçlü ise IgG'ler kanda tespit edilebilir hale gelir.

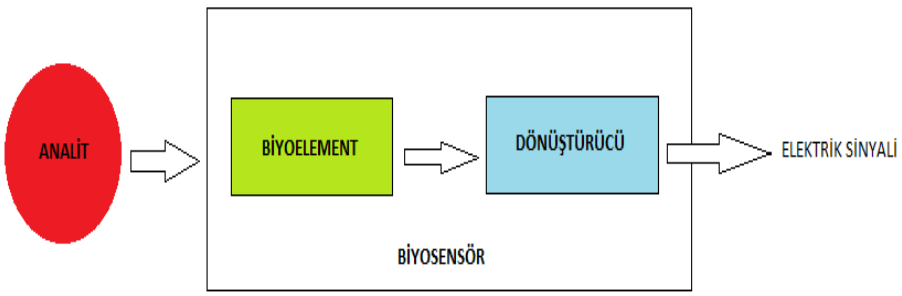
Bir Ig molekülünün sadece bir Fab bölgesinin antijenin bir epitopuna bağlanmasının kuvveti "afinite" olarak isimlendirilir. Afinite sıklıkla disosiasyon (ayrışma) sabiti (Kd) şeklinde ifade edilir. Kd, bir çözeltideki kullanılabilir antikor moleküllerinin yarısını doldurmak için gerekli olan antijenin molar konsantrasyonudur. Kd değeri ne kadar düşükse, antikorun antijene afinitesi (ilgisi) o kadar yüksek demektir. Etkenle vücudun ilk karşılaşmasında ortaya çıkan primer immün yanıtta salgılanan antikorların Kd değeri 10^{-6} -10^{-9} M arasındayken, etkenle tekrarlayan karşılaşmalarda ortaya çıkan sekonder immün yanıtta salgılanan antikorların afinitesi yükselir: 10^{-8} -10^{-11}M. Antikorun antijen bağlama gücünde ortaya çıkan bu artışa "afinite olgunlaşması" denir (Abbas ve Lichtman, 2019).

Kullanılan bu yöntemlerde örnek hazırlama ve saflaştırma ihtiyacı, yüksek maliyetli cihazlar ve bunların bakımları, nitelikli personel gereksinimi ve düşük hassasiyet gibi dezavantajlardan dolayı yeni teşhis araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Biyosensörler, basit enstrümantasyon, hızlı sonuç verme, yüksek hassasiyet ve seçicilik gibi birçok özelliklerinden dolayı son yıllarda IgG tayininde ilgi çekmektedir.

1.6 Biyosensörler

IUPAC'ın tanımına göre, biyosensörler, izole enzimler, dokular, organeller veya hücrelerin aracılık ettiği spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanan ve genellikle elektriksel, termal veya optik sinyallerle kimyasal bileşikleri saptamak için kullanılan cihazlardır.

Biyosensörler temel olarak bir biyoelement ve bir dönüştürücü olmak üzere iki bölümden oluşurlar (Sekil 1.5). Biyoelement kısmın görevi analiz edilecek maddeyle etkileşerek onu tanımaktır. Dönüştürücü kısmın görevi ise biyoelementin gerçekleştirdiği tanıma olayını okunabilir bir sayısal değere çevirmektir.



Şekil 1.5 Biyosensörler Genel Şema

Sensör sistemleri, kullanılan sinyal dönüştücünün çalışma prensibine göre veya analiz edilecek maddeye göre sınıflandırılabilir (Tablo 3).
Biyomedikal uygulamalarda kullanılan en yaygın tanıma elemanları antikor/antijen, enzim, nükleik asit/DNA, hücresel ve biyomimetik (sentetik biyoreseptör) etkileşimlere dayanır. Doğal bir reseptörü olmayan analitler bile, rekombinant antikorlar veya faj antikorları kullanılarak uygun tanıma elemanları üretilmesiyle tayin edilebilir.

Pek çok farklı dönüştürücüyle çalışılmış olunmasına rağmen, en yaygın olanları elektrokimyasal, optik ve piezoelektriktir. Ancak biyosensörlerle ilgili rapor edilen literatürün yarısından fazlasında, duyarlılıkları, basitlikleri ve düşük maliyetleri sebebiyle elektrokimyasal dönüştürücüler kullanıldığı görülmektedir (Kryscio ve Peppas, 2012).

Tablo 1.2 Biyosensörlerin Temel Bileşenleri ve Sınıflandırması

Biyolojik Sistemler		Dönüştürücüler		Veri Değerlendirmesi
Biyolojik	Biyomimetik	Elektrokimyasal	Fiziksel	
Enzimler Antikorlar Reseptörler Nükleik Asitler	Aptamerler Peptidler Ribozimler	Amperometrik Potansiyometrik Kondüktometrik Kapasitif ISFET	İnterferometre Refraktometre Florometre Termistörler Viskozimetre	Kaydedici sistem (Bilgisayar) Eşik Değer Konsantrasyonu Biyolojik Etkiler

Biyosensörlerin tarihi 50'li yıllarda L.C. Clark'ın Cincinatti Hastanesi'nde ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrod ile izlemesiyle başlamıştır. 1962 yılında Clark ve Lyons Glukoz Oksidaz enzimini, O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmüşler ve böylece ilk biyosensör sistemi ortaya çıkmıştır (Zhang et. al., 2021).

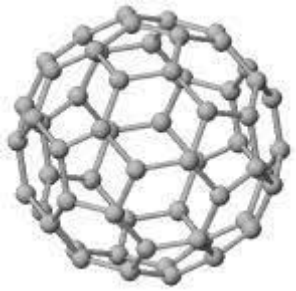
Ortaya çıkan bu yeni yöntem hem yüksek spesifikliğe sahip biyolojik sistemi (enzim) hem de yüksek duyarlılığa sahip fiziksel sistemi (elektrod) birleştirdiği için

oldukça dikkat çekmiştir. Son yıllarda biyosensörler tarım, gıda güvenliği, ulusal güvenlik, çevre koruma, kimyasal üretim ve biyomedikal teşhis gibi pek çok farklı alanda kullanılmak üzere çalışılmaktadır.

Mevcut birçok çalışma, klasik model analit olarak kullanılabilecek IgG'ye özgü elektrokimyasal sensörlerin hazırlanmasında çok sayıda farklı stratejiyi uygulamıştır. Genel olarak, nanomalzemelere dayalı elektrokimyasal sensörler, dönüştürücünün elektrokimyasını güçlendirerek sensör hassasiyetlerini artırabilir. Nanomalzemeler, kullanılan dönüştürücünün duyarlılığını, iletkenliğini ve seçiciliğini artırmak için kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış nanomalzemelere olan ilgi, geniş yüzey alanı, fiziksel ve kimyasal stabilite ve düşük maliyet gibi avantajları ile her geçen gün artmaktadır. Nanomalzemeler, kullanım amaçlarına bağlı olarak nanokapsüller, nanoçubuklar, nanoküreler, nanokabuklar ve nanolifler gibi farklı şekilde sentezlenebilir. (Irshad vd., 2013).

Altın nanoparçacıklar, manyetik nanoparçacıklar, kuantum noktaları ve karbon nanomalzemeler kimyasal ve fiziksel kararlılıkları, mekanik ve elektriksel özellikleri nedeniyle oldukça ilgi çekici materyallerdir. Karbon nanomalzemelerin yüzey alanını ve iletkenliği artırmadaki etkinlikleri nedeniyle son yıllarda sensör teknolojisinde kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. (Uygun ve Uygun, 2020)

Fullerenler, küresel ve 0-D yapıya sahip, beşgen ve altıgen yapılardan oluşan karbon türevi nanomalzemelerdir. Küresel yapıları nedeniyle geniş bir yüzey alanına sahiptirler. Geniş yüzey alanı sistemin hassasiyetini arttırdığı için son yıllarda sensör sistemlerinde fulleren kullanımı artmıştır. Ayrıca mükemmel elektriksel iletkenlikleri, yük taşıma ve ayırma özellikleri ve fotofiziksel özellikleri nedeniyle sensör alanında avantaj sağlamaktadır. Fullerenler arasında C60 en yaygın kullanılanıdır. Yapısında 60 π elektrona sahip olan C60, elektron çeken kısımlar tarafından nükleofilik saldırıya eğilimlidir. Fullerene C-60' daki 30 çift bağ, 30 bağ oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu bağlar, fulleren türevleri oluşturmak için birçok farklı şekilde modifiye edilebilir. (Shetti, Mishra, Basu ve Aminabhavi, 2021).



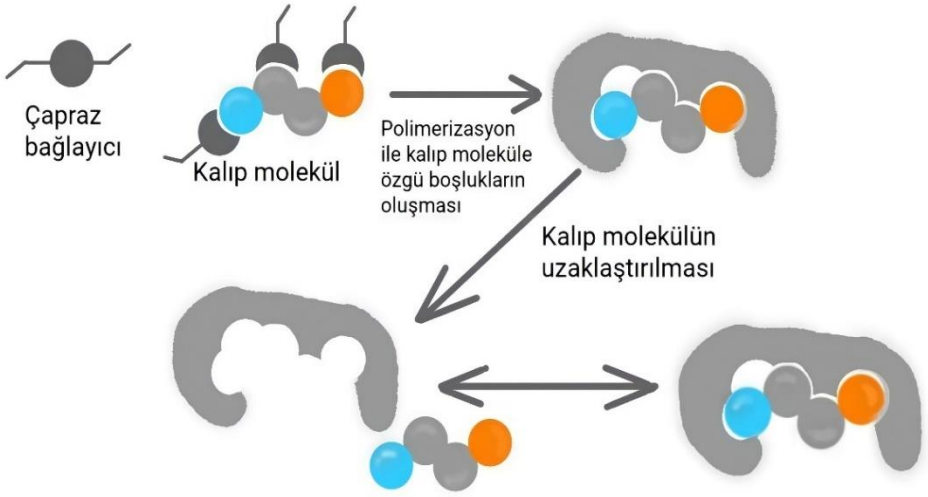
Şekil 1.6 Fulleren yapısı

Son yıllarda sensor sistemlerinde kararsız ve pahalı biyolojik reseptörlerin, sentetik bir analogla değiştirilmesine artan bir ilgi vardır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), moleküller arasında bağlanma ve ayrım yapma konusunda antikor benzeri yeteneğe sahip malzemeleri temsil eder. MIP'lerin biyosensörlerdeki biyolojik reseptörlere umut verici bir alternatif olduğu gösterilmiştir (Ayankojo, Boroznjak, Opik, Syritski, 2022)

1.6.1 Moleküler Baskılanmış Sensörler

Moleküler baskılanmış malzemelere "antikor taklitleri" de denmektedir; çünkü bu sistemler doğal molekülün etkileşimlerini taklit etmeye çalışırlar ve mevcut standardına yaklaşan afinite ve seçicilik gösterirler.

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi genellikle, bir veya daha fazla fonksiyonel monomerin, bir çapraz bağlayıcı ve hedef molekül varlığında (şablon veya kalıp da denir) kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla polimerizasyonuna dayanır. Monomerler hedef molekül ile bir kompleks oluşturur ve poimerizasyon ile bu moleküllerin fonksiyonel grupları Hedef molekülün ortamdan uzaklaştırılmasıyla, yapı içinde hedef moleküle özgü, tekrar bağlanabilmeyi sağlayacak seçici boşluklar oluşur (Sekil 1.7) (Beluomini et al.,2019).



Şekil 1.7 MIP sensörlerin çalışma prensibi

1.6.2 Moleküler Baskılanmış IgG Sensörleri Çalışma Örnekleri

Liang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan IgG'sinin tayini için akrilamid baskılama sistemi ile elektrokimyasal sensör için tanıma elemanı olarak görev yapan moleküler baskılanmış polimeri hazırlamak için IgG'yi hedef alan CuFe2O4 nanopartiküller kullanmıştır. Ayrıca sinyal amplifikasyonu için iyonik sıvı (IL) nanokompozit ile molibden disülfür (MoS2) @ nitrojen katkılı grafen kuantum noktaları (N-GQD'ler) kullanılmıştır. Optimize edilmiş deneysel koşullar altında, sensör yanıt süresi 8 dakikanın altına düşürülmüş ve tayin limiti 0,02 $ng \cdot mL^{-1}$ (S/ N = 3) bulunmuştur. Bulgular sonucunda, sensörün yüksek algılanabilirlik ve uzun süreli kararlılık sergilediğini bildirilmiştir (Liang, Hou, Tang, Sun, Luo, 2021).

Bir başka çalışmada Liang ve arkadaşları, çalışma elektrodu üzerinde bakır metal-organik çerçevelerin (Cu-MOF'ler) dört çeşit katman yapısını elektrodepozisyon yoluyla üretmiş ve IgG tayini için bir elektrokimyasal sensör uygulamasında kullanmışlardır. İlk olarak, farklı biriktirme potansiyelleri kullanılarak çeşitli morfoloji ve özelliklere sahip MOF'ler (Cu_MOF) sentezlenmiştir. Daha sonra, camsı karbon elektrotların yüzeyinde pirol baskılı filmlerin elektropolimerizasyonunda şablon olarak IgG kullanılmış ve çalışma elektrodu üzerine uygulanmıştır. Son olarak,

IgG'ye özgü baskılanmış bir film oluşturmak için kalıp molekül çıkarılmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında, IgG sensörü, 3 pg mL-1 (S/N = 3) algılama limiti (LOD) ile 0,01–10 ng mL-1 gibi geniş bir algılama aralığı sergilemiştir. Ayrıca, seçicilik, tekrarlanabilirlik (RSD %3,6) ve geri kazanım oranı (%95,2–102.0) dahil olmak üzere diğer parametrelerin tümünün sensörün potansiyel klinik uygulamalar için uygun olduğunu gösterdiği bildirilmiştir. (Liang vd., 2022).

Tretjakov ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, etiketsiz protein tayini için Yüzey Akustik Dalga (SAW) algılama platformu ile entegre moleküler baskılanmış polimer (MIP) bazlı sentetik reseptörler geliştirmiştir. İmmünoglobulin G'nin (IgG-MIP) yüzey izlerine sahip ultra ince polimerik filmler, bir elektrosentez yaklaşımı kullanılarak çoğaltılmış SAW çipleri üzerinde üretilmiştir. Filmler, SAW sistemi tarafından kaydedilen bağlanma kinetikleri analiz edilerek karakterize edilmiştir. Kalınlığı optimize edilmiş IgG-MIP'ler, IgG'ye 2,8-4 aralığında baskı faktörleri gösterirken, dört rejenerasyon döngüsünden sonra şablonu seçici olarak tanıma yeteneğini korumuştur. Protein-MIP algılama katmanının SAW teknolojisi ile kolay entegrasyonunun, hedef proteinin gerçek zamanlı bağlanma olaylarının ilgili hassasiyet seviyelerinde gözlemlenmesine izin vermiş ve biyolojik numunelerin analizi için biyosensörün düşük maliyetle üretilebileceği bildirilmiştir. (Tretjakov, Syritski, Reut, Boroznjak, Öpik, 2016).

Ertürk ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan immünoglobulin G'nin (IgG) gerçek zamanlı tespiti için Fab fragmanları baskılı yüzey plazmon rezonans (SPR) çipi hazırlamıştır. SPR çipine polimerizasyon öncüsü eklemek için, çip yüzeyi alil merkaptan ile modifiye edilmiştir. IgG moleküllerinin Fab fragmanları, papain sindirim prosedürü ile hazırlanmışve Hi-Trap_r Protein A FF kolonu kullanılarak hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) sistemi ile toplanmıştır. Toplanan Fab fragmanları,histidin içeren spesifik monomer, N-metakriloil-1-histidin metil ester (MAH) ile kompleksleştirilmiştir. Moleküler baskılı polimerik nanofilm, etilen glikol dimetakrilat ve 2-hidroksietilmetakrilat varlığında SPR çipi üzerinde hazırlanmıştır. Daha sonra kalıp moleküller (Fab parçaları), 1 M NaCl solüsyonu (pH: 7.4, fosfat tampon sistemi) kullanılarak polimerik nanofilmden uzaklaştırılmıştır. Moleküler

baskılı SPR çipi, temas açısı, atomik kuvvet mikroskobu ve Fourier transform kızılötesi spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda sulu IgG çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı IgG tespit çalışmaları ile moleküler baskılanmış SPR çip-IgG sisteminin kinetik ve izoterm parametreleri hesaplanmıştır. Moleküler baskılı SPR çipinin seçiciliğini ve özgüllüğünü göstermek için, sığır serum albümini (BSA), IgG, Fab ve Fc fragmanları kullanılarak rekabetçi kinetik analizler yapılmıştır. Son adım olarak, insan plazmasından IgG saptama çalışmaları yapılmış ve ölçülen IgG konsantrasyonları, enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) ile belirlenen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Tayin limiti 56 ng/mL olarak bulunmuştur. Sonuçların ışığında, önerilen moleküler baskılı SPR çipinin hem sulu çözeltilerden hem de karmaşık doğal numunelerden IgG moleküllerini tespit edebildiği bildirilmiştir (Ertürk, Uzun, Tümer, Say, Denizli, 2011).

Bai ve arkadaşları IgG tayinin için, nano Au/nano Ni ile modifiye edilmiş Au elektrot (IgGIPs/AuNCs/NiNCs/Au) yüzeyinde metal içermeyen görünür ışık kaynaklı atom transfer radikal polimerizasyonu (MVL ATRP) yoluyla IgG baskılı polimerler (IgGIP'ler) üretmiştir. IgGIP'ler hem şablon hem de fotokatalizör olarak floresan izotiyosiyanat (FITC-IgG) kullanılarak konjuge edilmiş IgG ile hazırlanmıştır. IgG şablonu, 1 saat boyunca 10 g/L SDS içeren %10 (h/h) CH3COOH çözeltisine daldırılarak, −0,6 V elektrik potansiyeli ile uzaklaştırılmıştır. Üretilen elektrotlar, döngüsel voltametri (CV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile incelenmiştir. 1.0 × 10−6 mg L-1 ila 1.0 × 101 mg L-1 arasındaki doğrusal aralık, 2.0 × 10−8 mg L-1 (S/N = 3) algılama limiti (LOD) ile elde edilmiştir. (Bai, Sun, Zhao, Han, Zhang, Sun, Li, (2021).

1.7 Tezin Amacı ve Önemi

Plazmada ve hücre dışı insan vücut sıvılarında bulunan ve vücuda giren patojenleri etkisiz hale getirmekle görevli olan immunoglobulinlerin hastalık sırasında ve sonrasında kandaki seviyelerinin tayin edilebilmesi, hastalığın tespiti ve takibi için önemlidir. Bunun içerisinde; hepatit tanısı ve takibi, enfeksiyonlar, çölyak, eklem romatizması ve lupus gibi otoimmun hastalıklar ve bazı kanserlerin tiplendirilmesi ve takibi yer alır. Bir hastalığın aktif olup olmadığı, önceden geçirilip geçirilmediği veya bağışıklık yanıtının tamamlanıp tamamlanmadığı antikor yanıtına göre tespit edilebilir. Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan korana virüs salgınında da hem hastalık geçirildikten sonra bağışıklık süresinin hem de aşıların yetkinliğinin araştırılması için IgG seviyelerinin tespiti önemli bir yer tutmaktadır. Ancak kullanılan diğer yöntemlerde örnek hazırlama ve saflaştırma ihtiyacı, yüksek maliyetli cihazlar ve bunların bakımları, nitelikli personel gereksinimi ve düşük hassasiyet gibi dezavantajlardan dolayı yeni teşhis araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Biyosensörler, basit enstrümantasyon, hızlı sonuç verme, yüksek hassasiyet ve seçicilik gibi birçok özelliklerinden dolayı son yıllarda IgG tayininde ilgi çekmektedir. Bu amaçla, tez çalışması kapsamında, İmmunoglobulin G tayini için, moleküler baskılama temelli sensör geliştirilmiştir.

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan; Pirol-3-karboksilik asit (PPy3COOH), Hidroksi fulleren, IgG, H_2SO_4, HCl, NaOH, Fe(CN)6-3/-4, KCl, KH_2PO_4 VE IgG Sigma Aldrich firmasından Bovine serum albümin SFAC firmasından temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2 Kullanılan Cihazlar

Elektrokimyasal testler için Palme Sense 3 marka potansiyostat ve empedans eğrilerini hesaplamak için PSTrace 5.7 arayüz yazılımı kullanılmıştır. 3 elektrotlu sistemli (altın çalışma elektrotu, platin karşı elektrot ve Ag/AgCl referans elektrotu) SCE (Screen Printed Electrot) elektrotlar (DRP-250AT) Drop sense şirketinden temin edilmiştir. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında EZODO marka PL-700PC pH metre kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan saf su, Termo Scientific cihazı ile üretilmiştir. Elektrot yüzeyinin karakterizasyonu COXEM EM30 model taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır.

2.3 Yöntem

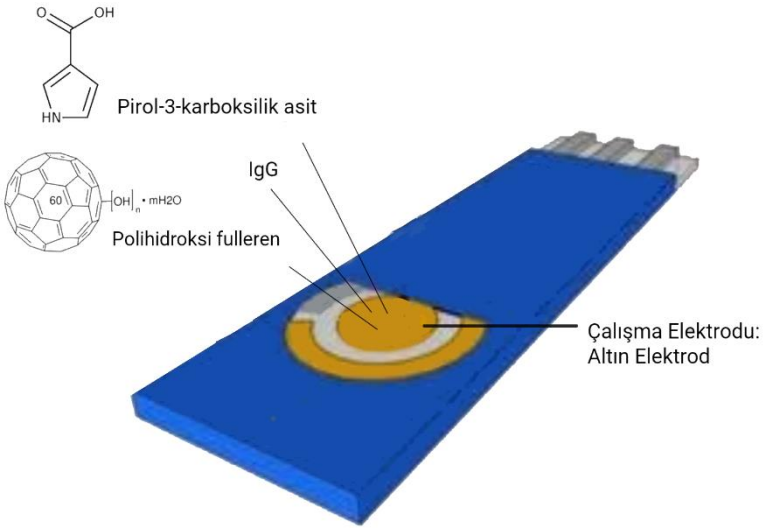
Çalışma kapsamında IgG tayinine yönelik moleküler baskılama temelli sensör geliştirilmesi için aşağıdaki yöntem basamakları izlenmiştir:

- IgG Tayini İçin Elektrot Yüzeyinin Hazırlanması
- Monomer Kalıp Oranının Belirlenmesi
- Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması için Desorpsiyon Ajanı Seçimi
- Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması
- Elektrot Yüzeyinin Karakterizasyonu
- NIP Sensörünün Hazırlanması
- Sensör Cevap Zamanının Belirlenmesi

- Sensörün Performans Parametrelerinin Ölçülmesi ve Uygulanabilirliğinin İncelenmesi

2.3.1 IgG Tayini İçin Elektrot Yüzeyinin Hazırlanması

- 1,2 mg PPy3COOH tartıldı ve 62 µL 100mM sülfürik asit ile eppendorf tüp içinde çözüldü.
- 10 µL IgG eklendi.
- Bu çözeltiye, polimerizasyon başlatıcı olarak 8 µL hidroksi fulleren eklendi.
- Çözelti, altın elektrot üzerindeki çalışma elektodu yüzeyine pipet yardımıyla yayıldı.
- CV'de 10 döngü ile polimerizasyon yapıldı (Sekil 7).
- PPy3COOH elektropolimerizasyonu için CV parametreleri 100mM H2SO4'te 5 döngü için 50 mV/s tarama hızı ile 0.1 ve +0.5 V potansiyel aralığı olarak belirlendi.
- Bu tez çalışmasında impedans parametreleri; 5mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probları ve 100mM KCl ile pH=7. Ölçüm, elektrotların 50mM PBS (Fosfat Tamponu) tamponuna daldırılmasıyla gerçekleştirilecektir. 10000 Hz ile 0,05 Hz arasında frekans taraması ile 180 mV DC ve 10 mV AC potansiyel uygulaması olarak belirlenmiş ve ohmdaki empedans değişimini belirlemek için devre şeması olarak R1(C(R2W)) modeli kullanılmıştır.
- Bu tez çalışmasında, immobilizasyon basamaklarının ve elektropolimerizasyonun kontrolünde karakterizasyon yöntemi olarak CV kullanılmıştır. -0. ila +0.5 V potansiyel aralığında 50 mV/s'lik bir tarama hızı olarak belirlenir. 2CV, farklı yüzeylerde redoks probunu algılamak için yaygın olarak kullanılan yüzey karakterizasyonu için kullanılır. Bu nedenle, modifikasyonlarımız farklı yüzeylerde redoks probu elektrokimyasal sinyalleri ile gözlemlendi.



Şekil 2.1 Sensör hazırlığında kullanılan elektrot ve kimyasallar

2.3.2 Monomer/ Kalıp Oranının Belirlenmesi

Monomer /kalıp optimizasyonu için monomer ve kalıp molekül miktarının değiştiği üç farklı elektrod hazırlandı (Tablo 4). Her biri için EIS verileri alındı ve % hatalar karşılaştırıldı.

Tablo 2.1 Elektrotlar için kullanılan monomer/kalıp miktarları

	1. Elektrot	2.Elektrot	3. Elektrot
IgG	5 µL	10 µL	10 µL
PPy3COOH	1,2 mg (62 UL H_2SO_4 içinde)	0,6 mg (62 UL H_2SO_4 içinde	1,2 mg (62 UL H_2SO_4 içinde
Fulloren-OH	8 µL	8 µL	8 µL

2.3.3 Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması ve Desorpsiyon Ajanı Seçimi

Bu adımda kalıp molekülün (IgG) uzaklaştırılması ile impedans değişimlerinin izlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için 3.3.1.'de anlatıldığı şekilde moleküler baskılanmış elektrod hazırlandıktan sonra 500 mM HCl içine daldırılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda elektrod saf su ile yavaşça yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur. Uzaklaştırma adımı CV ve EIS ile incelenmiştir.

2.3.3.1 Desorpsiyon Süresinin Belirlenmesi

- 1,2 mg PPy3COOH tartıldı ve 62 µL 100mM sülfürik asit ile eppendorf tüp içinde çözüldü.
- 10 µL IgG eklendi.
- Bu çözeltiye, polimerizasyon başlatıcı olarak 8 µL hidroksi fulleren eklendi.
- CV'de 10 döngü ile polimerizasyon yapıldı.
- Desorpsiyon için 500 mM HCl ile 15, 30 ve 60 dakika olmak üzere üç farklı süre çalışıldı.

2.3.3.2 Desorpsiyon Ajanının Derişiminin Belirlenmesi

- 3.3.1'de anlatılan işlem basamakları tekrarlanarak 3 adet elektrot hazırlandı.
- 100, 500 ve 1000 mM olmak üzere üç farklı derişimde HCl ile desorpsiyon yapıldı.
- Desorpsiyon sonrası EIS sonuçların alındı, % hata sonuçları karşılaştırıldı.

2.3.4 Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Elektrot hazırlama adımlarının optimizasyonu sonrası optimum koşullarda hazırlanan elektrot ile 250-1200 ng/mL konsantarsyon aralığında kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

2.3.5 Elektrod Yüzeyinin Karakterizasyonu

Polimerizasyon sonrası elektrod yüzeyi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri ve elektrokimyasal impedans spektrometresi (EIS) verileri kullanılarak karakterize edilmiştir.

2.3.6 NIP Sensörünün Hazırlanması

- 1,2 mg PPy3COOH tartıldı ve 62 µL 100mM sülfürik asit ile eppendorf tüp içinde çözüldü.
- Bu çözeltiye, polimerizasyon başlatıcı olarak 8 µL hidroksi fulleren eklendi.
- Kalıp molekül olmaksızın CV'de 10 döngü ile polimerizasyon yapıldı.

2.3.7 Sensör Cevap Süresinin Belirlenmesi

Elektrodun cevap zamanının optimizasyonu kronoimpedans yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Cevap zamanının belirlenmesi için öncelikle pH 7.4 fosfat tamponunda CI ölçümü alınmış ardından ortama son konsantrasyon 500 ng/mL olacak şekilde IgG eklenmiş ve 1200 sn süre ile CI ölçümü alınmıştır.

2.3.8 Sensörün Performans Parametrelerinin Ölçülmesi ve Uygulanabilirliğin İncelenemesi

Sensör sisteminin performansının belirlenmesi için, standart IgG örnekleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş, LOD ve LOQ, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerleri hesaplanmıştır. LOD değeri, kalibrasyon çizelgesinin konsantrasyonunun tekrarlanan ölçümleri sonucunda elde edilen kalibrasyon çizelgesinin belirlenmesinden sonra en düşük değerdir.. LOD ve LOQ, sırasıyla LOD = 3.3 (S)/m, LOQ =10 (S)/m denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır; burada S, yanıtın standart sapmasıdır ve m, kalibrasyon eğrisinin eğimidir.Hazırlanan sensörün uygulanabilirlik çalışmaları yapay serum (Altay,2021) kullanılarak kronoimpedans metoduyla yapılmıştır. Bunun için öncelikle pH 7.4 50 mM fosfat tamponu ile 1200 saniye süre ile CI ölçümü yapılmış, ardından ortama farklı derişimlerde (250 ve 500 ng/mL) IgG eklenerek 1200 saniye ile CI ölçümü alınmıştır.

2.3.8.1 Seçicilik

Seçicilik için, 3.3.1.'deki adımlardaki IgG yerine 500 ng/mL, 500 ng/mL BSA kullanılarak 1200 sn CI ölçümü ile yapıldı

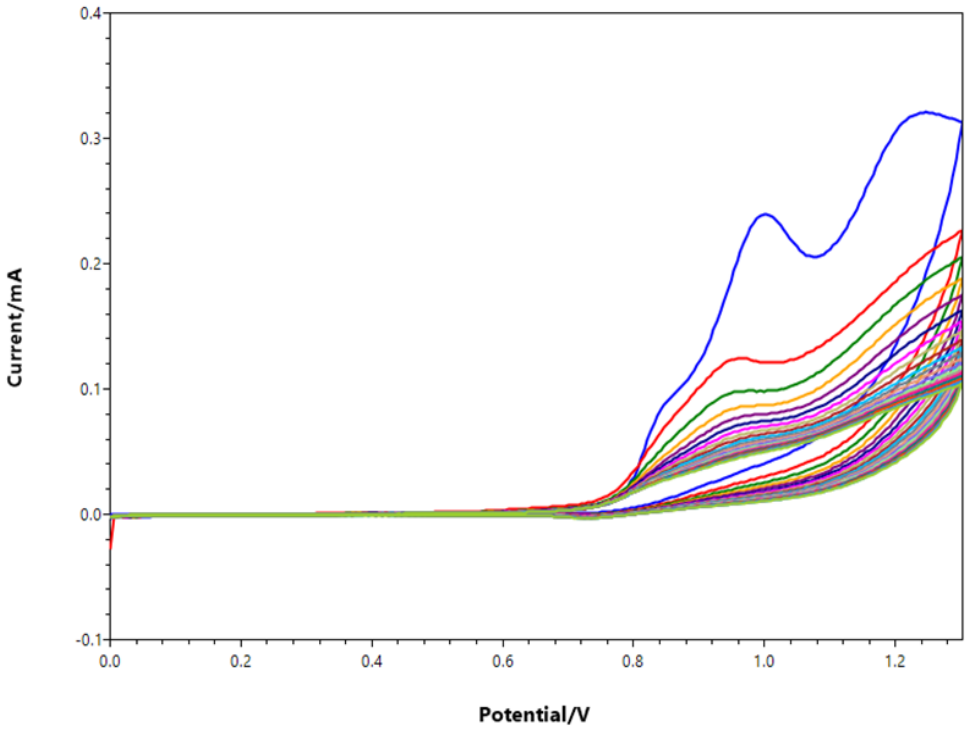
2.3.8.2 Depo Kararlılığın Test Edilmesi

25°C ve 4°C'de test edilmek üzere iki elektrot hazırlandı. Farklı sürelerde CV ve EIS verileri alındı.

BÖLÜM ÜÇ
BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 IgG Tayini İçin Elektrod Yüzeyinin Hazırlanması

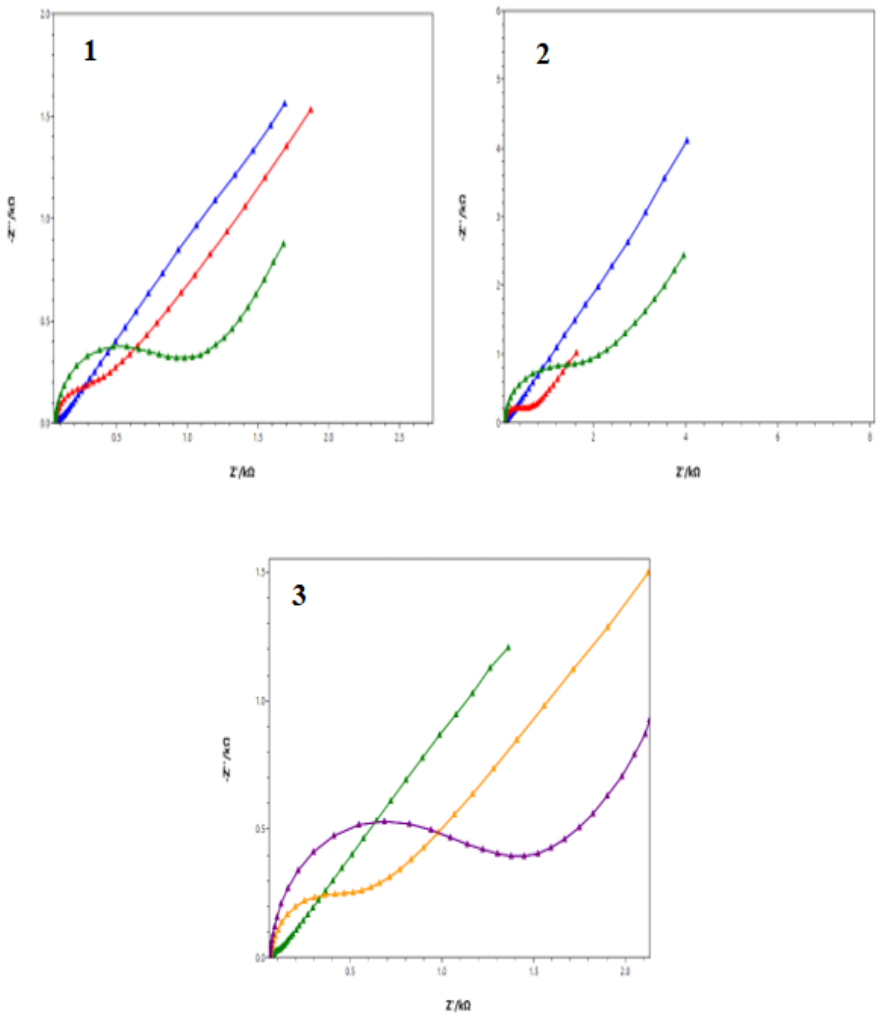
IgG için moleküler baskılanmış elektrod, yöntem kısmında belirtilen adımlar izlenerek hazırlanmış ve CV ile polimerizasyon başarıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Elektropolimerizasyon CV

3.2 Monomer/ Kalıp Optimizasyonu

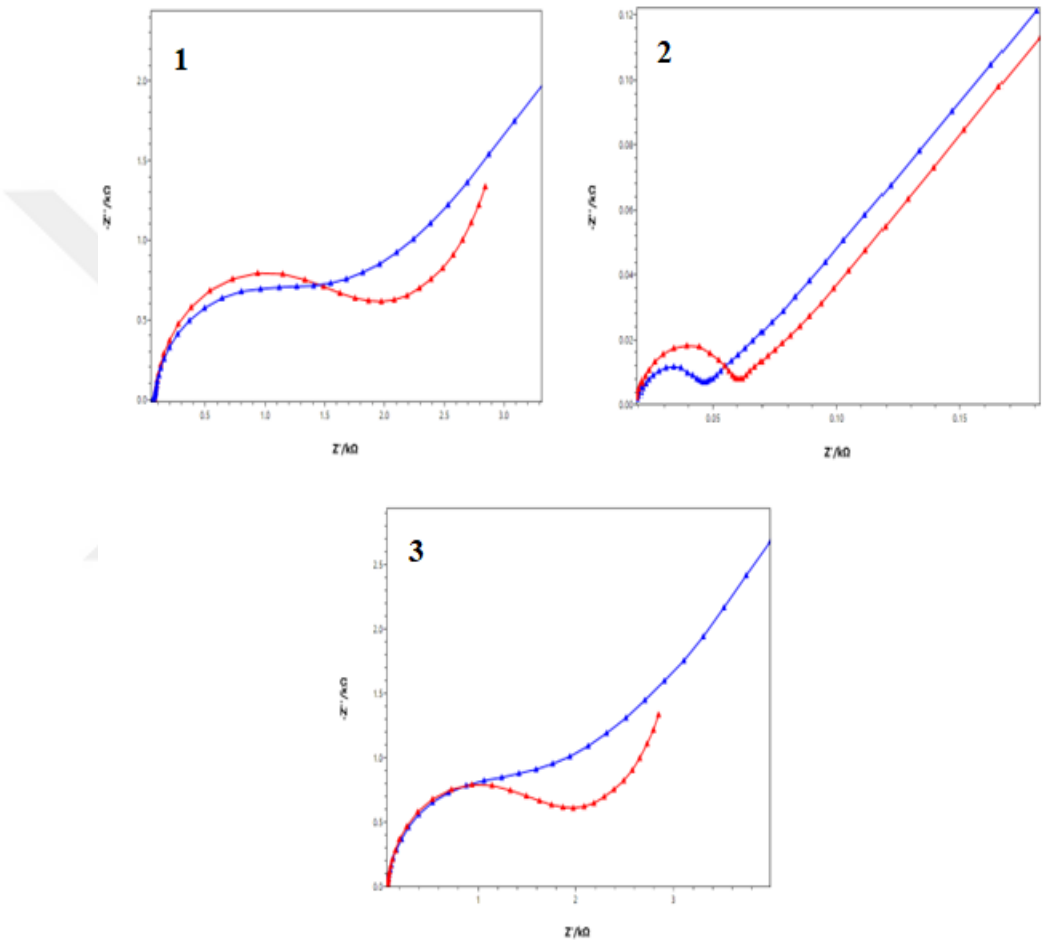
Monomer /kalıp optimizasyonu için monomer ve kalıp molekül miktarının değiştiği üç farklı elektrod hazırlanmış EIS verileri karşılaştırılmıştır. Çalışmalara yüzde hatası en düşük olan 3 no'lu elektrot ile devam edilmiştir.



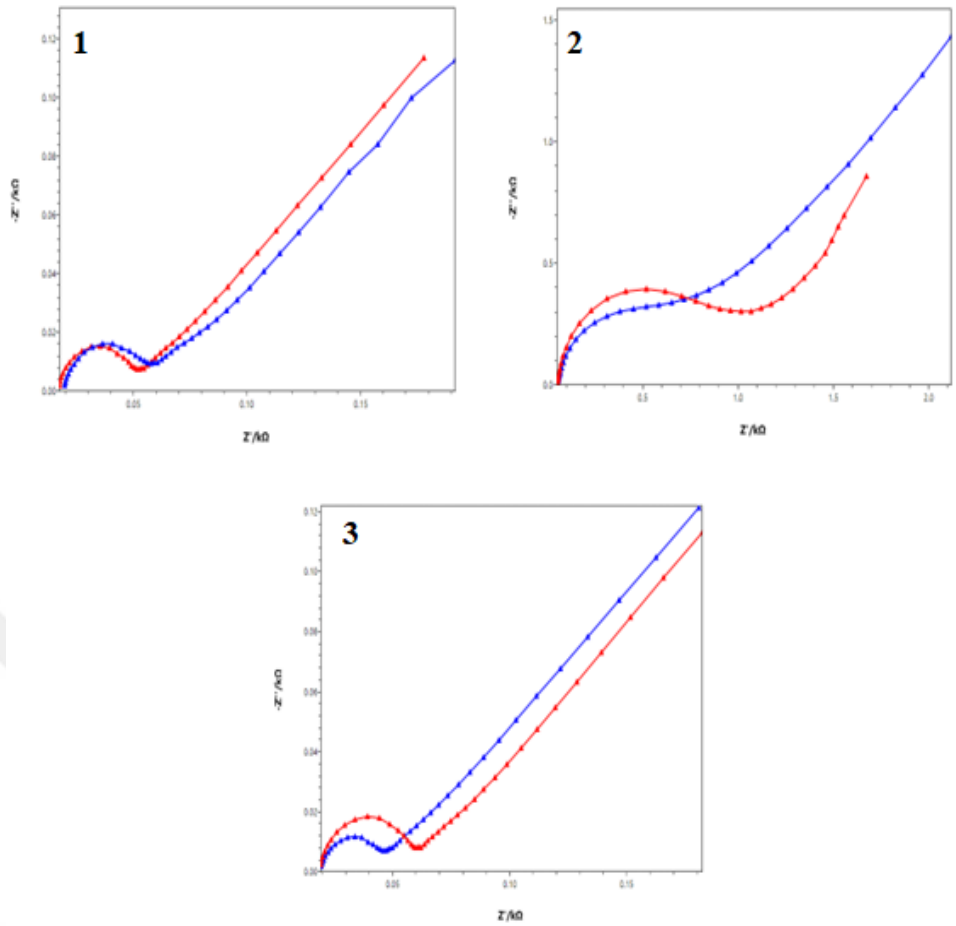
Şekil 3. 2 Farklı monomer/kalıp oranlarında sensörün hazırlanması: 1) ve 2) Mavi: Bare Aue yeşil: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG, Kırmızı: AuE-PPy3COOH-FulOH desorpsiyon, 3) , 3)Yeşil: Bare AuE, Mor: PPy3COOH-FulOH-IgG, Sarı: AuE-PPy3COOH-FulOH desorpsiyon

3.3 Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması için Desorpsiyon Ajanı Seçimi

Moleküler baskılanmış polimerden kalıp molekülün (IgG) uzaklaştırılması 3.3.4.'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Desorpsiyon ajanının derişimi ve desorpsiyon süresi testlerinin sonucunda alınan EIS verilerine dayanarak 500 mM HCl ile 30 dk desorpsiyon yapılmasına karar verilmiştir.

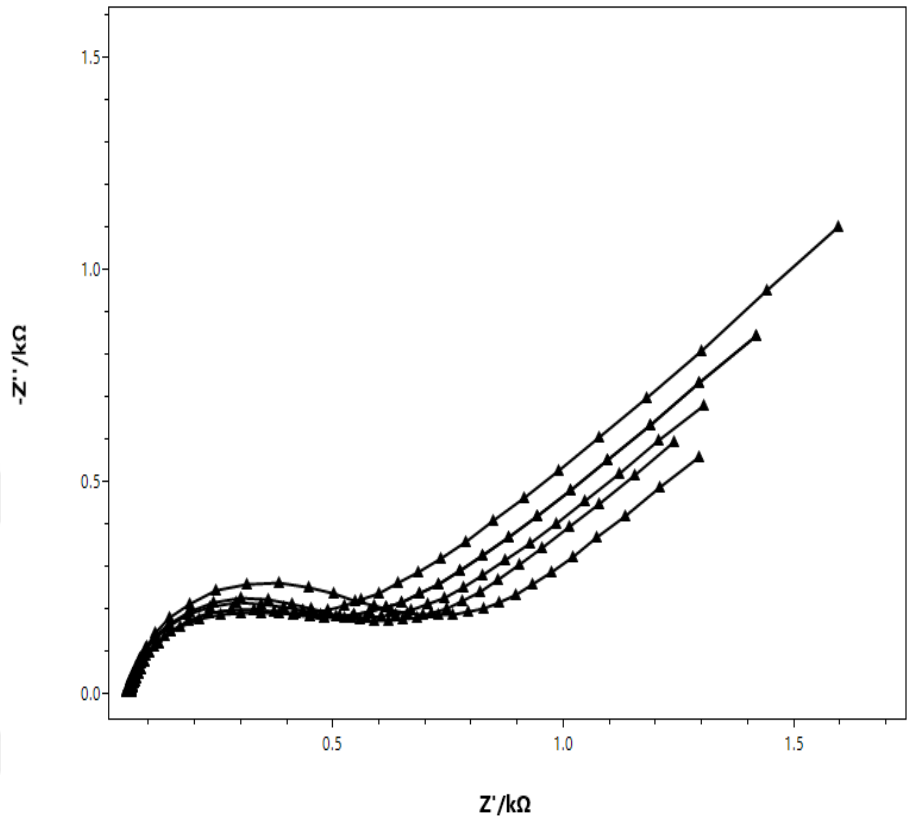


Şekil 3.3 Desorpsiyon süresi EIS verileri: Kırmızı: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG Mavi: AuE-PPy3COOH-FulOH desorpsiyon

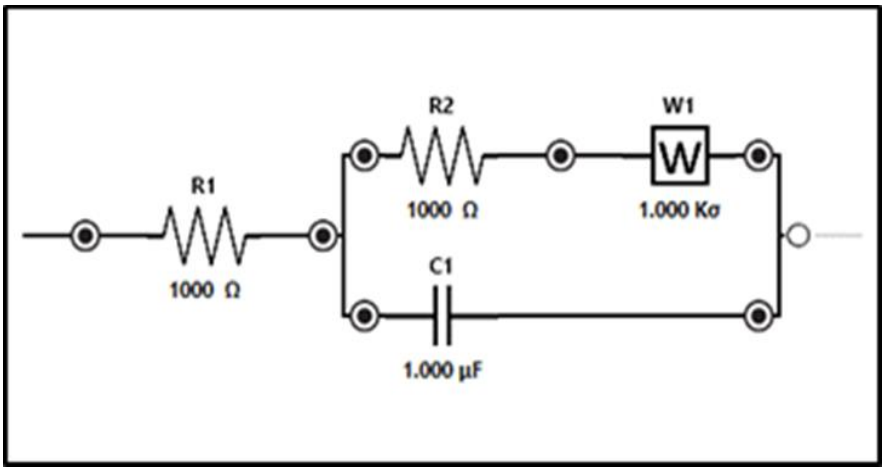


Şekil 3.4 Desorpsiyon ajanı derişimi EIS verileri: Kırmızı: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG Mavi: AuE-PPy3COOH-FulOH desorpsiyon

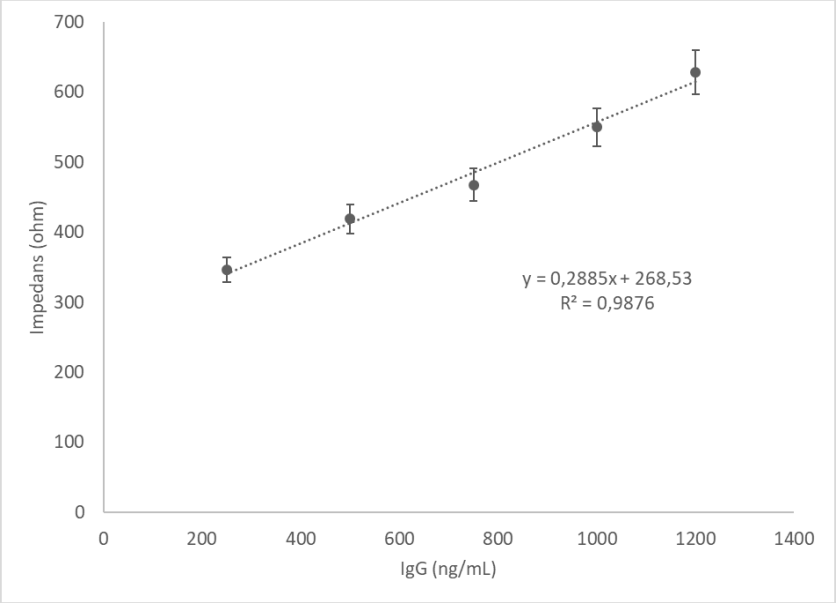
3.4 Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması



Şekil 3.5 Sensör Sisteminin EIS verileri



Şekil 3.6 Elektrot yüzetinin elektrokimyasal devre şeması

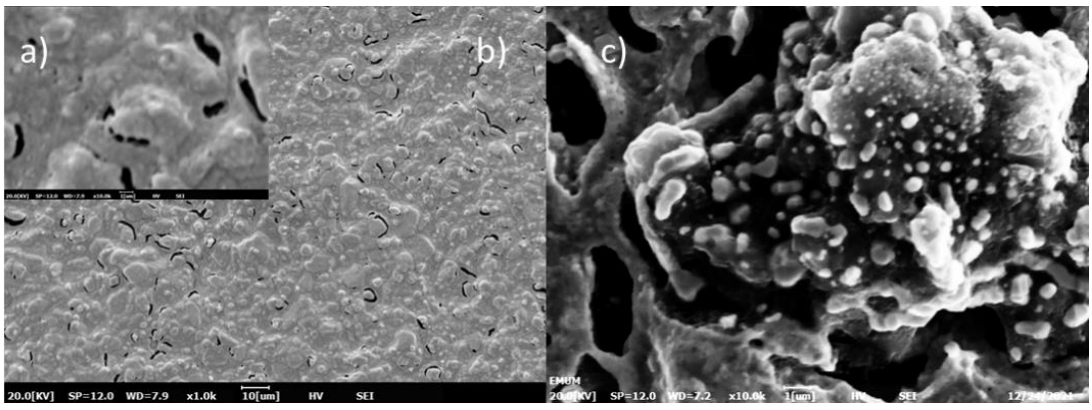


Şekil 3.7. Kalbirasyon grafiği

3.5 Elektrot Yüzeyinin Karakterizasyonu

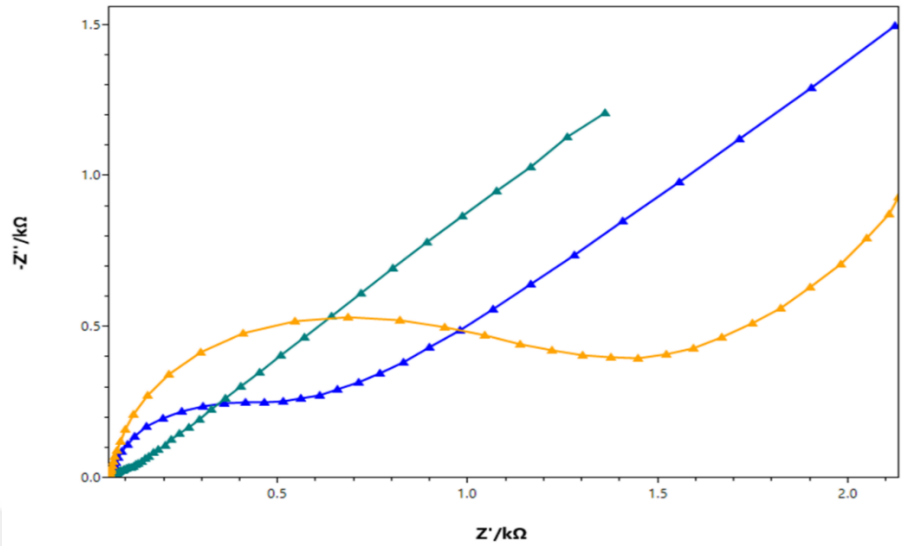
3.5.1 SEM Görüntülerinin İncelenmesi

Öncelikle polimerizasyon öncesi AuE elektrotun yalın halinin SEM görüntüleri alındı. Polimerizasyon sonrası kaplanmış yüzeyin görüntüleri alındı. Yüzey morfolojisinin değişiminden kaplamanın gerçekleştiği anlaşılmaktadır. SEM görüntüleri EIS verilerini doğrular niteliktedir.

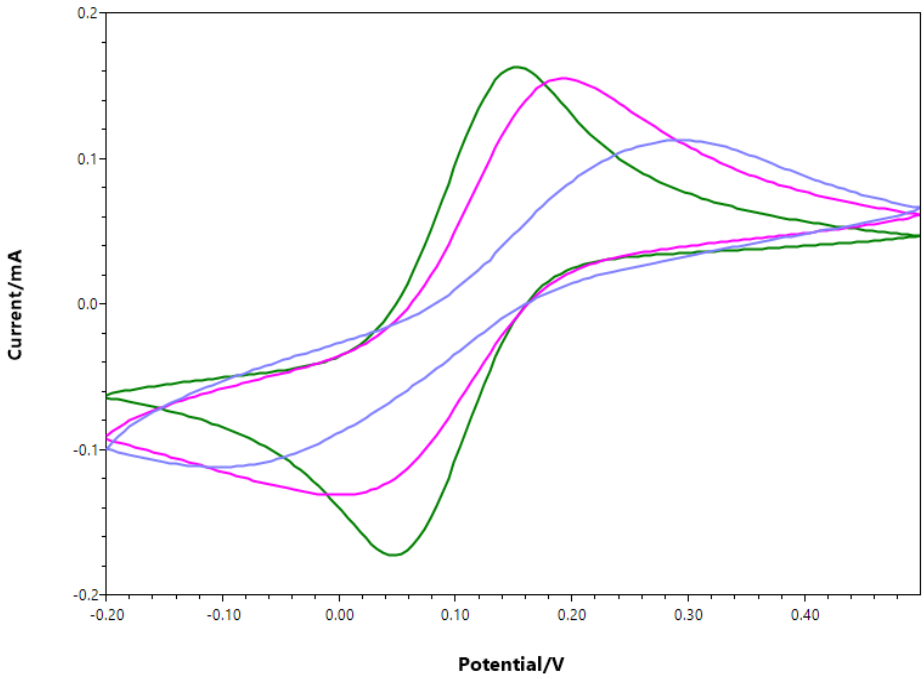


Şekil 3.8. AuE ve AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG elektrotların SEM görüntüleri a) AuE 5k b) AuE 1k c) AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG 10k

3.5.2 EIS Verilerinin İncelemesi



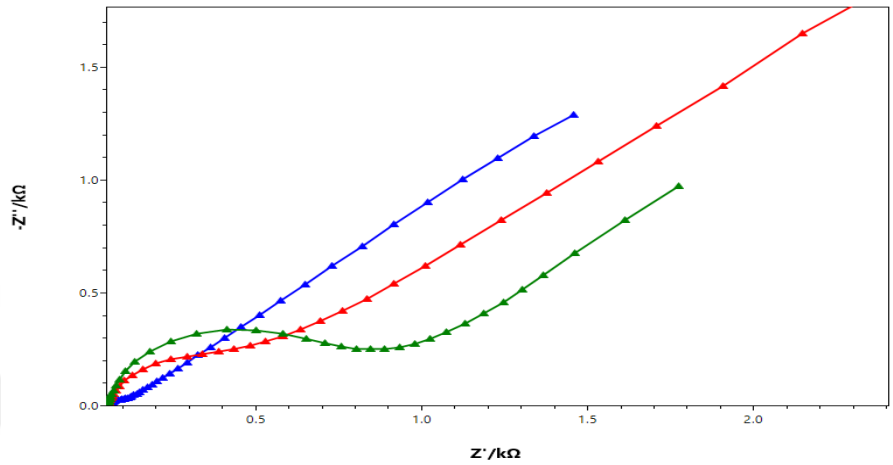
Şekil 3.9 İmmobilizasyon adımları EIS: yeşil: Bare AuE, sarı: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG, lacivert: AuE-PPy3COOH-FulOH desorpsiyon



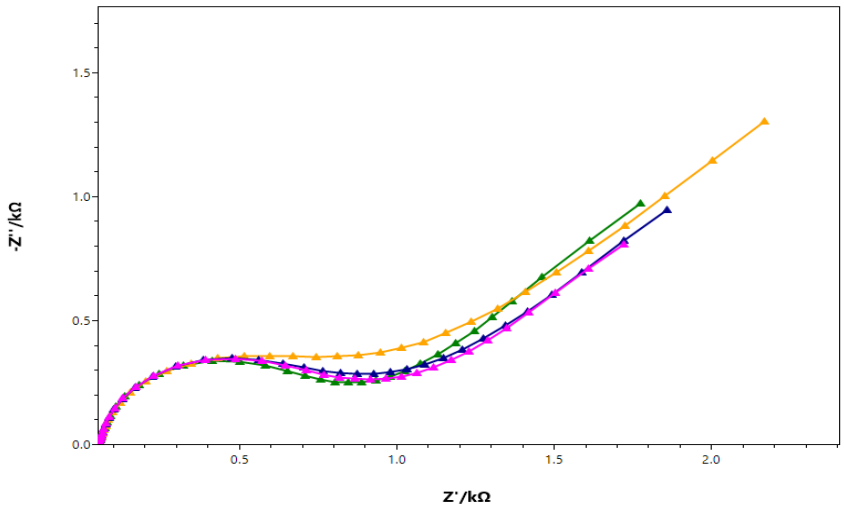
Şekil 3.10nİmmobilizasyon adımları CV Yeşil: Bare AuE Mor: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG Pembe: AuE-PPy3COOH-FulOH desorpsiyon

3.5 NIP (Non- Imprinted Polymer) Elektrodun Hazırlanması

NIP elektrotta da polimerizasyon gerçekleşmiş, ancak ortamda IgG olmadığı için anlamlı bir artış olmamıştır. Görülen artış adsorpsiyon olarak yorumlanabilir.



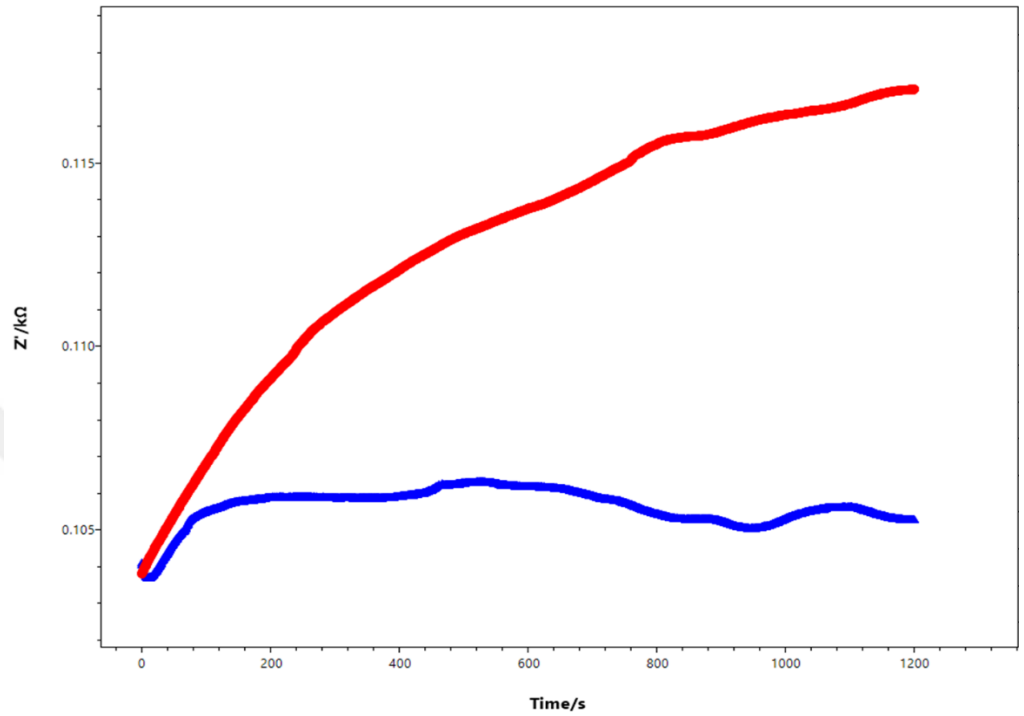
Şekil 3.11 NIP elektrot EIS: Mavi: Bare Aue yeşil: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG, Kırmızı: AuE-PPy3COOH-FulOH desorpsiyon



Şekil 3.12 NIP elektrot IgG ekleme EIS:Yeşil: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG Sarı: 1. IgG ekleme Mavi: 2. IgG ekleme Pembe: 3. IgG ekleme

3.6 Sensör Cevap Zamanının Belirlenmesi

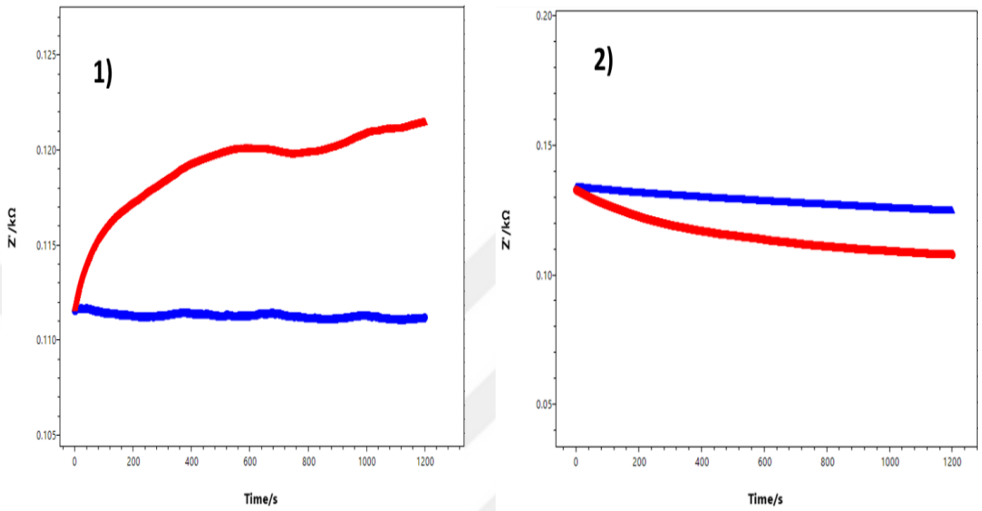
Sensörün cevap zamanı 200 saniye olarak belirlenmiştir.



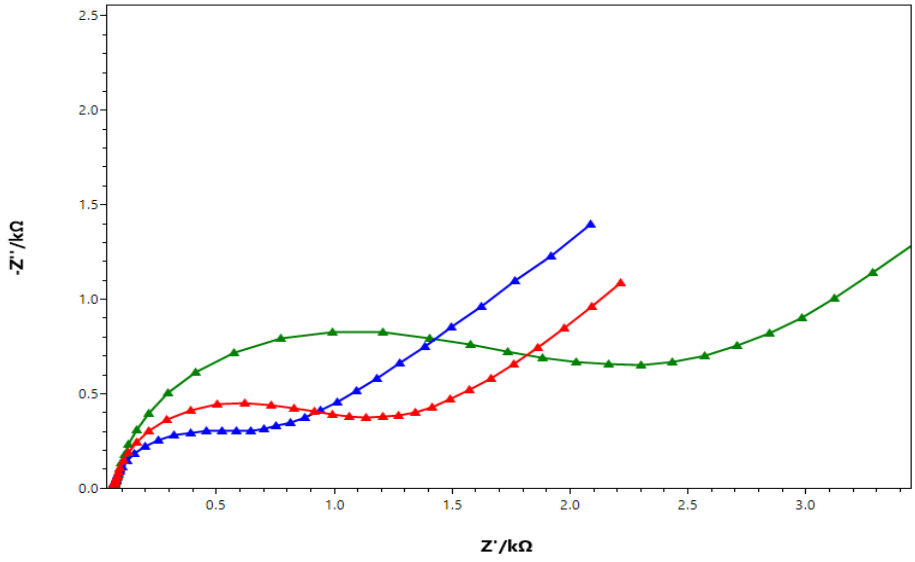
Şekil 3.13 Sensör Cevap Zamanı CI: Kırmızı: Fosfat tamponunda , Mavi: 500ng/ml IgG eklendikten sonra

3.7 Seçicilik

Seçicilik için CI yöntemi kullanılmış ve sistemin IgG ile aynı konsantrasyonda BSA'ya yanıt vermediği IgG'ye seçici olduğu görülmüştür. EIS ile alınan ölçümlerde ise bir cevap gözlenmiş ama bu cevabın adsorpsiyon temelli olduğu görülmüştür.



Şekil 3.14 Seçicilik CI Verileri: 1) Kırmızı: Fosfat tamponunda , Mavi: 500ng/ml IgG eklendikten sonra 2) Kırmızı: Fosfat tamponunda, Mavi: 500 ng/mL BSA eklendikten sonra



Şekil 3.15 Seçicilik için EIS verileri: Kırmızı: AuE-PPy3COOH-FulOH-IgG Mavi: AuE-PPy3COOH-FulOH des Yeşil: BSA ekleme sonrası

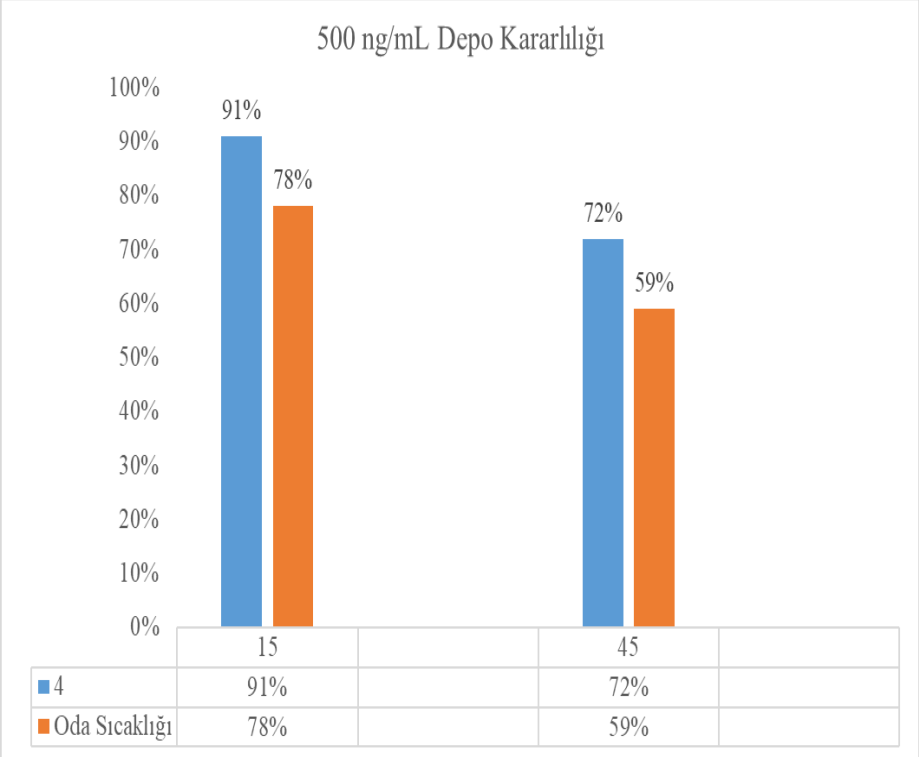
3.8 Sensörün Performans Parametrelerinin Ölçülmesi

Tablo 3.1 Sensörün performans parametreleri (C.V: Standart sapma)

Performans	Parametre
LOD (SD: 7,01)	80 ng/mL
LOQ	243 ng/mL
Lineer Aralık	250-1200 ng/mL
Tekrarlanabilirlik (n=3) 250 ng/mL 500 ng/mL	257,12 ± 17,3 ng/mL (C.V %6) 518,84 ± 21,1 ng/mL (C.V. %4)
Tekrar Üretilebilirlik (n=5)	R^2=0,9876 ± 0,0059
Gerçek Örnek Denemesi (n=3) 250 ng/mL 500 ng/mL	277,22 ± 23,11 ng/mL (C.V. %8,34) 530,65 ± 28,4 ng/mL (C.V. %7,36)

3.9 Depo kararlılık belirlenmesi

Hazırlanan elektrotlar ile 500 ng/ml IgG kullanılarak ölçüm alınmış ve +4 ve 25 °C derecede belirlenen elektrotlar ile 15. ve 45. Günlerde ölçüm alınmış ve depo kararlılık ilk gün alınan ölçümler ile rölatif olarak karşılaştırma yapılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.16 Depo kararlılığın belirlenmesi

BÖLÜM DÖRT

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu tezde, önemli bir biyomolekül olan için IgG tayini için moleküler baskılama temelli bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Ölçüm yaparken, daha doğrusu biyomedikal alanında ölçüm yaparken istenilen şey düşük maliyetle ve fiziksel faktörlerden etkilenmeden ölçüm yapmaktır. Özellikle son 2 yılda içinde yüzleştiğimiz pandemi gerçeği ile hızlı ve maliyeti düşük ölçümler yapabilmenin önemi bir kez daha vurgulanmış oldu.

Sensör sistemlerinin hazırlanmasında farklı yüzeyler ve iletiçiler kullanılarak daha hassas ve avantajlı sensörler hazırlayarak ölçüm yapmak hedeflenmektedir.

Bu tez çalışmasında, moleküler baskılama teknolojisini kullanarak IgG tayini için seçici yüzeye sahip bir elektrot hazırlanmıştır. Monomer olarak PPy3COOH kullanılan bu sistemde bir nanoyapı olan hidroksile fulleren kullanarak sistemin seçiciliği artırılmıştır. Sistemde kullanılan elektropolimerize edilebilir monomer olan Pirol-3-karboksilik asit, elektrot yüzeyinde kolayca polimerler oluşturulmasını sağlamıştır. Üretim standardize edilebildiği için bu şekilde yeniden üretilme potansiyeli de yüksektir. Tekrar üretilebilirlik sonuçları da bunu doğrular niteliktedir ($R2=0,9876 \pm 0,0059$). Moleküler baskılamanın kanıtı, geliştirilen sensör teknolojisinin farklı yöntemlerle doğrulanmasıdır. Bu çalışmada, CV ve EIS verileri üzerinde elektrokimyasal doğrulamalar yapılmıştır. Elektrot sisteminin elektrokimyasal olarak karakterize edildiği redoks probu negatif yüklüdür. Redoks probunun yüzeye hareketi, elektrot yüzeyindeki yüklerin değişmesiyle değişir. Normal koşullar altında, elektrostatik etkileşimler göz ardı edilerek, redoks probunun yüzeye yaklaşımı difüzyon yoluyladır. Ancak yüzey negatif yüklüyse, örneğin yüzeyde karboksil grupları bulunuyorsa, redoks probu bu negatif yüklü gruplar tarafından itilir. Sonuç olarak, yüzeyde difüzyondan daha fazla veya daha az redoks probları bulunur ve elektrokimyasal olarak dönüştürülür ve bu şekilde CV ve EIS pikleri yüzeye bağlı olarak değişir. Ters yüklerde CV tepe değeri artarken EIS azalır. Aksi takdirde tam tersi bir durum ortaya çıkar. Bu etkileşimler ile elektrot yüzey karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elektrot yüzeyinde hazırlanan yapı taramalı elektron mikroskobu (SEM) verileri ile de doğrulanmıştır. Ortamda IgG olmadan hazırlanan

NIP sensörün sinyal vermemesi de sistemin çalışır olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca BSA ile yapılan seçicilik çalışmalarında, sistemin BSA'ya cevap vermediği, IgG'ye seçici olduğu açıkça görülmüştür. Ölçüm süresi 200 saniye olarak belirlenmiş ve benzer çalışmalar dikkate alındığında ölçüm süresi açısından da çok iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, bu yüksek lisan tezinde, IgG ölçülmesinde kullanılmak üzere seçiciliği yüksek yeni nesil bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Bu şekilde tez çalışması amacına uygun olarak tamamlanmıştır.

KAYNAKLAR

Ayankojo, A. G., Borozнjak, R., Reut, J., Öpik, A. ve Syritski, V. (2022). Molecularly imprinted polymer based electrochemical sensor for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike protein. *Sensors and Actuators B: Chemical, 353*, 131160. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131160

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. ve Pillai, S. (2019). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book*. Elsevier India.

Bai, R., Sun, Y., Zhao, M., Han, Z., Zhang, J., Sun, Y. ve Li, S. (2021). Preparation of IgG imprinted polymers by metal-free visible-light-induced ATRP and its applications in biosensor. *Talanta*, 226, 122160. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122160

Beluomini, M. A., da Silva, J. L., de Sá, A. C., Buffon, E., Pereira, T. C. ve Stradiotto, N. R. (2019). Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymer on nanostructured carbon materials: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *840*, 343-366. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.005

Dandliker, W. B., De Saussure, V. A. ve Grow, T. E. (1969). Turbidimetric Method for the Assay of Antiviral Antibodies. *Journal of Virology*, *3*(3), 283-289. DOI:https://doi.org/10.1128/jvi.3.3.283-289.1969

de Sousa-Pereira, P. ve Woof, J. M. (2019). IgA: structure, function, and developability. *Antibodies*, *8*(4), 57. https://doi.org/10.3390/antib8040057

Ertürk, G., Uzun, L., Tümer, M. A., Say, R. ve Denizli, A. (2011). Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *28*(1), 97-104. https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.004

Greenspan, N. S. ve Cavacini, L. A. (2019). *Immunoglobulin Function. Clinical Immunology*,*223–233.e1*. doi:10.1016/b978-0-7020-6896-6.00015-6. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00015-6

Irshad, M., Iqbal, N., Mujahid, A., Afzal, A., Hussain, T., Sharif, A., ve Athar, M. M. (2013). Molecularly imprinted nanomaterials for sensor applications. *Nanomaterials*, *3*(4), 615-637. https://doi.org/10.3390/nano3040615

Keyt, B. A., Baliga, R., Sinclair, A. M., Carroll, S. F. ve Peterson, M. S. (2020). Structure, function, and therapeutic use of IgM antibodies. *Antibodies*, *9*(4), 53. https://doi.org/10.3390/antib9040053

Kryscio, D. R. ve Peppas, N. A. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta biomaterialia*, *8*(2), 461-473. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.005

Liang, A. A., Hou, B. H., Tang, C. S., Sun, D. L. ve Luo, E. A. (2021). An advanced molecularly imprinted electrochemical sensor for the highly sensitive and selective detection and determination of Human IgG. *Bioelectrochemistry*, *137*, 107671. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107671

Liang, A., Tang, S., Liu, M., Yi, Y., Xie, B., Hou, H. ve Luo, A. (2022). A molecularly imprinted electrochemical sensor with tunable electrosynthesized Cu-MOFs modification for ultrasensitive detection of human IgG. *Bioelectrochemistry*, *146*, 108154. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108154

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J. ve Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*, *46*(3), 258-268. https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258

Liu, L., Marques, L., Correia, R., Morgan, S. P., Lee, S. W., Tighe, P. ve Korposh, S. (2018). Highly sensitive label-free antibody detection using a long period fibre grating sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *271*, 24-32. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.109

Mayer, G. (14 Eylül 2017). *Immunology - Chapter Seven Immunoglobulıns- Antıgen-Antıbody Reactıons And Selected Tests* . https://www.microbiologybook.org/mayer/ab-ag-rx.htm

Megha, K. B., & Mohanan, P. V. (2021). Role of immunoglobulin and antibodies in disease management. *International journal of biological macromolecules*, *169*, 28-38.Mestecky, J. (1972). Structure of antibodies. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *1*(6), 288-300. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.073

Peng, P., Liu, C., Li, Z., Xue, Z., Mao, P., Hu, J. ve You, M. (2022). Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116605. https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116605

Schroeder Jr, H. W., ve Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S41-S52. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046

Sharma, A., Pillai, M. R. A., Gautam, S. ve Hajare, S. N. (2014). Mycotoxins| Immunological techniques for detection and analysis. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Pages 869-879. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00233-0

Sutton, B. J., Davies, A. M., Bax, H. J., ve Karagiannis, S. N. (2019). IgE antibodies: from structure to function and clinical translation. *Antibodies*, *8*(1), 19. https://doi.org/10.3390/antib8010019

Tretjakov, A., Syritski, V., Reut, J., Boroznjak, R., ve Öpik, A. (2016). Molecularly imprinted polymer film interfaced with Surface Acoustic Wave technology as a sensing platform for label-free protein detection. *Analytica chimica acta*, *902*, 182-188. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.004

Uygun, H. D. E., ve Uygun, Z. O. (2020). Fullerene Based Sensor and Biosensor Technologies. In *Smart Nanosystems for Biomedicine, Optoelectronics and Catalysis*. IntechOpen.

Zhang, Y., Sun, J., Liu, L., ve Qiao, H. (2021). A review of biosensor technology and algorithms for glucose monitoring. *Journal of Diabetes and its Complications*, *35*(8), 107929. https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.107929