

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «Χημεία και τεχνολογία των υλικών»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μαρία Αντωνίου

"ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΨΗΦΙΔΩΝ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΕ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ"

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΠΕΛΤΣΙΟΣ

I Ω ANNINA 2019

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην εξειδίκευση:

Χημεία και τεχνολογία των υλικών

που απονέμει το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Εγκρίθηκε τηναπό την εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΒΑΘΜΙΔΑ

1. Κωνσταντίνος Μπέλτσιος, Καθηγητής του ΤΜΕΥ της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, **Επιβλέπων**

2. Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Α Βαθμίδας του Ινστιτούτου Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος"

3. Ευάγγελος Χατζηγεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής του ΤΜΕΥ της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

"Δηλώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κάτω από τους διεθνείς ηθικούς και ακαδημαϊκούς κανόνες δεοντολογίας και προστασίας της πνευματικής ιδιοκτησίας. Σύμφωνα με τους κανόνες αυτούς, δεν έχω προβεί σε ιδιοποίηση ζένου επιστημονικού έργου και έχω πλήρως αναφέρει τις πηγές που χρησιμοποίησα στην εργασία αυτή."

(Υπογραφή υποψηφίου)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε κατά τα έτη 2018-2019 στο εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων/Ανοσοαιθητήρων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος" υπό την επίβλεψη της Δρ. Π. Πέτρου Ερευνήτριας Α΄ Βαθμίδας και του Δρ. Σ. Κακαμπάκου Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας σε συνεργασία με τον Καθηγητή Κ. Μπέλτσιο καθηγητή του τμήματος Μηγανικών Επιστήμης και Τεγνολογίας Υλικών του Πολυτεγνείου Ιωαννίνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος" για την παροχή της εργαστηριακής υποδομής για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Βαθύτατες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τον Κ. Μπέλτσιο, Καθηγητή του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πολυτεχνείου Ιωαννίνων που με συμπεριέλαβε στην ομάδα του και μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τους στόχους μου με την αμέριστη στήριξη του, τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις του. Τις πιο θερμές ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω στον Δρα Σ. Κακαμπάκο για την εξαιρετική συνεργασία και το αμείωτο ενδιαφέρον του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Η γενναιόδωρη μετάδοση των γνώσεων του, οι συμβουλές και οι καταλυτικές παρατηρήσεις του καθόρισαν την εξέλιξη της ερευνητικής μου εργασίας. Εγκάρδιες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς την Δρα Π. Πέτρου για την άψογη συνεργασία μας και την αδιάκοπη υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Η συνεγής καθοδήγηση, οι συμβουλές και οι διορθώσεις της ήταν εξαιρετικά σημαντικές για την εξέλιξη της έρευνας και την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Δρα. Ι. Ράπτη για την κατασκευή του υλισμικού και λογισμικού τουαισθητήρα, καθώς και για το ενδιαφέρον του για την ερευνητική μου δραστηριότητα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα τους υποψήφιους διδάκτορες Δ.Τσουνίδη, Α. Κανιούρα, Ε. Σταύρα, Β. Αναστασιάδη, την υποψήφια μεταπτυχιακό Σ. Μπανού και τους συνεργαζόμενους ερευνητές Δρα Μ. Αγγελοπούλου και Δρα Γ. Κουκουβίνο για τη υποστήριξη τους και το ευχάριστο περιβάλλον εργασίας που δημιουργήσαμε.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που είναι δίπλα μου σε κάθε προσπάθεια για την πραγματοποίηση των στόχων μου, για την αδιάκοπη στήριξη και εμψύχωση σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για την ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων με μεταλλάκτες σήματος που κατασκευάζονται από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου είναι απαραίτητη η χημική ενεργοποίηση της επιφάνειας του μεταλλάκτη με σκοπό την σταθερή, επαναλήψιμη και ομοιογενή πρόσδεση των Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι χημικής ενεργοποίησης επιφανειών βιομορίων. διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου βασίζονται στην χρήση σιλανίων τα οποία μπορεί να φέρουν ομάδες κατάλληλες για την ακινητοποίηση βιομορίων μέσω προσρόφησης ή ομοιοπολικής σύνδεσης. Στην παρούσα εργασία έγινε βελτιστοποίηση μεθόδων χημικής ενεργοποίησης επιφανειών από διοξείδιο/νιτρίδιο του πυριτίου με (3-αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο (APTES) έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η ακινητοποίηση βιομορίων τόσο μέσω προσρόφησης όσο και ομοιοπολικά. Οι μέθοδοι χημικής ενεργοποίησης που μελετήθηκαν περιλάμβαναν τροποποίηση της επιφάνειας με υδατικό ή οργανικό διάλυμα APTES. Οι επιφάνειες αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν για την ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων με φυσική προσρόφηση ή ακολούθησε τροποποίηση τους με γλουταραλδεϋδη ώστε η ακινητοποίηση να πραγματοποιηθεί μέσω ομοιοπολικής αντίδρασης των αμινομάδων του APTES με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνικών μορίων. Για την αξιολόγηση των διαφορετικών πρωτοκόλλων χημικής τροποποίησης των επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου ως προς την ικανότητα ακινητοποίησης βιομορίων, στις επιφάνειες ακινητοποιήθηκαν γ-σφαιρίνες ποντικού και μετά από αντίδραση με φθοροεπισημασμένο αντίσωμα αιγός έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού προσδιορίστηκε η ένταση του σήματος φθορισμού. Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων όπως η συγκέντρωση του σιλανίου, ο χρόνος επώασης με την επιφάνεια, ο χρόνος αντίδρασης και η περιεκτικότητα του διαλύματος γλουταραλδεΰδης, η συγκέντρωση και ο χρόνος επώασης με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού κ.ά. Βρέθηκε ότι η τροποποίηση επιφανειών με διάλυμα APTES 5% (0/0) σε απόλυτη αιθανόλη ακολουθούμενη από αντίδραση με γλουταραλδεΰδη παρείχε σήματα φθορισμού κατά 30% υψηλότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτόκολλα. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος παρείχε τις χαμηλότερες τιμές διακύμανσης σήματος μεταξύ διαφορετικών ψηφίδων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με μετρήσεις σε αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός, στον οποίον ο μεταλλάκτης είναι ψηφίδες πυριτίου στις οποίες είχε εναποτεθεί υμένιο διοξειδίου του πυριτίου, παρακολουθώντας σε πραγματικό χρόνο τόσο την αντίδραση γ-σφαιρινών

ποντικού/αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού όσο και με την ακινητοποίηση αντισώματος κατά της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και χρήση των ψηφίδων για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Ως εκ τούτου, η προτεινόμενη μέθοδος χημικής και βιοχημικής ενεργοποίησης ψηφίδων πυριτίου αναμένεται να βοηθήσει στην βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών οπτικών αισθητήρων με μεταλλάκτες σήματος που κατασκευάζονται από διοξείδιο/νιτρίδιο του πυριτίου.

ABSTRACT

The development of optical biosensors based on transducers made of silicon dioxide or nitride requires the chemical activation of the transducer surface in order to achieve stable, repeatable and homogeneous binding of the biomolecules. The methods most commonly employed for chemical activation of silicon dioxide/nitride surfaces are based on the use of silanes which could carry groups suitable for immobilization of biomolecules by adsorption or covalent attachment. In the present study, the chemical activation of silicon dioxide/nitride surfaces with (3-aminopropyl)-triethoxysilane (APTES) was optimized so as to enable the immobilization of biomolecules by adsorption or covalent bonding. The chemical activation was performed with either aqueous or organic solution of APTES and the surfaces have been used to immobilize protein molecules by physical adsorption or were further modified with glutaraldehyde (which reacts with the amino groups of APTES) to allow covalent binding of protein molecules through reaction with their free amino groups. The protein immobilization capacity of the silicon dioxide/nitride surfaces that have been chemically activated following the different protocols was evaluated through incubation with mouse gamma globulins which were after reaction with a fluorescently labeled goat anti-mouse IgG antibody and of the fluorescence signal inntensity. Various parameters such as the silane concentration, the duration of the incubation with the surface, the concentration of glutaraldehyde solution and the duration of the incubation with the surface, the concentration and incubation time with the mouse gamma globulin solution, etc. have been optimized. It was found that modification with 5% (v/v) APTES solution in absolute ethanol followed by glutaraldehyde reaction provided fluorescence signals 30% higher than all the other protocols tested. In addition, this method provided the lower signal variation between different chips. These results were confirmed by real-time monitoring of reaction between immobilized mouse γ -globulin with the/antibody against mouse IgG as well as through immobilization of an antibody against Creactive protein and performance of a non-competitive immunoassay for the determination of C-reactive protein. For this purpose a white light interference spectroscopy sensor based on silicon die modified with a silicon dioxide film was implemented. Therefore, the proposed method of chemical and biochemical activation is expected to help improve the analytical characteristics of optical sensors relying on signal transducers made of silicon dioxide/nitride.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ПЕРІЛНѰН	5
ABSTRACT	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	9
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	13
1.1 Εισαγωγή	13
1.2 Ορισμός βιοαισθητήρων	15
1.3 Κατηγορίες βιοαισθητήρων ανάλογα με το είδος του μορίου αναγνώρισης	16
1.3.1 Φυσικά μόρια αναγνώρισης	16
1.3.1.1 Ανοσοαισθητήρες	18
1.3.2 Συνθετικά-Βιομιμιτικά μόρια αναγνώρισης	22
1.4 Κατηγορίες βιοαισθητήρων ανάλογα με το είδος του μεταλλάκτη σήματος	24
1.4.1 Ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος	25
1.4.2 Βιοαισθητήρες μάζας	28
1.4.3 Θερμικοί μεταλλάκτες σήματος	30
1.4.4 Οπτικοί Μεταλλάκτες Σήματος	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΟΠΤΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΧΩΡΙΣ ΤΗ ΧΡΗΣΗ	33
$1XNH\Theta E I \Omega N$	22
2.1 Βιοαισθητηρες συντονισμου επιφανειακών πλασμονιών	33
2.2 Συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες	35
2.3 Βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός	36
2.3.1 Βιοαισθητήρας φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΧΗΜΙΚΗ & ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ	43
3.1. Φυσικές μέθοδοι τροποποίησης	44
3.1.1 Φυσική εναπόθεση ατμών	44
3.1.2 Αυτοσυναρμολόγηση υμενίων σε στρώματα	45
3.1.3 Επικάλυψη sol-gel	46
3.1.4 Επικάλυψη με περιστροφή ή ηλεκτροπεριστροφή	47
3.2 Χημικές μέθοδοι τροποποίησης	48

3.2.1 Χημική εναπόθεση ατμών	48
3.2.2 Κατεργασία με πλάσμα	49
3.2.3 Εισαγωγή πολυμερικών αλυσίδων με εμφύτευση	50
3.2.4 Σιλανοποίηση	51
3.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων	54
3.3.1 Εγκλεισμός	57
3.3.2 Προσρόφηση	57
3.3.3 Ομοιοπολική ακινητοποίηση	58
3.3.4 Σύνδεση συγγένειας	60
3.4 Τροποποίηση επιφανειών πυριτίου με (3-αμινοπροπυλο)-τριαιθοξυσιλάνιο	61
(APTES) για πρόσδεση πρωτεϊνικών μορίων	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ	65
ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	
4.1 Μικροσκοπία φθορισμού	65
4.2 Μέθοδοι προσδιορισμού ιδιοτήτων διαβροχής	68
4.3 Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)	70
4.4 Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM)	71
4.5 Φασματοσκοπία εκπομπής ακτίνων Χ	72
4.6 Φασματοσκοπία μάζας χρόνου πτήσης δευτερογενών ιόντων (ToF-SIMS)	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΚΟΠΟΣ	77
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	79
6.1 Καθαρισμός επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου	79
6.2 Υδροφιλοποίηση ψηφίδων πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου	80
6.3 Μέθοδος χημικής τροποποίησης επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του	81
πυριτίου και αισθητήρων με αμινο-σιλάνιο	
6.4 Μέθοδος χημικής τροποποίησης επιφανειών πυριτίου με αμινοσιλάνιο και	83
γλουταραλδεΰδη ως διδραστικό συνδετικό μόριο	
6.5. Ακινητοποίηση βιομορίων στις χημικά τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου	85
6.5.1 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων σε χημικά	85
τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου με φυσική προσρόφηση	

6.5.2 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων σε χημικά	86
τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου με ομοιοπολική σύνδεση	
6.5.3 Ανίχνευση των ακινητοποιημένων στις επιφάνειες πυριτίου γ-σφαιρινών	87
ποντικού με μικροσκοπία φθορισμού	
6.6 Ανίχνευση των ακινητοποιημένων στις επιφάνειες πυριτίου πρωτεϊνών με	90
φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	97
7.1. Βελτιστοποίηση μεθόδου τροποποίησης με ΑΡΤΕS από υδατικό διάλυμα	98
7.1.1. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης APTES	98
7.1.2. Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης της επιφάνειας με το υδατικό	99
διάλυμα APTES	
7.1.3. Βελτιστοποίηση του χρόνου θερμικής κατεργασίας των τροποιημένων με	101
υδατικό διάλυμα APTES επιφανειών	
7.1.4. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης γ-σφαιρινών ποντικού για την	102
επικάλυψη των επιφανειών πυριτίου	
7.1.5. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου επώασης των τροποποιημένων με	103
APTES επιφανειών με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού και χρόνου	
παραμονής των επιφανειών πριν την εναπόθεση του διαλύματος γ-σφαιρινών	
ποντικού	
7.2. Βελτιστοποίηση μεθόδου τροποποίησης με διάλυμα APTES σε αιθανόλη	106
7.2.1. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης APTES	106
7.2.2. Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης της επιφάνειας με το διάλυμα	107
APTES σε αιθανόλη	
7.2.3. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης γ-σφαιρινών ποντικού για την	108
επικάλυψη των επιφανειών πυριτίου	
7.2.4. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου επώασης με το διάλυμα των γ-	109
σφαιρινών ποντικού	
7.3. Βελτιστοποίηση μεθόδου τροποποίησης με ΑΡΤΕS και γλουταραλδεΰδη	110
7.3.1. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης διαλύματος γλουταραλδεΰδης	110
7.3.2. Προσδιορισμός βέλτιστου διαλύματος αραίωσης της γλουταραλδεΰδης	112
7.3.3. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου αντίδρασης με το διάλυμα	113
γλουταραλδεΰδης	

7.3.4. Προσδιορισμός επίδρασης θερμικής κατεργασίας των τροποποιημένων με	114
APTES επιφανειών στην αντίδραση με την γλουταραλδεΰδη	
7.3.5. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης γ-σφαιρινών ποντικού για την	115
επικάλυψη των επιφανειών πυριτίου που έχουν τροποποιηθεί με	
ΑΡΤΕS/γλουταραλδεΰδη	
7.4. Σταθερότητα κατά την γήρανση	117
7.5. Εφαρμογή των βέλτιστων πρωτοκόλλων τροποποίησης επιφανειών	120
διοξειδίου του πυριτίου για την ανάπτυξη οπτικού αισθητήρα	
7.5.1. Ανάπτυξη αισθητήρα που βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης	120
λευκού φωτός για την παρακολούθηση της αντίδρασης γ-σφαιρινών	
ποντικού/αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού	
7.5.2. Ανάπτυξη αισθητήρα που βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης	123
λευκού φωτός για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης	
(CRP)	
7.5.2.1. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης αντισώματος κατά της CRP	123
για ακινητοποίηση στις ψηφίδες	
7.5.2.2. Πρότυπες καμπύλες CRP	124
7.5.2.3. Σταθερότητα ακινητοποιημένου αντισώματος	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	129
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	135

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Βασικός άξονας εξέλιξης της σύγχρονης κοινωνίας είναι η ανάπτυξη της τεχνολογίας. Επιστημονικοί τομείς όπως αυτοί της ηλεκτρονικής και της μηχανικής έχουν συμβάλλει δεόντως προς την εξέλιξη αυτή μέσω της κατασκευής μικροδιατάξεων όπως οι αισθητήρες.

Η λέξη "sensor" (αισθητήρας) προέρχεται από τη λατινική λέξη sentire, η οποία σημαίνει "αισθάνομαι". Ένας αισθητήρας αποκρίνεται σε μια φυσική ή χημική διέγερση, όπως θερμότητα, φως, ήχο, πίεση, μαγνητισμό, ή χημική αντίδραση, και την μεταδίδει μετατρέποντάς την σε κάποιου είδους ηλεκτρικό σήμα. Στην ουσία δηλαδή ένας αισθητήρας είναι ένας μετατροπέας σήματος. Πρωτοπόροι στη σύλληψη της έννοιας των αισθητήρων υπήρξαν οι Clark και Lyons, οι οποίοι σε μια δημοσίευσή τους το 1962¹ παρουσίασαν ένα "ενζυμικό ηλεκτρόδιο" αποτελούμενο από ένα ένζυμο ακινητοποιημένο σε έναν ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη, ο οποίος μπορούσε να προσδιορίσει ποσοτικά το υπόστρωμα του ενζύμου μέσω προσδιορισμού του παραγόμενου οξυγόνου. Ύστερα από την πρώτη αυτή εργασία, υπήρξε ραγδαία εξέλιξη στον τομέα των αισθητήρων με αποτέλεσμα, στο πέρασμα των χρόνων, να αναπτυχθούν πολλές διαφορετικές τεχνολογίες ανίχνευσης και μεταγωγής του σήματος. Πλέον υπάρχουν ποικίλοι μεταλλάκτες σήματος σε συνδυασμό με μόρια αναγνώρισης που μπορεί να είναι είτε βιολογικής προέλευσης ή συνθετικά. Στον πίνακα 1 αναφέρονται κάποια από τα ορόσημα στην ιστορία εξέλιξης των βιοαισθητήρων.

Παρότι το έναυσμα για την ανάπτυξη των βιοαισθητήρων ήταν η κάλυψη των αναγκών της ιατρικής διάγνωσης και κυρίως της ταχείας ανάλυσης κλινικών δειγμάτων ώστε να παρέχεται άμεση περίθαλψη στον ασθενή (point-of-care detection), οι βιοαισθητήρες αξιοποιούνται σήμερα επιτυχώς σε ποικίλους τομείς, όπως ο έλεγχος των τροφίμων, η προστασία του περιβάλλοντος και η βιομηχανική παραγωγή. Έτσι ενώ αρχικά οι βιοαισθητήρες εφαρμόστηκαν για την ανάλυση υγρών δειγμάτων υδατικής σύστασης, πλέον έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες για την ανάλυση αερίων δειγμάτων αλλά και δειγμάτων σε οργανικούς διαλύτες. Τα αυξανόμενα περιβαλλοντικά προβλήματα και ο σύγχρονος τρόπος ζωής επιτάσσουν σήμερα περισσότερο από ποτέ την ανάγκη για περισσότερο εύχρηστες περιβαλλοντικά φιλικές και σχετικά οικονομικές τεχνολογίες, οι οποίες θα διευκολύνουν την ανάλυση δειγμάτων στο πεδίο ("on-site" ανάλυση), περιορίζοντας έτσι τον αριθμό των δειγμάτων που θα αποστέλλεται για ανάλυση στο εργαστήριο, και θα συνδυάζουν το χαμηλό κόστος εξοπλισμού και αναλώσιμων, την ταχύτητα ανάλυσης και την φορητότητα του εξοπλισμού με την υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία της ανάλυσης. Αυτή την ανάγκη για απλούστερα αλλά εξίσου αξιόπιστα συστήματα ανάλυσης καλούνται να καλύψουν σε μεγάλο βαθμό οι βιοαισθητήρες οι οποίοι εκμεταλλεύονται τις εξελίξεις στον τομέα της μικροηλεκτρονικής για την κατασκευή διατάξεων μικρού μεγέθους και αυξημένης ευαισθησίας ανίχνευσης.

Έτος	Γεγονός	
1956	Ηλεκτρόδιο οξυγόνου από τους Clark και Lyons	
1962	Αμπερομετρικός αισθητήρας για την μέτρηση της γλυκόζης	
1969	Ποτενσιομετρικός αισθητήρας για ανίχνευση ουρίας	
1970	Ανάπτυξη αισθητήρα που βασίζεται σε ιοντοεπιλεκτικό τρανζίστορ επίδρασης πεδίου (ion-selective field-effect transistor)	
1972/1975	Πρώτος εμπορικά διαθέσιμος βιοαισθητήρας γλυκόζης	
1980	Αισθητήρας pH για in vivo μετρήσεις αερίων του αίματος	
1982	Οπτικός βιοαισθητήρας γλυκόζης βασιζόμενος με οπτικές ίνες	
1983	Πρώτος ανοσοαισθητήρας συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR)	
1984	Αμπερομετρικός αισθητήρας για την ανίχνευση γλυκόζης	
1987	Αποδοχή των βιοαισθητήρας προσδιορισμού γλυκόζης αίματος από την American Diabetic Association	
1990	Εμπορικά διαθέσιμος βιοαισθητήρας της εταιρείας Pharmacia Biacore που βασίζεται στο φαινόμενο SPR	
1992	Φορητός ηλεκτροχημικός αναλυτής αίματος i-STAT	
1995/1998	Φορητοί βιοαισθητήρες γλυκόζης για χρήση στο σπίτι	
1999/2019	Αισθητήρες που βασίζονται σε νανοϋλικά (π.χ., κβαντικές κουκίδες)	

Πίνακας	1.	Ορόσημα	εζέλιζης	των	βιοαιά	σθητήρωι	v^2
11110000	••	opoonpoo	050115115		proone		r .

1.2 Ορισμός βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές διατάξεις οι οποίες χρησιμοποιούν ως μόριο αναγνώρισης ένα βιολογικό μόριο ή ένα βιομιμητικό υλικό σε επαφή με ένα φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος για τον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης ουσίας ή ουσιών σε ένα δείγμα (Σχήμα 1)³. Στόχος είναι η αλληλεπίδραση της ουσίας που προσδιορίζεται με το μόριο αναγνώρισης να οδηγήσει στην παραγωγή ενός ψηφιακού ηλεκτρονικού σήματος (Σχήμα 1), το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της προς ανάλυση ουσίας στο δείγμα. Η προσέγγιση που συνήθως ακολουθείται κατά την ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα για την ανίχνευση ή τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ουσίας είναι καταρχάς η επιλογή ενός μορίου αναγνώρισης που έχει την απαιτούμενη συγγένεια και εκλεκτικότητα για την ουσία αυτή.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας των βιοαισθητήρων.

Το σήμα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταβολής της συγκέντρωσης των πρωτονίων, της πρόσληψης ή απελευθέρωσης αερίων όπως το οξυγόνο, της εκπομπής, ανάκλασης ή απορρόφησης φωτός, της εκπομπής θερμότητας ή άλλων φυσικοχημικών μεταβολών που απορρέουν από την αλληλεπίδραση των μορίων αναγνώρισης με την προς ανάλυση ουσία.

Ως εκ τούτου βιοαισθητήρες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το είδος του μορίου αναγνώρισης και του μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται.

1.3 Κατηγορίες βιοαισθητήρων ανάλογα με το είδος του μορίου αναγνώρισης

1.3.1 Φυσικά μόρια αναγνώρισης

Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα από φυσικά μόρια που προέρχονται από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μόρια αναγνώρισης σε βιοαισθητήρες. Αυτά τα μόρια μπορούν να καταταγούν σε δύο κύριες ομάδες:

1. τη βιοκαταλυτική ομάδα που περιλαμβάνει ένζυμα, ολόκληρα κύτταρα, μιτοχόνδρια, ιστούς, κ.α., και

2. την ομάδα αντίδρασης συγγένειας που περιλαμβάνει νουκλεϊκά οξέα, αντισώματα, κυτταρικούς υποδοχείς, λεκτίνες, κ.α.⁴

Σε όλες τις περιπτώσεις, ο βιοαισθητήρας αξιοποιεί τη δυνατότητα εκλεκτικής σύνδεσης που έχουν τα μόρια αυτά για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα ή μόριο. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μόρια αναγνώρισης και οι αντίστοιχες ουσίες προς ανάλυση.^{5,6}

Μόριο αναγνώρισης	Προσδιοριζόμενες ουσίες
Ένζυμο	υποστρώματα, αναστολείς, συμπαράγοντες, χημικά
	σύμπλοκα μετάλλων
Αντίσωμα	αντιγόνα, ιοί, κύτταρα
Νουκλεϊκό οξύ	συμπληρωματικές αλληλουχίες βάσεων νουκλεϊκού
	οξέος, πολυμεράσες, ιστόνες, πρωτεΐνες σύνδεσης
Κύτταρο	κυτταρικές επιφανειακές πρωτεΐνες, λεκτίνες, μικρά
	μόρια που δεσμεύονται σε κυτταρικούς υποδοχείς,
	πεπτίδια
Πρωτεΐνες μεταφοράς	ορμόνες, βιταμίνες

Πίνακας 2. Συχνότερα ζεύγη βιολογικών μορίων αναγνώρισης-αναλυτώ v^7

Στους καταλυτικούς αισθητήρες, η παράμετρος που ανιχνεύεται είναι η αλλαγή στη συγκέντρωση ενός συστατικού η οποία προκύπτει από μία καταλυτική αντίδραση. Τα

βιομόρια αναγνώρισης που κατεξοχήν χρησιμοποιούνται στους καταλυτικούς αισθητήρες είναι ένζυμα λόγω της ειδικότητας που παρουσιάζουν ως προς το υπόστρωμα και του μικρού χρόνου αντίδρασης (ενζυμικοί βιοαισθητήρες).⁸ Από την δημιουργία του πρώτου ενζυμικού βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της γλυκόζης ο οποίος βασιζόταν στην ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης πάνω σε ένα ηλεκτρόδιο ανίχνευσης οξυγόνου, έχει σημειωθεί μεγάλη εξέλιξη στις εφαρμογές των ενζυμικών βιοαισθητήρων που αφορούν σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων αλλά και των μεταλλακτών σήματος. Πολλά ένζυμα που ανήκουν στις οξειδοαναγωγάσες, υδρολάσες και λυάσες έχουν ακινητοποιηθεί σε διάφορους μεταλλάκτες με στόχο τη δημιουργία βιοαισθητήρων για εφαρμογές στην ιατρική, την κτηνιατρική, τη βιομηχανία τροφίμων, την περιβαλλοντική μελέτη και την άμυνα. Η πιο σημαντική ομάδα είναι οι οξειδοαναγωγάσες οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης ή αναγωγής, χρησιμοποιώντας είτε το οξυγόνο είτε συμπαράγοντες ως δότες/δέκτες ηλεκτρονίων. Εκτός από την χρήση τους ως βιομόρια αναγνώρισης, τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιφυατισώματα ως ιχυηθέτες σε βιοαιθητήρες συγγενείας.

Στους αισθητήρες συγγένειας καταγράφεται το γεγονός της σύνδεσης της προσδιοριζόμενης ουσίας με το ακινητοποιημένο στον μεταλλάκτη βιομόριο αναγνώρισης. Έτσι αντιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε αισθητήρες συγγενείας για τον προσδιορισμό είτε του αντιγόνου είτε του αντισώματος. Επιπλέον αυτών, άλλα βιομόρια, όπως είναι οι υποδοχείς κυττάρων, αλληλουχίες μονής έλικας DNA (που θα συνδεθεί και θα ανιχνεύσει τη συμπληρωματική της αλληλουχία) και λεκτίνες (πρωτεΐνες φυτών που χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση υδρογονανθράκων) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βιομόρια αναγνώρισης για τον προσδιορισμό συμπληρωματικών βιομορίων. Επίσης ολόκληρα κύτταρα ζώντων οργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, φυτικά και ζωικά κύτταρα ή ακόμη και ιστοί έχουν χρησιμοποιηθεί ως «μόρια» αναγνώρισης σε βιοαισθητήρες. Στην περίπτωση αυτή η αλληλεπίδραση με την προσδιοριζόμενη ουσία προκαλεί μια μεταβολή της γενικής μεταβολικής κατάστασης των κυττάρων η οποία ποσοτικοποιείται μέσω της ανίχνευσης της κατανάλωσης του οξυγόνου, της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα ή μεταβολιτών, του φθορισμού των βακτηρίων ή της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά μήκος της οξειδοαναγωγικής αλυσίδας των κυττάρων. Επίσης αισθητήρες κύτταρων ή μικροβίων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση τοξικών ή ρυπογόνων ουσιών μέσω της επίδρασής των ουσιών αυτών στα κύτταρα. Οι αισθητήρες αυτοί παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ότι καταγράφουν άμεσα τις βιολογικές επιδράσεις τοξικών ή ρυπογόνων ουσιών αντί να παρέχουν απλώς και μόνο μία χημική ανάλυση.^{9,10}

Μια από τις πολυπληθέστερες κατηγορίες βιοαισθητήρων είναι οι αισθητήρες ολιγονουκλεοτιδίων ή γονιδίων (genosensors). Οι περισσότερες εφαρμογές των αισθητήρων αυτών βασίζονται στην ανίχνευση μιας συγκεκριμένης γονιδιακής αλληλουχίας μέσω της αντίδρασης υβριδισμού ενός μονόκλωνου μορίου DNA-ανιχνευτή με το συμπληρωματικό DNA-στόχο. Η αναγνώριση βασίζεται στους δεσμούς υδρογόνου και στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συμπληρωματικών αλληλουχιών DNA για τον σχηματισμό μιας σταθερής δομή διπλής έλικας. Έτσι μέσω της ακινητοποίησης μιας μικρής αλληλουχίας 20-40 βάσεων ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου είναι δυνατόν να ανιχνευτεί η συμπληρωματική αλληλουχία σε ένα άγνωστο δείγμα DNA. Οι βιοαισθητήρες ολιγονουκλεοτιδίων έχουν αξιοποιηθεί στην έγκαιρη και γρήγορη διάγνωση λοιμωδών (π.χ., στην ανίχνευση ιού HIV) και κληρονομικών ασθενειών (π.χ., κυστική ίνωση, αχονδροπλασία, κ.α.) αλλά και για την ανίχνευση ουσιών που παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα και σχηματίζουν σύμπλοκα με τις βάσεις του DNA (π.χ., συμπλόκων, αντιβιοτικών, κλπ.).

Τέλος, οι διάφορες κατηγορίες των βιομορίων αναγνώρισης μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμούς προκειμένου να παράσχουν νέες ή βελτιωμένες αναλυτικές δυνατότητες. Στο υποκεφάλαιο που ακολουθεί γίνεται μια πιο εκτεταμένη αναφορά στους ανοσοαισθητήρες οι οποίοι αποτελούν και το είδος του βιοαισθητήρα που διερευνήθηκε στην παρούσα εργασία.^{11,12}

1.3.1.1 Ανοσοαισθητήρες

Ανοσοαισθητήρες χαρακτηρίζονται οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος για τον προσδιορισμό ουσιών σε βιολογικά ή άλλα δείγματα. Οι ανοσοαισθητήρες αποτελούν ειδική κατηγορία των ανοσοχημικών μεθόδων ανάλυσης δηλαδή των αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται σε αντισώματα ή συναφή αντιδραστήρια για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών. Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν στην τάξη των γ-σφαιρινών και ως εκ τούτου ονομάζονται και ανοσοσφαιρίνες. Παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα και εκκρίνονται στο αίμα ως μέρος της ανοσολογικής απόκρισης ενός οργανισμού στην παρουσία ενός ξένου παράγοντα, του ανοσοσγόνου. Τα ανοσογόνα είναι ουσίες οι οποίες όταν εισέλθουν στον οργανισμό προκαλούν τη παραγωγή των αντισωμάτων και αντιδρούν ειδικά με αυτά. Ουσίες που μπορούν να συνδεθούν με αντισώματα αλλά δεν προκαλούν κατά ανάγκη ανοσολογική απόκριση ονομάζονται αντιγόνα. Η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος είναι πολύ ισχυρή καθώς οφείλεται στη συνεργική δράση μεγάλου αριθμού μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (δυνάμεις Coulomb, δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις Van der Waals) ενώ εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση καθώς για κάθε αντιγόνο μπορεί να παραχθεί ένα διαφορετικό ειδικό αντίσωμα.^{13,14}

Η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος αξιοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1958 από τους Yalow και Berson οι οποίοι παρουσίασαν έναν μια ανοσοχημική μέθοδο για τον προσδιορισμό της ινσουλίνης σε πλάσμα αίματος.¹⁵ Η καινοτομία αυτή υιοθετήθηκε ευρέως για την ανάπτυξη ανοσοπροσδιορισμών ανταγωνιστικού τύπου, οι οποίοι βασίζονται στον έμμεσο προσδιορισμό των θέσεων δέσμευσης του αντισώματος που κατέλαβε ο αναλύτης (αντιγόνο) προσδιορίζοντας τις θέσεις δέσμευσης που καταλήφθηκαν από τον ιχνηθέττη^{16,17}. Οι ιχνηθέτες είναι ανάλογα του αναλύτη σημασμένα με ραδιοϊσότοπα, ένζυμα, φθορίζοντα, ηλεκτρενεργά, χημειοφωταυγή ή βιοφωταυγή μόρια.¹⁶

Οι Catt και Tregear εισήγαγαν το 1967 τις τεχνικές διαχωρισμού στερεάς φάσης βάσει των οποίων το αντιγόνο ή το αντίσωμα προσδένεται πάνω σε στερεό φορέα με αποτέλεσμα τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού να είναι συνεχώς ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του φορέα και να διαχωρίζονται εύκολα από τις ελεύθερες μορφές των αντιδραστηρίων οι οποίες παραμένουν στο διάλυμα.¹⁸ Η εξέλιξη αυτή έδωσε ώθηση στις ανοσοχημικές τεχνικές καθώς μπορούσαν πλέον να εφαρμοστούν για οποιοδήποτε ζεύγος αντιγόνου-αντισώματος, εμφάνισαν χαμηλότερη μη ειδική δέσμευση, απλοποιημένες διαδικασίες διαχωρισμού, αυξημένες δυνατότητες αυτοματοποίησης και αναπτύχθηκαν νέοι τύποι ανοσοπροσδιορισμών όπως οι μη ανταγωνιστικού τύπου.¹⁴ Στους μη ανταγωνιστικούς ανοσοπροσδιορισμούς χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα ακινητοποίησης και ένα αντίσωμα ανίχνευσης (ιχνηθέτης) τα οποία αναγνωρίζουν και συνδέονται σε διαφορετικούς επιτόπους του αναλύτη. Ο αναλύτης προσδένεται στο αντίσωμα δέσμευσης και ταυτόχρονα ή σε επόμενο στάδιο προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ένα σύμπλεγμα τύπου "sandwich" (Εικόνα 2i). Ο άμεσος αυτός προσδιορισμός είναι κατάλληλος κυρίως για μεγάλου μοριακού βάρους αναλύτες που μπορεί να έχουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς επίτοπους ενώ οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης σε σχέση με τον ανταγωνιστικό όταν όλοι οι εμπλεκόμενοι παράγοντες (αντίσωμα, μόριο σήμανσης, κ.α.) είναι οι ίδιοι και στους δύο τύπους ανοσοπροσδιορισμού.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών διαμορφώσεων ανοσοχημικών προσδιορισμών στερεάς φάσης μη ανταγωνιστικού τύπου.

Στους ανοσοπροσδριορισμούς ανταγωνιστικού τύπου (Εικόνα 3i), λαμβάνει γώρα ανταγωνισμός μεταξύ του ακινητοποιημένου στον στερεό φορέα αναλύτη (αντιγόνου) και του αναλύτη υγρής φάσης για τη δέσμευσή τους σε περιορισμένο αριθμό θέσεων του ειδικού αντισώματος. Το ακινητοποιημένο στον στερεό φορέα αντιγόνο μπορεί να είναι ο ίδιος ο αναλύτης ή κάποιο ανάλογο αυτού (π.χ., πεπτίδιο στην περίπτωση πρωτεϊνικών μορίων ή πρωτεϊνικό σύζευγμα στην περίπτωση αναλυτών μικρού μοριακού βάρους). Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται είτε απευθείας επισημασμένο ειδικό αντίσωμα ή επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα, το οποίο έχει αναπτυχθεί έναντι των ανοσοσφαιρινών του ζώου στο οποίο έχει αναπτυχθεί το ειδικό αντίσωμα. Με τον τρόπο αυτόν προσδιορίζεται η ποσότητα του αντισώματος που δεσμεύτηκε στον αναλύτη της στερεάς φάσης, η οποία λόγω του ανταγωνισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα. Με άλλα λόγια, το αναλυτικό σήμα που καταγράφεται είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα. Εναλλακτικά μπορεί να ακινητοποιηθεί το ειδικό αντίσωμα στον στερεό φορέα και να χρησιμοποιηθεί ως ιχνηθέτης επισημασμένο ανάλογο του αναλύτη, το οποίο ανταγωνίζεται με τον αναλύτη στο δείγμα για τις θέσεις δέσμευσης του αντισώματος στερεάς φάσης (Εικόνα 3ii). Και σε αυτή την περίπτωση, το μετρούμενο σήμα είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών διαμορφώσεων ανοσοχημικών προσδιορισμών στερεάς φάσης ανταγωνιστικού τύπου.

Τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν οι ανοσοπροσδιορισμοί σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές είναι η εξαιρετική ευαισθησία και εξειδίκευση οι οποίες εκπορεύονται από την ειδικότητα της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος¹⁴. Η αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου είναι γενικά μη αναστρέψιμη και μπορεί να αντιστραφεί μόνο μέσω κατεργασίας με όξινα, αλκαλικά ή γαοτροπικά διαλύματα. Τα γαρακτηριστικά αυτά έχουν μεγάλη σημασία στην ανάλυση βιολογικών υγρών (ορός, πλάσμα, ούρα, κ.α.) λόγω της πολυπλοκότητας και της περιορισμένης ποσότητας των δειγμάτων ή της μικρής συγκέντρωσης (ppm ή ppb) των προσδιοριζόμενων ουσιών και στάθηκαν ικανά να καθιερώσουν τους ανοσοπροσδιορισμούς ως μεθόδους επιλογής τόσο στον τομέα των βιοϊατρικών επιστημών (διάγνωση λοιμώξεων και ποικίλων παθολογικών καταστάσεων, διάγνωση καρκίνου και καθορισμός θεραπείας, εκτίμηση αποτελεσματικότητας θεραπευτικής μεθόδου, ανίχνευση επιπέδων φαρμάκων, ανίχνευση ιών και βακτηρίων, κτηνιατρική διάγνωση, κ.α.) αλλά και σε τομείς όπως το περιβάλλον, τα τρόφιμα, η γεωργία, η βιομηχανία, ο αθλητισμός αλλά και στρατιωτικές εφαρμογές. ¹⁹ Παράλληλα ιδιαίτερα διαδεδομένη είναι η χρήση αντισωμάτων ή αντιγόνων ως βιομορίων αναγνώρισης σε ποικίλους μεταλλάκτες σήματος για την ανάπτυξη ανοσοαισθητήρων.

Οι ανοσοαισθητήρες ταξινομούνται με βάση:

1. τη χρήση ή μη ιχνηθέτη,

2. τον τύπο του ανοσοπροσδιορισμού,

- 3. το υλικό κατασκευής του στερεού φορέα,
- 4. τη χημεία πρόσδεσης του βιομορίου αναγνώρισης στο στερεό φορέα,
- 5. τη φυσικοχημική παράμετρο που παρακολουθείται.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ανοσοαισθητήρων είναι εκτός από την εκλεκτικότητα η ταχύτητα της ανάλυσης, η ευαισθησία της ανίχνευσης, αλλά και το γεγονός ότι απαιτούν μικρούς όγκους δειγμάτων. Στην ευρεία εφαρμογή των ανοσοαισθητήρων συνηγορούν οι βελτιώσεις που έχουν γίνει όσον αφορά την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων και η τεράστια πρόοδος στον τομέα των μονοκλωνικών αντισωμάτων και της παραγωγής ανασυνδυασμένων αντισωμάτων. Η χρησιμοποίηση τμημάτων των αντισωμάτων και μοριακά σχεδιασμένων αντισωμάτων είναι ένα από τα πεδία μελλοντικής ανάπτυξης για τους ανοσοαισθητήρες. Η νέα ερευνητική προσέγγιση είναι να εκφραστούν γονίδια που κωδικοποιούν αντισώματα ζώων σε βακτήρια ή φυτά ώστε να προκύψουν μόρια με βελτιωμένα χαρακτηριστικά από άμεση ή συνδυασμένη μεταλλαξιογένεση.²⁰

Παρά την υψηλή σταθερά συγγένειας και την εκλεκτικότητα των φυσικών ή ανασυνδυασμένων αντισωμάτων, το κύριο μειονέκτημα της χρησιμοποίησης βιολογικών μορίων ως μορίων αναγνώρισης σε βιοαισθητήρες είναι η μειωμένη σταθερότητα τους, η οποία συχνά αποτρέπει την ευρύτερη εμπορική τους χρήση. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα έχει προταθεί η αντικατάστασή τους με συνθετικά ή βιομιμιτικά μόρια αναγνώρισης, τα οποία αναλύονται στο επόμενο υποκεφάλαιο.

1.3.2 Συνθετικά/βιομιμιτικά μόρια αναγνώρισης

Η σύνθεση με τη χρήση υπολογιστικής μοντελοποίησης (computer modeling) μορίων π.χ., πεπτιδίων ή ολιγονουκλεοτίδιων που μπορούν να δεσμεύουν μόρια διαφορετικά από τα τυπικά συμπληρωματικά τους μόρια, η συνδυαστική χημεία και η ανάπτυξη των τεχνικών μοριακής αποτύπωσης πολυμερών (molecularly imprinted polymers) έχουν αυξήσει σημαντικά την ποικιλία των «μορίων αναγνώρισης ή δεσμευτών» που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους βιοαισθητήρες. Η μοριακή μοντελοποίηση (molecular modeling) είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της μοριακής αναγνώρισης, δηλαδή της ειδικής αλληλεπίδρασης του προς ανάλυση μορίου με τον δεσμεύτη. Οι αντιδράσεις συγγένειας μεταξύ συνθετικών δεσμευτών με τα προς ανάλυση μόρια περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις Van Der Waals και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η υπολογιστική μοντελοποίηση λαμβάνει υπόψη της τη δομή και τις επιμέρους ομάδες και πιθανές αλληλεπιδράσεις από τη μεριά της προς ανάλυση ουσίας για να σχεδιάσει κατάλληλους συνθετικούς δεσμεύτες, οι οποίοι αναμένεται να συνδεθούν ισχυρά με το προς ανάλυση μόριο.²¹

Η συνδυαστική χημεία (combinatorial chemistry), η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία φαρμάκων, έχει επίσης εφαρμοστεί για την ανάπτυξη συνθετικών δεσμευτών. Οι βιβλιοθήκες ανασυνδυασμού αποτελούνται από μια σειρά διαφορετικών μορίων που δημιουργούνται από τη συστηματική και επαναλαμβανόμενη ομοιοπολική σύνδεση μιας ομάδας διαφορετικών δομικών στοιχείων. Ο αριθμός των πιθανών συστατικών (n) που δημιουργείται από μία βιβλιοθήκη, μπορεί να βρεθεί με την παρακάτω σχέση:

$n = b^x$

όπου b: ο αριθμός των δομικών στοιχείων σε κάθε βήμα και x: ο αριθμός των συνθετικών βημάτων

Με τη χρήση των τεχνικών της συνδυαστικής χημείας έχει καταβληθεί προσπάθεια τα τελευταία χρόνια να αναπτυχθούν πεπτιδικές και μη πεπτιδικές βιβλιοθηκές αποσκοπώντας στην δημιουργία σε σύντομο χρονικό διάστημα ενός μεγάλου αριθμού μορίων, γεγονός σχεδόν αδύνατο στην περίπτωση χρήσης μεθόδων κλασικής οργανικής σύνθεσης. Επιπλέον, η συνδυαστική χημεία έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη μοριακή μοντελοποίηση προκειμένου να δημιουργηθεί μια νέα γενιά δεσμευτών συγγένειας, κυρίως πεπτιδικές και νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (απταμερή), οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διατάξεις βιοαισθητήρων για την ειδική δέσμευση συνήθως μορίων μικρού μοριακού βάρους αλλά και πρωτεϊνών.²²

Μια άλλη τεχνική για την κατασκευή συνθετικών δεσμευτών είναι η μοριακή αποτύπωση των πολυμερών (molecular imprinting polymerization), η οποία αποτελεί αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος τα τελευταία 20 χρόνια και έχει χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως είναι η προετοιμασία υλικών εκλεκτικού διαχωρισμού, συνθετικών αντισωμάτων, συνθετικών ενζύμων καθώς και η μοριακή αναγνώριση. Η μοριακή αποτύπωση (molecular imprinting) βασίζεται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στο προς ανάλυση μόριο και το μονομερές το οποίο χρησιμοποιείται για την σύνθεση του πολυμερούς. Μετά τη διαδικασία πολυμερισμού, ο αναλύτης απομακρύνεται από το πολυμερές αφήνοντας κενές θέσεις στις οποίες μπορεί να συνδεθεί κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ο αναλύτης που υπάρχει στο δείγμα. Αυτή η συμμετοχή του πρότυπου μορίου πριν και κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, προκειμένου να σχηματιστούν οι θέσεις συμπληρωματικής σύνδεσης, αποτελεί την κεντρική ιδέα της μοριακής αποτύπωσης.

Παρότι η ερευνητική δραστηριότητα στον τομέα της ανάπτυξης συνθετικών δεσμευτών είναι πολύ έντονη τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη κατάλληλων δεσμευτών για πολλές κατηγορίες μορίων παραμένει μία σημαντική πρόκληση. Η πρόκληση είναι να παραχθούν δεσμεύτες που ανταγωνίζονται τα φυσικά μόρια σε ευαισθησία, ειδικότητα και σταθερότητα δέσμευσης, κάτι που δεν έχει επιτευχθεί ακόμα.²³

1.4 Κατηγορίες βιοαισθητήρων ανάλογα με το είδος του μεταλλάκτη σήματος

Ο μεταλλάκτης σήματος ενός βιοαισθητήρα είναι εκείνο το τμήμα που μετατρέπει μία ειδική μοριακή αλληλεπίδραση σε ποσοτικό σήμα. Οι μεταλλάκτες πρέπει να είναι κατάλληλοι για ακινητοποίηση των μορίων αναγνώρισης στην επιφάνεια τους ή κοντά σε αυτήν. Ορισμένοι από τους μεταλλάκτες σήματος που έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή βιοαισθητήρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.^{24,25}

Μεταλλάκτης σήματος	Μετρούμενο σήμα		
Ηλεκτροχημικοί			
Αμπερομετρικοί	Εφαρμοζόμενο ρεύμα		
Ποτενσιομετρικοί	Δυναμικό		
Αγωγιμομετρικοί/Εμπέδησης	Αγωγιμότητα/Εμπέδηση		
Οπτικοί			
Χρωματομετρικοί	Χρώμα		
Φωταύγειας	Ένταση ακτινοβολίας		
Φθορισμού	Ένταση ακτινοβολίας		
Θερμικοί			
Θερμίστορες	Θερμοκρασία		
Μάζας			
Πιεζοηλεκτρικοί	Μάζα		
Επιφανειακών ακουστικών κυμάτων	Ακουστικό σήμα		

Πίνακας 3. Συνηθέστεροι τύποι μεταλλακτών σήματος και το αντίστοιχο φυσικό μέγεθος που μετράται

Στα υποκεφάλαια που ακολουθούν περιγράφονται οι αρχές λειτουργίας των διαφόρων τύπων μεταλλακτών.

1.4.1 Ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος

Οι ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος βασίζονται στις φυσικοχημικές αρχές που διέπουν τις κλασσικές ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης. Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης περιλαμβάνουν μία μεγάλη ποικιλία μεθόδων, καθεμία από τις οποίες βασίζεται σε ένα ιδιαίτερο φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο. Το πειραματικό ηλεκτροχημικό σύστημα αποτελείται από τον ηλεκτρολύτη, που άγει το ρεύμα, τα ηλεκτρόδια καθώς και από το κύκλωμα μετρήσεως ή το εξωτερικό κύκλωμα το οποίο χρησιμοποιείται για την εφαρμογή και μέτρηση των ηλεκτρικών σημάτων. Τα ηλεκτρικά μεγέθη που μετρώνται περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, ένταση ρεύματος, δυναμικό, αντίσταση (αγωγιμότητα), μόνα τους ή σε συνδυασμούς, και με βάση τα μετρούμενα σήματα επιτελείται ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση. Γενικά σε μία ηλεκτροχημική ανάλυση, είτε καθορίζεται η σχέση μεταξύ του μεγέθους του ηλεκτρικού σήματος και της συγκέντρωσης της προς ανάλυση ουσίας είτε το ηλεκτρικό σήμα χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του τελικού σημείου μίας τιτλοδότησης, είτε το ηλεκτρικό ρεύμα μετατρέπει την προσδιοριζόμενη χημική ουσία σε μία καθορισμένη μορφή που προσδιορίζεται είτε σταθμικά είτε από την ποσότητα του ηλεκτρικού φορτίου που καταναλώθηκε. Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από ευρύτατη περιοχή ευαισθησίας (mg - ng) και ακρίβειας (0,1 - 10%), και από μικρό σχετικά κόστος των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών οργάνων.^{26,27}

Οι κυριότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές αναλύσεως παρέχονται στον Πίνακα 4. Κάθε τεχνική απαιτεί τον άμεσο έλεγχο τουλάχιστον μίας από τις τρεις βασικές παραμέτρους: ένταση ρεύματος Ι, δυναμικό Ε, χρόνος t-.

Πίνακας 4. Οι κυριότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές αναλύσεως

Τεχνική	Ελεγχόμενη ηλεκτρική παράμετρος	Μετρούμενη φυσική ιδιότητα	
Ποτενσιομετρία	i = 0	E	
Ποτενσιομετρική ογκομέτρηση	i = 0	Ε σε συνάρτηση με το V	
Χρονοποτενσιομετρία	Ι	Ε σε συνάρτηση με το t	
Βολταμετρία	Е	ί σε συνάρτηση με το Ε	
Αναδιαλυτική βολταμετρία	Е	ί σε συνάρτηση με το Ε	
Πολαρογραφία	Е	ί σε συνάρτηση με το Ε	
Αμπερομετρική ογκομέτρηση	Е	ί σε συνάρτηση με το Ε	
Κουλομετρία	Εήi	Ποσότητα ηλεκτρισμού	
Κουλομετρική ογκομέτρηση	i	t	
Ηλεκτροσταθμική ανάλυση	Εήi	Βάρος αποτιθέμενης ουσίας	
Αγωγιμομετρία	E (AC)	1/R	
Αγωγιμετρική ογκομέτρηση	E (AC)	1/R σε συνάρτηση με το V	

i=ένταση ρεύματος, Ε = τάση, V = όγκος τι
τλοδότη, t = χρόνος, AC = εναλλασόμενο ρεύμα, 1/R = αγωγιμότητα

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, συνήθως, καταγράφουν το ρεύμα κατά την εφαρμογή ενός σταθερού δυναμικού (αμπερομετρία), το δυναμικό σε μηδενικό ρεύμα (ποτενσιομετρία), την αγωγιμότητα ή αλλαγές στην αντίσταση. Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες παρακολουθούν τα φαρανταιϊκά ρεύματα τα οποία προκύπτουν όταν λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του βιολογικού συστήματος και του ηλεκτροδίου στο οποίο εφαρμόζεται ένα κατάλληλο σταθερό δυναμικό. Πρόκειται για τον πρώτο τύπο ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων γλυκόζης σε ανθρώπινο αίμα. Αυτές οι διατάξεις συνεχίζουν να είναι οι πιο δημοφιλείς κυρίως λόγω της απλότητας στη χρήση, της ευκολίας στην κατασκευή και του χαμηλού κόστους τους. Το σήμα στις αμπερομετρικές συσκευές εξαρτάται από το ρυθμό μεταφοράς της μάζας του αναλύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα καταγράφουν τη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας μέσω της μέτρησης της πτώσης της πίεσης του οξυγόνου, της παραγωγής υπεροξειδίου του

υδρογόνου (H₂O₂) ή της παρακολούθησης της αντίδρασης επαναοξείδωσης ενός ενδιάμεσου μορίου (mediator) (Εικόνα 4).^{24,28}



Εικόνα 4: Λειτουργία ηλεκτροχημικών ανοσοαισθητήρων. (Α) Χρήση ενός ενζύμου (υπεροζειδάση της ραπανίδος-HRP) ως ιχνηθέτη. (Β) Καταλυτική σύνδεση με δεύτερο ένζυμο (οζειδάσης της γλυκόζης-GOD).

Οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε εκλεκτικές σε ιόντα μεμβράνες οι οποίες όταν έρχονται σε επαφή με το διάλυμα της προς ανάλυση ουσίας, μεταβάλλουν την πυκνότητα φορτίου στη διεπιφάνεια και η μεταβολή αυτή έχει ως συνέπεια τη μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης. Ο ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας λειτουργεί σε συνθήκες ρεύματος κοντά στο μηδέν και μετρά τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Μια χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μπορεί να αλλάξει το δυναμικό επιφανείας και, συνεπώς, να επηρεάσει το ρεύμα επιτρέποντας την καταγραφή του ρυθμού της αντίδρασης.²⁹ Το πιο γνωστό παράδειγμα ιοντοεκλεκτικού ηλεκτροδίου είναι το ηλεκτρόδιο μέτρησης του pH ενός διαλύματος. Η ειδικότητα των ηλεκτροδίων αυτών παρέχεται από τις εκλεκτικές σε ιόντα μεμβράνες, οι οποίες αποτελούνται από άλατα μετάλλων ή πολυμερή που περιέχουν ιοντοανταλλάκτες ή ουδέτερους φορείς. Σήμερα υπάρχει μία ποικιλία εμπορικά διαθέσιμων ιοντοανταλλακτικών ηλεκτροδίων για την ανίγνευση συγκεκριμένων ιόντων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ηλεκτρόδια ανίχνευσης αερίων, τα οποία είναι ιοντοανταλλακτικά ηλεκτρόδια τροποποιημένα με τη χρήση μιας διαπερατής σε αέρια μεμβράνης, και τα χημικά ευαίσθητα transistor (FETs). Τα FET βασίζονται σε υλικά ημιαγωγών τα οποία ανταποκρίνονται στην επιφανειακή ηλεκτρική βαθμίδωση του ηλεκτροδίου πύλης. Πρόσφατα, έχουν κατασκευαστεί ποτενσιομετρικοί αισθητήρες βασισμένοι στην τεχνολογία του πυριτίου οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στο φως.^{24,30}

Οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής της αγωγιμότητας λόγω μεταβολής της συγκέντρωσης ιονικών ενώσεων στην επιφάνειά τους. Οι

αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της χρονικά εξαρτώμενης μεταβολής της αγωγιμότητας, ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης του συμπληρωματικού προς ανάλυση μορίου ακινητοποιημένου στο ηλεκτρόδιο μορίου αναγνώρισης. Τέλος, υπάρχουν και βιοαισθητήρες που βασίζονται στη μέτρηση των μεταβολών της ηλεκτρικής αντίστασης, κατά τη διέλευση ενός μεταβαλλόμενου ρεύματος από συγκεκριμένο μέσο. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης, η αντίσταση ελαττώνεται με παράλληλη αύξηση της αγωγιμότητας.^{31,32}

1.4.2 Βιοαισθητήρες μάζας

Η κυριότερη κατηγορία βιοαισθητήρων μάζας είναι οι αισθητήρες που βασίζονται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο και καταγράφουν την αλλαγή στη συχνότητα συντονισμού ενός κύματος διάδοσης μέσω ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού κατά την διάρκεια μιας αντίδρασης. Βασιζόμενοι σε αυτήν την αρχή είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για να μετρήσουν μάζα, ιζώδες ή αλλαγές στην πυκνότητα στην επιφάνεια του αισθητήρα. Το θεωρητικό υπόβαθρο του πιεζοηλεκτρισμού τέθηκε για πρώτη φορά το 1885 από τον Rayleigh.³³ Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο αναφέρεται στη μετατροπή σε ένα κρύσταλλο της ηλεκτρικής ενέργειας σε μηχανική και αντίστροφα. Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά εμφανίζουν παραμόρφωση, αν εφαρμοστεί σε αυτά ηλεκτρικό πεδίο και αντίστροφα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται από τη στιγμή που ένας κρύσταλλος ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού νλικού κατέχει έναν πολικό άξονα, εξαιτίας των δίπολων που σχετίζονται με τη διευθέτηση των ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα. Έτσι όταν εφαρμόζεται μηχανική τάση (αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο), παρατηρείται φυσική μετατόπιση των ατόμων, δηλαδή ταλάντωση αυτών γύρω από μία θέση ισορροπίας, οπότε λαμβάνει χώρα η αντίστοιχη μεταβολή στο δίκτυο των στιγμιαίων δίπολων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φορτίου στον κρύσταλλο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου.

Εφαρμόζοντας εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο το πιεζοηλεκτρικό υλικό ταλαντώνεται με συγκεκριμένη συχνότητα δημιουργώντας ένα ακουστικό κύμα. Επομένως, τα ακουστικά κύματα είναι αρμονικές ελαστικές παραμορφώσεις, που μπορούν να παραχθούν σε στερεά, όταν οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων μεταβάλλονται εξαιτίας της άσκησης μίας εξωτερικής δύναμης. Εξαιτίας του φαινομένου του ακουστικού κύματος προκύπτει μια ενδιαφέρουσα κατηγορία αισθητήρων που ονομάζονται ακουστικοί αισθητήρες. Η διάταξη περιλαμβάνει το πιεζοηλεκτρικό υλικό και ηλεκτρόδια (Εικόνα 6). Τα ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου που θα παράξει το ακουστικό κύμα, ενώ ταυτόχρονα χρησιμεύουν και στην ανίχνευση του κύματος αυτού. Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι ο χαλαζίας (SiO₂), το οξείδιο λιθίου-τανταλίου (LiTaO₃) και το οξείδιο λιθίου-νιοβίου (LiNbO₃).³⁴



Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση ενός αισθητήρα επιφανειακών ακουστικών κυμάτων.

Ανάλογα με τον τρόπο διάδοσης του ακουστικού κύματος μέσα στο πιεζοηλεκτρικό υλικό, διακρίνονται δύο τύποι ακουστικών βιοαισθητήρων:

- Οι αισθητήρες επιφανειακού ακουστικού κύματος (Surface Acoustic Wave, SAW), όπου το ακουστικό κύμα διαδίδεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα.
- Οι αισθητήρες ακουστικού κύματος όγκου (Bulk Acoustic Wave, BAW), όπου το ακουστικό κύμα διαδίδεται σε όλο τον όγκο του πιεζοηλεκτρικού υλικού.

Στην δεύτερη κατηγορία αυτή ανήκει και ο μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία. Ο μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM) είναι μία διάταξη ανίχνευσης μάζας, που έχει τη δυνατότητα να μετρά πολύ μικρές μεταβολές μάζας πάνω σε έναν κρύσταλλο χαλαζία, ο οποίος βρίσκεται σε κατάσταση συντονισμού. Η ευαισθησία του QCM είναι περίπου 100

φορές μεγαλύτερη από έναν ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας με ευαισθησία 0,1 mg. Αυτό σημαίνει ότι οι QCM είναι ικανοί να μετρήσουν μεταβολές μάζας, όσο ένα τμήμα μίας μονοστιβάδας ή απλής στιβάδας μορίων. Η υψηλή ευαισθησία και η δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο των μεταβολών μάζας στον ανιχνευτή κρυστάλλου λόγω των βιομοριακών αντιδράσεων καθιστούν το QCM μία ελκυστική τεχνική για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

1.4.3 Θερμικοί μεταλλάκτες σήματος

Οι θερμικοί μεταλλάκτες σήματος καταγράφουν μεταβολές της ενθαλπίας κατά τη διάρκεια βιολογικών αντιδράσεων με τη χρήση μιας ποικιλίας από θερμόμετρα ή θερμίστορες. Έτσι η ανίχνευση της θερμότητας κατά τη διάρκεια της ενζυμικής κατάλυσης έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή παρασκευή θερμικών-ενζυμικών βιοαιασθητήρων. Επίσης από τη στιγμή που θερμότητα είτε παράγεται είτε καταναλώνεται στις πιο πολλές βιομοριακές αντιδράσεις, η μεταβολή αυτή μπορεί να μετατραπεί σε αναλυτικό σήμα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός μορίου με το ακινητοποιημένο βιομόριο αναγνώρισης.³⁵



Εικόνα 6. Αρχή λειτουργίας θερμικών μεταλλακτών σήματος

1.4.4 Οπτικοί μεταλλάκτες σήματος

Οι οπτικοί μεταλλάκτες σήματος βασίζονται σε διάφορες αρχές ανίχνευσης, όπως είναι η επίδραση μιας αντίδρασης στην απορρόφηση του φωτός, το φθορισμό/φωσφορισμό, τον δείκτη ανάκλασης ή άλλες οπτικές παραμέτρους. Αυτός ο τύπος μεταλλακτών έχει γίνει εξαιρετικά δημοφιλής τα τελευταία χρόνια και, πλέον, πολλές διατάξεις οπτικών αισθητήρων είναι εμπορικά διαθέσιμες. Οι πρώτοι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονταν στην παρακολούθηση της αλλαγής χρώματος που συνέβαινε σε δείκτες ευαίσθητους στις μεταβολές του pH λόγω της δράσης ενός ενζύμου που δημιουργούσε ή κατανάλωνε πρωτόνια. Σήμερα η πιο διαδεδομένη κατηγορία οπτικών βιοαισθητήρων βασίζεται στο φαινόμενο του φθίνοντος κύματος (evanescent wave). Όταν το φως υφίσταται ολική ανάκλαση, όπως κατά τη διάρκεια της μετάδοσής του μέσω ενός οπτικού κυματοδηγού, ένα μικρό μέρος της ενέργειας διαδίδεται πέρα από την οπτική διεπιφάνεια. Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδυαστεί φθοριζόντων ιχνηθετών για την παρακολούθηση βιομοριακών με τη χρήση αλληλεπιδράσεων, π.χ., αντιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος. Επιπλέον, επειδή το φθίνον κύμα είναι ευαίσθητο σε αλλαγές στο δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του κυματοδηγού, είναι δυνατή η παρακολούθηση αντιδράσεων χωρίς τη χρήση ιχνηθετών. 36,37 Στο κεφάλαιο 2

αναλύονται διεξοδικά οι αρχές λειτουργίας και οι εφαρμογές οπτικών αισθητήρων που δεν χρησιμοποιούν ιχνηθέτες.



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης του φθίνοντος κύματος με τα βιομόρια στην επιφάνεια ενός κυματοδηγού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΟΠΤΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΧΩΡΙΣ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ

Η απαίτηση για γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση ουσιών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας μεγάλης ποικιλίας οπτικών βιοαισθητήρων που οι οποίοι πλεονεκτούν έναντι αυτών που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες στο ότι:

- Δεν χρειάζεται τροποποίηση των αντιδραστηρίων (αντίσωμα ή ανάλογο αντιγόνου)
- Υπάρχει δυνατότητα καταγραφής της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο παρέχοντας έτσι πληροφορίες για την κινητική της αντίδρασης
- Μειώνεται σημαντικά ο χρόνος και το κόστος της ανάλυσης

Ανάλογα με την αρχή στην οποία βασίζονται για την ανίχνευση, οι οπτικοί βιοαισθητήρες διακρίνονται σε:

- Συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR)
- Συμβολομετρικούς (Mach-Zehnder, Young, Fabry-Perot, Hartmann)
- Φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (RIF, WLRS)

Ακολουθεί σύντομη περιγραφή της αρχής λειτουργίας των τριών κύριων κατηγοριών οπτικών βιοαισθητήρων που δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθετών.

2.1 Βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων

Μετά την πρώτη εφαρμογή τους για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης αντισώματοςαντιγόνου από τον Liedberg το 1983,³⁸ οι βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR), αποτελούν το πλέον διαδεδομένο είδος οπτικών βιοαισθητήρων για την ανίχνευση ουσιών χωρίς τη χρήση ιχνηθετών.³⁸

Οι βιοαισθητήρες SPR βασίζονται στο φαινόμενο του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων, δηλαδή στην ταλάντωση της πυκνότητας φορτίων που μπορεί να υπάρχουν στη διεπιφάνεια δύο μέσων με διηλεκτρικές σταθερές αντίθετων προσήμων (όπως ένα μέταλλο και ένα διηλεκτρικό υλικό). Τα επιφανειακά πλασμόνια είναι ηλεκτρόνια της στοιβάδας αγωγιμότητας των μετάλλων που διαμορφώνουν ένα κύμα ηλεκτρονικής πυκνότητας όταν διεγερθούν από εξωτερικά προσπίπτον φως. Το κύμα που δημιουργείται διαδίδεται κατά μήκος της μεσεπιφάνειας μετάλλου-διηλεκτρικού. Η σύζευξη του φωτός με τα πλασμόνια του

μετάλλου επιτυγχάνεται μέσω πρίσματος ή κυματοδηγού. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο του κύματος πλασμονίων έχει μέγιστη ένταση στη διεπιφάνεια και μειώνεται εντός του διηλεκτρικού υλικού (φθίνον πεδίο) ενώ είναι ευαίσθητο σε μεταβολές του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του διηλεκτρικού. Έτσι, όταν στην επιφάνεια του διηλεκτρικού ακινητοποιηθεί ένα βιομόριο αναγνώρισης είναι δυνατό να παρακολουθηθεί η δέσμευση του αναλύτη μέσω της μεταβολής που επιφέρει στη φάση του κύματος των επιφανειακών πλασμονίων λόγω της αλλαγής του δείκτη διάθλασης. Η μεταβολή αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας του αναλύτη (Εικόνα 8).

Το μέγεθος που καταγράφεται είναι η αλλαγή στη γωνία του προσπίπτοντος φωτός για την οποία επιτυγχάνεται συντονισμός ή η μεταβολή του μήκους κύματος στο οποίο αντιστοιχεί το ελάχιστο του φάσματος ανάκλασης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το φαινόμενο SPR παρατηρείται σε μέταλλα των οποίων τα ηλεκτρόνια συμπεριφέρονται σαν αέριο ελεύθερων ηλεκτρονίων (plasma), δηλαδή οι κινήσεις τους είναι ανεξάρτητες του φορτίου τους. Αυτό περιορίζει την επιλογή του μετάλλου σε υλικά όπως ο χρυσός, ο χαλκός, ο άργυρος, το παλλάδιο και το αλουμίνιο. Το πάχος του μεταλλικού στρώματος εξαρτάται από τις οπτικές σταθερές του υλικού και από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στις περισσότερες διατάξεις SPR, το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι 670 nm και το βέλτιστο πάχος της μεταλλικής επιφάνειας περίπου 50 nm. Η ευαισθησία της μεθόδου σε ένα συγκεκριμένο διαλύτη εξαρτάται από την ακρίβεια υπολογισμού της μεταβολής της γωνίας ή του μήκους κύματος συντονισμού. Ενδεικτικά, η δέσμευση 1 ng πρωτεΐνης σε επιφάνεια χρυσού 1 mm² προκαλεί μεταβολή της γωνίας συντονισμού κατά 0,12 μοίρες ή αντίστοιχα μεταβολή του δείκτη διάθλασης του διαλύματος κατά 0,001. Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται επίσης από το μοριακό βάρος του αναλύτη.³⁹ Αν το μοριακό βάρος του αναλύτη είναι μικρότερο από 5 kDa, τότε η αλλαγή στο δείκτη διάθλασης και κατά επέκταση η μεταβολή της γωνίας συντονισμού είναι πολύ μικρή και δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια. Ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας είναι το γεγονός ότι το βάθος διείσδυσης του φθίνοντος κύματος κυμαίνεται στα 300-400 nm, έτσι μπορούν να μελετηθούν αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μέσα σε αυτή την απόσταση από την επιφάνεια του αισθητήρα.⁴⁰

Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της τεχνικής SPR είναι ότι επιτρέπει τον υπολογισμό της σταθεράς Κ της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του αισθητήρα αλλά και της ταχύτητας αντίδρασης των μορίων που αλληλεπιδρούν. Στα

34

πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται και το γεγονός ότι είναι δυνατή η παρακολούθηση των αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο (real-time) καθώς και το ότι σήμερα υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα συστήματα τα οποία μπορούν να παρακολουθούν μία ή περισσότερες αντιδράσεις ταυτόχρονα. Λόγω των πλεονεκτημάτων της η τεχνική SPR έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πλήθος εφαρμογών που σχετίζονται με την διάγνωση ασθενειών, την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, την ανάλυση τροφίμων, την in vitro αξιολόγηση φαρμάκων, καλλυντικών, κλπ.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας των βιοαισθητήρων SPR.⁴¹

2.2 Συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες

Οι συμβολομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση της μεταβολής της φάσης μεταξύ δύο οπτικών κυμάτων που συμβάλλουν αφού έχουν διανύσει διαφορετικές πορείες σε έναν οπτικό κυματοδηγό (συνήθως επίπεδης γεωμετρίας). Τα περισσότερα συμβολόμετρα αποτελούνται από δύο ανεξάρτητους οπτικούς κυματοδηγούς οι οποίοι συμβάλλουν σε κάποιο σημείο της οπτικής διαδρομής όπου και καταγράφεται το φάσμα συμβολής. Η πιο διαδεδομένη μορφή συμβολομετρικών βιοαισθητήρων είναι αυτοί που βασίζονται σε συμβολόμετρα Mach-Zehnder (Εικόνα 9). Σε αυτό το είδος οπτικού αισθητήρα, ο κυματοδηγός διαχωρίζεται από έναν διακλαδωτή μορφής Υ σε δύο βραχίονες, οι οποίοι στη συνέχεια ενώνονται ξανά σε έναν κυματοδηγό. Ο ένας βραχίονας ονομάζεται αισθητήριος και τροποποιείται με το βιομόριο αναγνώρισης επιτρέποντας τη αλληλεπίδραση με τον αναλύτη,

ενώ ο δεύτερος δεν είναι τροποποιημένος ή δεν έρχεται σε επαφή με το δείγμα και αποτελεί τον βραχίονα αναφοράς. Το φως που εισέρχεται στον κυματοδηγό διαδίδεται διαχωριζόμενο σε δύο δέσμες, από τις οποίες η μία διατρέχει τον αισθητήριο βραχίονα και η άλλη τον βραγίονα αναφοράς. Η δέσμευση του αναλύτη στο βιομόριο αναγνώρισης που έχει ακινητοποιηθεί στον αισθητήριο βραχίονα μεταβάλλει τον δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του κυματοδηγού μεταβάλλοντας τη φάση του κυματοδηγούμενου φωτός. Έτσι, όταν οι δύο δέσμες συμβάλλουν η διαφορά φάσης μεταξύ της δέσμης που διέτρεχε τον αισθητήριο βραχίονα και της δέσμης που διέτρεχε το βραχίονα αναφοράς δημιουργεί ένα φάσμα συμβολής που καταγράφεται και συσχετίζεται με την ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα.42 Βιοαισθητήρες που βασίζονταν σε συμβολόμετρα Mach-Zehnder παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά το 1993 από τον Heideman και την ομάδα του.43 Έκτοτε οι αισθητήρες αυτοί έχουν εξελιχθεί με σμίκρυνση των διαστάσεων τους, κατασκευή συστοιχιών αισθητήρων στο ίδιο υπόστρωμα, και ολοκλήρωση στο ίδιο υπόστρωμα του κυματοδηγού με τον ανιχνευτή ή/και την πηγή φωτός. 44,45,46 Οι αισθητήρες αυτοί χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης, δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών αναλυτών και ενσωμάτωσης σε μικρού μεγέθους συσκευές κατάλληλες για αναλύσεις πεδίου.



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση ενός αισθητήρα τύπου Mach-Zehnder.47

2.3 Βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός

Οι βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (Reflectometric InterFerence Spectroscopy, RIFS) παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά το 1993 από τον G.
Gauglitz και βασίζονται στην μεταβολή του φάσματος συμβολής μιας δέσμης φωτός που ανακλάται από την διεπιφάνεια υλικών με διαφορετικό δείκτη διάθλασης.⁴⁸ Μια τέτοια διεπιφάνεια μπορεί να είναι ένα γυάλινο πλακίδιο μικροσκοπίου που έχει επικαλυφθεί με ένα στρώμα διαφανούς διηλεκτρικού υλικού το οποίο διαπερνάται από το φως. Η δέσμη φωτός ανακλάται με διαφορετική γωνία σε κάθε διεπιφάνεια (υγρό/διηλεκτρικό, διηλεκτρικό/γυαλί), με αποτέλεσμα οι ανακλώμενες δέσμες να ακολουθούν διαφορετικές οπτικές διαδρομές. Όταν οι δέσμες αυτές συμβάλλουν, λαμβάνει χώρα ενισχυτική ή καταστρεπτική συμβολή και δημιουργείται το φάσμα συμβολής.⁴⁹ Έτσι όταν η επιφάνεια του διηλεκτρικού τροποποιηθεί με βιομόρια αναγνώρισης και κατά τη διέλευση του δείγματος ο αναλύτης αντιδράσει με αυτά, προκαλείται μια αλλαγή του δείκτη διάθλασης στην διεπιφάνεια υγρό/διηλεκτρικό, και κατά επέκταση μετατόπιση του φάσματος συμβολής (Εικόνα 10). Η μετατόπιση αυτή καταγράφεται σε πραγματικό χρόνο και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα.⁵⁰



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση αρχής λειτουργίας βιοαισθητήρων φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός.⁵¹

Οι βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός διαθέτουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους οπτικούς αισθητήρες. Ένα από τα πλέον σημαντικά πλεονεκτήματα είναι το σχετικά χαμηλό κόστος κατασκευής του μεταλλάκτη, καθώς ως υπόστρωμα για την εναπόθεση του διαφανούς διηλεκτρικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλαστικό ή γυαλί, ενώ δεν απαιτείται η χρήση ακριβών τεχνολογιών, όπως η εναπόθεση υμενίου χρυσού (π.χ., βιοαισθητήρες SPR). Το γεγονός αυτό, δεν συνεισφέρει μόνο στη μείωση του κόστους αλλά και στην βελτίωση της ακινητοποίησης των βιομορίων αναγνώρισης, διότι αποφεύγεται η μετουσίωση πρωτεϊνών λόγω αλληλεπίδρασης με μέταλλα όπως ο χρυσός. Επίσης στα πλεονεκτήματα των βιοαισθητήρων RIFS είναι η σταθερότητα που εμφανίζουν σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας.⁵¹

Στους βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός εντάσσονται και οι βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός. Στην κατηγορία αυτή, ανήκει ο βιοαισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Για τον λόγο αυτό, ακολουθεί αναλυτική περιγραφή της αρχής λειτουργίας του συγκεκριμένου βιοαισθητήρα.

2.3.1 Βιοαισθητήρας φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός

Οι βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (White Light Reflectance Spectroscopy, WLRS) βασίζονται στην ανάκλαση ορατού φωτός από κατάλληλο υπόστρωμα και στη δημιουργία φάσματος συμβολής που αντιστοιχεί σε όλη την περιοχή του ορατού. Το υπόστρωμα αποτελείται από ένα πλήρως ανακλαστικό υλικό, π.χ., μια ψηφίδα πυριτίου, στο οποίο έχει εναποτεθεί ένα υμένιο διαφανούς διηλεκτικού π.χ., διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου.⁵² Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται σχηματικά ο βιοαισθητήρας ανάκλασης λευκού φωτός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και τα βασικά στοιχεία της οπτικής διάταξης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται μια δέσμη οπτικών ινών, η οποία αποτελείται από μια κεντρική ίνα και έξι άλλες τοποθετημένες στην περιφέρεια αυτής. Η δέσμη αυτή συνδέεται με τη λυχνία εκπομπής λευκού φωτός και το φως μεταφέρεται και προσπίπτει κάθετα μέσω των έξι περιφερειακών ινών στην αισθητήρια επιφάνεια. Οι ανακλώμενες δέσμες φωτός συλλέγονται από την κεντρική οπτική ίνα και οδηγούνται στο κανάλι μέτρησης του φασματοφωτομέτρου. Το φασματοφωτόμετρο συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος καταγράφει το φάσμα αναφοράς και το φάσμα της πειραματικής μέτρησης.⁵³



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση του βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός.

Στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Η αισθητήρια επιφάνεια αποτελείται από υπόστρωμα πυριτίου (Si), επιστρωμένο με θερμικό διοξείδιο του πυριτίου (SiO2) και τροποποιείται με βιομόρια αναγνώρισης τα οποία σχηματίζουν μια βιομοριακή στοιβάδα. Το προσπίπτον φως ανακλάται μερικώς σε κάθε διεπιφάνεια μεταξύ των στοιβάδων με διαφορετικό δείκτη διάθλασης. Αρχικά συναντά τη στοιβάδα του διοξειδίου του πυριτίου στην οποία διαθλάται, και καταλήγει στην αδιαφανή επιφάνεια του πυριτίου όπου ανακλάται πλήρως. Οι ανακλώμενες δέσμες δημιουργούν το φάσμα συμβολής. Αν συμβεί οποιαδήποτε αλλαγή στο δείκτη διάθλασης ή το πάχος στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου, το φάσμα συμβολής μετατοπίζεται και η μεταβολή αυτή καταγράφεται σε πραγματικό χρόνο. Έτσι όταν λάβει χώρα πρόσδεση του αναλύτη του δείγματος στα βιομόρια αναγνώρισης, αυξάνεται το πάχος της βιομοριακής στοιβάδας προκαλώντας μετατόπιση του φάσματος, η οποία καταγράφεται συνεχώς ως αύξηση του πάγους της στοιβάδας του διοξειδίου του πυριτίου, εφόσον ο δείκτης διάθλασης των βιομορίων θεωρείται όμοιος με αυτόν του διοξειδίου του πυριτίου. Με αυτόν τον τρόπο, παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης της βιοαντίδρασης σε πραγματικό χρόνο ως αύξηση του φαινόμενου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας.54,55,56



Εικόνα 12.Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας του βιοαισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός, Μετατόπιση του φάσματος ανάκλασης λόγω αύζησης του πάχους του βιομοριακής στιβάδας που σχηματίζεται πάνω στην επιφάνεια διοξειδίου του πυριτίου:η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στο φάσμα ανάκλασης που λαμβάνεται πριν την έναρζη της αντίδρασης και η κόκκινη σε αυτό που λαμβάνεται μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.⁵⁶

Η μετατροπή της παρατηρούμενης μετατόπισης στο φάσμα συμβολής ανάκλασης σε φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας επιτυγχάνεται μέσω ειδικού λογισμικού το οποίο υπολογίζει για κάθε μήκος κύματος την ενέργεια με την οποία ανακλώνται οι δέσμες φωτός στον ανιχνευτή του φασματοφωτομέτρου, και συγκρίνει τις πειραματικές τιμές με τις θεωρητικές έως ότου γίνει η καλύτερη δυνατή προσαρμογή των δύο φασμάτων. Συγκεκριμένα, η ολική ενέργεια της ακτινοβολίας που καταλήγει στον ανιχνευτή για κάθε μήκος κύματος λ δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$E = A + B\cos\left(\frac{4\pi n_1}{\lambda}d_1\right) + C\cos\left(\frac{4\pi n_2}{\lambda}d_2\right) + D\cos\left(\frac{4\pi (n_2d_2 + n_1d_1)}{\lambda}\right)_{o}$$

όπου, $A = r_{01}^2 + r_{12}^2 (1 - r_{01}^2)^2 + r_{23}^2 (1 - r_{01}^2)^2 (1 - r_{12}^2)^2$ και $B = 2r_{01} r_{12} (1 - r_{01}^2)^2$ $C = 2r_{12}r_{23}(1 - r_{01}^2)(1 - r_{12}^2)^2$ $D = 2r_{01}r_{23}(1 - r_{01}^2)(1 - r_{12}^2)^2$ Επίσης, ισχύει η σχέση :

$$r_{ij} = \frac{n_i - n_j}{n_i + n_j}$$

Με r01, r12, r23 συμβολίζονται οι σχετικοί δείκτες διάθλασης μεταξύ των στρωμάτων που έρχονται σε επαφή με την ακτινοβολία, το (0) αντιστοιχεί στον αέρα πάνω από την επιφάνεια, (1) είναι η βιομοριακή στοιβάδα, (2) το υπόστρωμα του SiO₂ και (3) το πυρίτιο n1, n2 είναι οι δείκτες διάθλασης και d1, d2 είναι τα πάχη της βιομοριακής στοιβάδας και του SiO₂, αντίστοιχα.⁵⁷ Από την μορφή της παραπάνω εξίσωσης προκύπτει μια ημιτονοειδής συνάρτηση με τις τιμές που λαμβάνει το συνημίτονο να καθορίζουν τα αντίστοιχα μέγιστα και ελάχιστα. Δεδομένου ότι η ένταση της πηγής για κάθε λ είναι γνωστή από το φάσμα αναφοράς και με την παραδοχή πως ο δείκτης διάθλασης της βιομοριακής στοιβάδας δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά την αντίδραση με τον αναλύτη, ο μόνος άγνωστος της εξίσωσης είναι το πάχος της βιομοριακής στοιβάδας. Με αυτό τον τρόπο ο αλγόριθμος είναι σε θέση να υπολογίζει την μεταβολή του πάχους της βιομοριακής στοιβάδας συναρτήσει του χρόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ

Όλοι οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από τρία μέρη: το βιολογικό στοιχείο που αναγνωρίζει τον αναλύτη, το μεταλλάκτη σήματος και ένα ηλεκτρονικό σύστημα που πραγματοποιεί την καταγραφή, ενίσχυση, και ερμηνεία του σήματος.^{59,58} Το ακινητοποιημένο βιομόριο είναι αυτό που αντιδρά με το αναλύτη και μπορεί να είναι μια αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (απταμερή), μια πρωτεΐνη (ένζυμο, αντίσωμα), ένα κύτταρο, τμήμα ιστού, μικροοργανισμός, οργανίδιο ή άλλο.⁵⁹ Για τη δημιουργία του βιοαισθητήρα πρέπει το βιολογικό στοιχείο να προσδεθεί στην επιφάνεια του αισθητήρα η οποία μπορεί να μέταλλο, πολυμερές, πυριτικό υλικό ή άλλο υλικό. Η συνηθέστερη μέθοδος είναι η ακινητοποίηση του βιολογικού στοιχείου μετά από κατάλληλη χημική τροποποίηση της επιφάνειας. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση μορίων όπως τα σιλάνια (με τελικές αμινο-, καρβοξυ-, ή εποξειδικές ομάδες) ή πολυμερών όπως η πολυλυσίνη, η κυτταρίνη, η καρβοξυ- ή αμινοτροποποιημένη δεξτράνη τα οποία επιτρέπουν την πρόσδεση σε πυριτικές ή άλλες επιφάνειες. Εναλλακτική μέθοδος είναι ο εγκλεισμός του βιομορίου σε τριδιάστατες δομές, όπως πλέγματα υδρογέλης (hydrogel) ή ξηρογέλης (xerogel), που προκύπτουν από τη μέθοδο λύματος-πηκτής (sol-gel) ή πολυμερικά δίκτυα με εναλλασσόμενο φορτίο που εναποτίθενται στην επιφάνεια του αισθητήρα σε στρώματα (layer-by layer). Σε αυτές τις περιπτώσεις, το βιομόριο αναγνώρισης μπορεί να συνδέεται είτε φυσικά, είτε χημικά με το υπόστρωμα.⁶⁰ Ο χημικός εγκλεισμός του βιομορίου αναγνώρισης δημιουργεί ισχυρούς χημικούς δεσμούς με το υπόστρωμα, ακινητοποιώντας πλήρως το βιομόριο. Αντίθετα, ο φυσικός εγκλεισμός βασίζεται στην ανάπτυξη φυσικών δυνάμεων που επιτρέπουν μικρή ελευθερία στην κίνηση του βιομορίου μέσα στους πόρους του πολυμερικού δικτύου.59

Η επιλογή της μεθόδου ακινητοποίησης του βιομορίου αναγνώρισης καθορίζεται τόσο από την χημική σύσταση του μεταλλάκτη αλλά και από τις ιδιαίτερες απαιτήσεις της εκάστοτε αρχής ανίχνευσης. Για παράδειγμα, στους οπτικούς αισθητήρες που βασίζονται στο φαινόμενο φθίνοντος κύματος είναι επιθυμητό η επιφάνεια του βιοαισθητήρα να είναι όσο το δυνατόν πιο λεία ώστε να μην υπάρχουν απώλειες του κυματοδηγούμενου φωτός. Έτσι η βελτιστοποίηση της ευαισθησίας ανίχνευσης δεν μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της ενεργής επιφάνειας του αισθητήρα, όπως γίνεται για παράδειγμα στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες, αλλά μέσω της δημιουργίας περισσότερων δραστικών θέσεων στην επιφάνεια του αισθητήρα. Στα υποκεφάλαια που ακολουθούν παρουσιάζονται αναλυτικά οι διάφορες μέθοδοι για την τροποποίηση των επιφανειών των βιοαισθητήρων με βιομόρια.

3.1 Φυσικές μέθοδοι τροποποίησης

Οι φυσικές μέθοδοι τροποποίησης περιλαμβάνουν την φυσική εναπόθεση ατμών, την δημιουργία αυτοσυναρμολογούμενων υμενίων, την επικάλυψη με sol-gel, και την επικάλυψη με περιστροφή ή ηλεκτροπεριστροφή.

3.1.1 Φυσική εναπόθεση ατμών

Η φυσική εναπόθεση ατμών (Physical Vapour Deposition, PVD) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την προετοιμασία ομοιόμορφων επιφανειακών επικαλύψεων λόγω των φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών, της ευκολίας και της ακρίβειας της εναπόθεσης. Οι πιο σημαντικές παράμετροι στη PVD είναι: η δημιουργία σωματιδίων από στοχευμένα υλικά, η ενέργεια των σωματιδίων, η πυκνότητα και η θερμοκρασία του υποστρώματος και οι ιδιότητες του αντιδρώντος αερίου. Η PVD χαρακτηρίζεται από την υψηλή πυκνότητα της επίστρωσης και την ισχυρή προσκόλληση της στο υπόστρωμα, τη δυνατότητα δημιουργίας υμενίων πολλαπλών συστατικών, τη χαμηλή θερμοκρασία υποστρώματος και υποστρωμάτων.⁶¹ Η φυσική εναπόθεση ατμών περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: τα άτομα ή μόρια του υλικού προς εναπόθεση εξατμίζονται από τα υλικά που είναι σε στερεή ή υγρή κατάσταση, μεταφέρονται με τη μορφή ατμού ή πλάσματος σε αέριο περιβάλλον υπό κενό ή χαμηλή πίεση και συμπυκνώνονται στην επιφάνεια του υποστρώματος. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται πώς ακριβώς πραγματοποιείται η διαδικασία δημιουργίας υμενίων με φυσική εναπόθεση ατμών.



Εικόνα 13. Φυσική εναπόθεση ατμών. Το προς εναπόθεση υλικό θερμαίνεται στο κάτω μέρος του θαλάμου και αφού εζατμιστεί εναποτίθεται στο υπόστρωμα που έχει τοποθετηθεί στο επάνω μέρος του θαλάμου (hhtps://www.ukessays.com).

Η εξάτμιση (evaporation), η εναπόθεση μαγνητρονίων (magnetron sputtering), η εναπόθεση τόξου υπό κενό (vacuum arc deposition), η ιοντική επιμετάλλωση (ion plating) και η εμφύτευση ιόντων (ion implantation) είναι διαδικασίες που ανήκουν στη φυσική εναπόθεση ατμών.⁶² Η φυσική εναπόθεση ατμών οδηγεί στην ανάπτυξη υμενίων με αντίδραση μεταξύ μιας επιφάνειας και ενός αερίου που παρέχει το υλικό για τη δημιουργία του υμενίου με τη μορφή των ατόμων, μορίων ή ιόντων. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με θέρμανση, δέσμες ηλεκτρονίων, λέιζερ ή ηλεκτρική εκκένωση υπό κενό.

3.1.2 Αυτοσυναρμολόγηση υμενίων σε στρώματα

Η αυτοσυναρμολόγηση υμενίων σε στρώματα (layer-by-layer, LBL) είναι τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για τον εγκλεισμό αντιβιοτικών, αντιμικροβιακών πεπτιδίων και νανοϋλικών σε μεταλλικές επιφάνειες. Η εφαρμογή της τεχνικής ακολουθεί τα εξής βασικά βήματα: α) ένα φορτισμένο υπόστρωμα βυθίζεται σε διάλυμα ενός αντίθετα φορτισμένου πολυμερούς ώστε να δημιουργηθεί η πρώτη μονοστοιβάδα, β) ακολουθεί έκπλυση για την απομάκρυνση του αδέσμευτου υλικού, και γ) το επικαλυμμένο υπόστρωμα βυθίζεται εκ νέου σε διάλυμα αντίθετα φορτισμένου ή αφόρτιστου πολυμερούς ώστε να προσροφηθεί και το δεύτερο στρώμα και με αυτόν τον τρόπο να σχηματιστεί μια σειρά στρωμάτων.⁶³ Στην Εικόνα

14 δίνεται ένα παράδειγμα υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αυτοσυναρμολόγηση πολλαπλών υμενίων με διαφορετικές ιδιότητες σε μια επιφάνεια. ⁶⁴



Εικόνα 14. Τροποποίηση επιφάνειας με την τεχνική LBL. Παρουσίαζονται οι δομές των πολυμερών που αποτελούν κάθε στρώμα.⁶³

3.1.3 Επικάλυψη sol-gel

Η διαδικασία επικάλυψης sol-gel βασίζεται στη μετατροπή κατάλληλων μονομερών σε κολλοειδή διαλύματα που δρουν ως πρόδρομοι για την δημιουργία ενός τρισδιάστατου δικτύου. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η ισχυρή προσκόλληση των δημιουργόυμενων υμενίων στην επιφάνεια, η χημικώς αδρανής φύση των υμενίων, η παραγωγή υμενίων σε πολύ μικρή κλίμακα και οι πολλές διαφορετικές διαδικασίες παρασκευής όπως η εμβάπτιση (dipping) και ο ψεκασμός (spraying). Η διαδικασία ξεκινά συνήθως με κολλοειδή σωματίδια που αιωρούνται σε ένα υγρό (sol) και εξελίσσεται μέσω αντιδράσεων σχηματισμού πηκτής (gel). Τα υμένια sol-gel παράγονται με εναιώρηση είτε μεταλλικών νανοσωματίδιων σε ένα διάλυμα πολυμερούς ή μεταλλικών ιόντων στο διάλυμα πολυμερούς και κατόπιν αναγωγή των μεταλλικών ιόντων χρησιμοποιείται συχνά η τεχνική της διαπύρωσης (calcination treatment) λεπτών υμενίων μετά από ζελατινοποίηση.⁶⁴ Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται οι αντιδράσεις δημιουργίας ενός υμενίου sol-gel από ένα οργανο-αλκοξυ-σιλάνιο.⁶⁵



Εικόνα 15. Βασικά στάδια μίας πορείας σύνθεσης sol-gel.

3.1.4 Επικάλυψη με περιστροφή ή ηλεκτροπεριστροφή

Η επικάλυψη με περιστροφή (spin-coating) είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για να καλύψει μεγάλη επιφάνεια με υμένιο ενιαίου πάχους το οποίο δημιουργείται καθώς διάλυμα του υλικού προς επικάλυψη πέφτει στο κέντρο της επιφάνειας (είτε χειροκίνητα με χρήση πιππέτας ή αυτόματα με ακροφύσιο που απελευθερώνει ποσότητες του διαλύματος επίστρωσης) η οποία περιστρέφεται με χαμηλή ταχύτητα. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται ομοιόμορφη επίστρωση το πάχος της οποίας ρυθμίζεται από την ταχύτητα περιστροφής της επιφάνειας.⁶⁴ Η επικάλυψη με περιστροφή είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη διαδικασία στην μικροηλεκτρονική για την δημιουργία λεπτών υμενίων.

Η επικάλυψη με ηλεκτροπεριστροφή είναι μέθοδος που αναπτύχθηκε ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία και διαδόθηκε λόγω της απλότητας της.⁶⁰ Η μέθοδος παρέχει συνεχείς μονοδιάστατες ίνες με διάμετρο μικρότερη του μικρομέτρου η οποία καθορίζεται από συνθήκες όπως το ιξώδες του διαλύματος του υλικού που πρόκειται να εναποτεθεί, η αγωγιμότητα και η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Λόγω της πολύ μικρής διαμέτρου οι νανοΐνες έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια και βρίσκουν διάφορες τεχνολογικές εφαρμογές. Για παράδειγμα, επιστρώσεις με νανοΐνες πολυ(βινυλικής αλκοόλης) έχουν μελετηθεί ευρέως λόγω της ικανότητας σχηματισμού υδρόφιλων υμενίων που χαρακτηρίζονται από βιοσυμβατότητα, καλή χημική αντίσταση και εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες.

3.2 Χημικές μέθοδοι τροποποίησης

Οι χημικές μέθοδοι τροποποίησης περιλαμβάνουν την χημική εναπόθεση ατμών, την κατεργασία με πλάσμα, την εισαγωγή πολυμερικών αλυσίδων και την σιλανοποίηση.

3.2.1 Χημική εναπόθεση ατμών

Η χημική εναπόθεση ατμών (Chemical Vapour Deposition, CVD) επιτυγχάνει τη χημική τροποποίηση μιας επιφάνειας με οργανικά ή ανόργανα υλικά στην αέρια φάση. Οι επιφάνειες μπορεί να τροποποιηθούν με μέταλλα, ημιμέταλλα ή οξείδια αυτών μέσω θερμικής αποσύνθεσης (thermal decomposition), πυρόλυσης (pyrolysis), αναγωγής (reduction), οξείδωσης (oxidation) ή υδρόλυσης τους (hydrolysis). Ανάλογα με την μέθοδο χρησιμοποιείται πλάσμα, φλόγα ή ακτινοβολία λέιζερ για να επιτευχθεί η εξάχνωση του υλικού προς εναπόθεση. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η χημική εναπόθεση ατμών. Ουσιαστικά η χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα μετά των προσρόφηση των πρόδρομων μορίων στην επιφάνεια. Πλεονεκτήματα της χημικής εναπόθεσης ατμών σε σχέση με την συμβατική υγρή επίστρωση είναι ότι δεν χρησιμοποιεί διαλύτες που αφενός επιβαρύνουν τους χειριστές μέσω έκθεσης σε επιβλαβείς πτητικές οργανικές ενώσεις και αφετέρου η διαδικασία επίστρωσης είναι αρκετά πολύπλοκη και με σημαντικές επιπτώσεις στο κόστος της μεθόδου.^{66,67}



Εικόνα 16. Χημική εναπόθεση ατμών (http://www.plasma-electronics.com).

3.2.2 Κατεργασία με πλάσμα

Η κατεργασία επιφανειών με πλάσμα μπορεί να επιφέρει χημική ή φυσική τροποποίηση της επιφάνειας μιας και μεταβάλει τόσο τη χημεία όσο και τη μορφολογία της επιφάνειας. Ο συνδυασμός αυτός προσφέρει έλεγχο της χημικής λειτουργικότητας της επιφάνειας με την εισαγωγή χημικών ομάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ομοιοπολική πρόσδεση βιομορίων αλλά και της τοπογραφίας της επιφάνειας μέσω της δημιουργίας νανο- ή/και μικρο-δομών οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την ενεργή σε σχέση με την προβαλλόμενη επιφάνειας αλλά και του αερίου του πλάσματος. Στην Εικόνα 17 παρουσιάζεται μια σχηματική παράσταση ενός αντιδραστήρα πλάσματος (Εικόνα 17α) και παραδείγματα επιφανειών πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) κατεργασμένων με πλάσμα οξυγόνου όπου φαίνεται τόσο η δημιουργία τοπογραφίας (Εικόνα 17β) όσο και η τροποποίηση της χημικής σύστασης της επιφάνειας μεταν 17γ).

Επίσης με τη χρήση πλάσματος μπορεί να επιτευχθεί πολυμερισμός και δημιουργία είτε υδρόφιλων είτε υδρόφοβων υμενίων που μπορεί να απωθούν τις πρωτεΐνες ή να προάγουν την προσρόφηση πρωτεϊνών σε μια επιφάνεια. Τα πολυμερή που κατασκευάζονται με αυτή τη μέθοδο διατηρούν μόνο μέρος της λειτουργικότητας που μπορεί να υπάρχει στο μονομερές, έχουν συνήθως υψηλό ποσοστό σταυροδεσμών και είναι άμορφα. Η μείωση της ισχύος και της θερμοκρασίας του πλάσματος μπορεί να μειώσει τον κατακερματισμό των πολυμερών διατηρώντας περισσότερο τη χημική δομή του μονομερούς. Ωστόσο, οι επικαλύψεις αυτές εξακολουθούν να χαρακτηρίζονται από κακή μηχανική και χημική σταθερότητα, και συχνά από τη μη ικανοποιητική προσκόλληση στο υπόστρωμα. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να παρακαμφθούν με παλμική εναπόθεση με πλάσμα. Σε αυτή τη μέθοδο η ενεργοποίηση του μονομερούς και η παραγωγή των δραστικών ομάδων στην επιφάνεια γίνεται κατά περιόδους που διαρκούν χιλιοστά του δευτερολέπτου. Ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια των ενδιάμεσων περιόδων (συνήθως χιλιοστά του δευτερολέπτου) περιορίζοντας την επίδραση των δραστικών μορίων του πλάσματος στην επιφάνεια.⁶⁶



Εικόνα 17. Επεξεργασία επιφανειών με πλάσμα. α) Σχηματική παράσταση αντιδραστήρα πλάσματος. β) Εικόνες SEM από επιφάνεια πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) πριν (επάνω) και μετά (κάτω) την κατεργασία με πλάσμα οζυγόνου. (γ) Ανάλυση με XPS επιφάνειας πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την κατεργασία με πλάσμα οζυγόνου.⁶⁹

3.2.3 Εισαγωγή πολυμερικών αλυσίδων με εμφύτευση

Άλλη μια μέθοδος χημική τροποποίησης επιφανειών είναι η εισαγωγή πολυμερικών αλυσίδων με εμφύτευση (grafting). Η εμφύτευση περιλαμβάνει την ισχυρή προσρόφηση ή χημική σύνδεση ενός πολυμερούς μορίου σε μια επιφάνεια. Η διαδικασία αυτή συνήθως επιτυγχάνεται μέσω ενός παράγοντα σύζευξης που συνδέει μια ελεύθερη ομάδα της επιφάνειας με μια δραστική ομάδα στο άκρο της αλυσίδας του πολυμερούς. Αν και απλή, αυτή η μέθοδος έχει το μειονέκτημα της σχετικά χαμηλής πυκνότητας των εμφυτευμένων πολυμερών, ως αποτέλεσμα της στερεοχημικής παρεμπόδισης από τα ήδη προσκολλημένα πολυμερή. Επίσης, η επιτυχία σύζευξης εξαρτάται και από το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Μετά τη σύζευξη, τα πολυμερή προσπαθούν να λάβουν μια διαμόρφωση ώστε να μεγιστοποιήσουν την εντροπία. Ως αποτέλεσμα δημιουργείται η δομή βούρτσα ή η δομή μανιτάρι.⁷⁰ Για να ξεπεραστούν τα προαναφερθέντα μειονεκτήματα μπορεί να γίνει πολυμερισμός απευθείας πάνω στην επιφάνεια. Αυτή η διαδικασία αναφέρεται ως εμφύτευση από (grafting from) ή επιφάνεια που ενεργοποιείται από πολυμερισμό (surface-initiated polymerization). Όπως υποδηλώνει το όνομα, τα μόρια του μονομερούς πρέπει να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια και στην συνέχεια να λάβει χώρα ο πολυμερισμός αντιστρέψιμης μεταφοράς προσθήκης (reversible addition transfer polymerization) ή οποιαδήποτε άλλη τεχνική ελεγχόμενου πολυμερισμού.⁷¹ Ο ελεγχόμενος πολυμερισμός επιτρέπει τον σχηματισμό πυκνών δομών πολυμερούς στην επιφάνεια καθός και την εμφύτευση πολυμερών αλυσίδων υψηλού μοριακού βάρους στην επιφάνεια. Στην Εικόνα 18 παρουσιάζονται αριστερά δίνονται οι δύο τεχνικές εμφύτευσης και δεξιά οι δομές των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων πολυμερών.⁷²



Εικόνα 18. Εισαγωγή πολυμερικών αλυσίδων σε επιφάνεια με εμφύτευση.

3.2.4 Σιλανοποίηση

Τα σιλάνια βρίσκουν εφαρμογή στην τροποποίηση επιφανειών τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα. Αξιοποιούνται ως ενδιάμεσα μόρια για την πραγματοποίηση διαφόρων αντιδράσεων, ως μέσα διασποράς και ως μέσα για την αύξηση

της υδροφοβικότητας μιας επιφάνειας.⁷³ Τα σιλάνια αξιοποιούνται ευρέως για την τροποποίηση επιφανειών με βιομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, για βιολογικές εφαρμογές μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή χημικών δεσμών.⁷⁴ Πυριτικές επιφάνειες, όπως δισκίδια πυριτίου, γυαλί ή χαλαζίας, μπορούν να τροποποιηθούν με σιλάνια με την προϋπόθεση ότι διαθέτουν επιφανειακές ομάδες υδροξυλίων, με τις οποίες το σιλάνιο αντιδρά μέσω των αλκόξυ-ομάδων σχηματίζοντας δεσμούς σιλοξάνης (-Si-O-Si-). Ο μηχανισμός της σιλανοποίησης παρουσιάζεται στην Εικόνα 19 και βασίζεται στην δημιουργία αυτοοργανωμένων υμενίων (self-assembled monolayers, SAM) η οποία οδηγεί στην συνέχεια στη δημιουργία ομοιπολικών δεσμών.⁷⁵ Πιο αναλυτικά, η αντίδραση τροποποίησης με αλκοξυσιλάνια περιλαμβάνει τέσσερα στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται υδρόλυση των αλκοξυομάδων και σχηματισμός σιλανολών. Όταν η υδρόλυση ολοκληρωθεί, πραγματοποιείται συμπύκνωση των μορίων σιλανίου με ταυτόχρονη αποβολή νερού. Στο τρίτο στάδιο, τα μονομερή σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την πυριτική επιφάνεια, οι οποίοι μετατρέπονται σε ομοιοπολικό δεσμό κατά το στάδιο της θέρμανσης που ακολουθεί.⁷⁶ Παρότι φαίνεται απλός ο μηχανισμός τροποποίησης με σιλάνια δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος ούτε έχει καταστεί δυνατή η ποσοτικοποίηση των δεσμών σιλοξάνης ακόμα και με εφαρμογή των πλέον εξελιγμένων μεθόδων χαρακτηρισμού των επιφανειών.⁷⁷ Εντούτοις τριαλκοξυσιλάνια προτιμώνται έναντι των μονοαλκοξυ- ή διαλκοξυ-σιλανίων λόγω της δυνατότητάς τους να σχηματίζουν περισσότερους δεσμούς σιλοξάνης με το πυριτικό υπόστρωμα και τα γειτονικά σιλάνια. Επίσης, το είδος της αλκοξυ-ομάδας του σιλανίου (μεθοξυ- ή αιθοξυ-) μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα λόγω της διαφορετικής τους συμπεριφοράς σε υδατικό περιβάλλον καθώς παρουσία νερού παρατηρείται ταχύτερη υδρόλυση των μεθοξυ-ομάδων σε σχέση με τις αιθοξυ-ομάδες, η οποία οδηγεί σε περισσότερους δεσμούς σιλοξάνης. Προκειμένου η διαδικασία σιλανοποίησης να είναι περισσότερο ελεγχόμενη και να προκύψουν ομοιόμορφες επιφάνειες συνίσταται: α) η χρήση άνυδρων οργανικών διαλυτών, όπως το τολουόλιο, με προσθήκη μικρής ποσότητας νερού ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός των σιλανίων, β) η χρήση χαμηλών συγκέντρωσεων σιλανίων ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός ολιγομερών, γ) η εφαρμογή ήπιας θέρμανσης ώστε να μειώνεται η πιθανότητα σχηματισμού ασθενών δεσμών αλλά να είναι δυνατή η διάσπαση δεσμών υδρογόνου, δ) η έκπλυση με κατάλληλο οργανικό διαλύτη ή νερό ώστε να απομακρύνονται τα μη προσδεμένα μόρια, και τέλος ε) η τελική θέρμανση να πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία (π.χ. 110 °C) ώστε να συμπυκνωθούν οι σιλανόλες σε σιλοξάνες.⁷⁶



Εικόνα 19. Μηχανισμός τροποποίησης επιφάνειας με αλκοξύδιο του σιλανίου.

Οπως αναφέρθηκε τα σιλάνια μετά την πρόσδεσή τους μεταβάλλουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πυριτικής επιφάνειας και επιτρέπουν την πρόσδεση των βιομορίων είτε με φυσική προσρόφηση ή με χημικό δεσμό.⁷⁷ Η φυσική προσρόφηση επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της μεταβολής των ιδιοτήτων διαβροχής της επιφάνειας ενώ η ομοιοπολική σύνδεση απαιτεί την εισαγωγή κάποιας δραστικής ομάδας η οποία να επιτρέπει είτε την απευθείας σύνδεση του βιομορίου ή την ομοιοπολική σύνδεση μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου, δηλαδή ενός συνδέτη μεταξύ του βιομορίου και του τροποποιημένου υποστρώματος.⁷⁹ Για την εισαγωγή δραστικών ομάδων στην επιφάνεια χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση σιλάνια που φέρουν δραστικές ομάδες όπως αμινο-, καρβοξυ-, θειολο-, εποξυ- ή άλλες ομάδες. Στην Εικόνα 20 παρουσιάζονται οι χημικές δομές και ο τρόπος σύνδεσης στην επιφάνεια στην πυριτική επιφάνεια διαφόρων σιλανίων.



Εικόνα 20. Τροποποίηση πυριτικών επιφανειών με α) αμινο-τριαλκοζυσιλάνιο, β) θειολο-τριαλκοζυσιλάνιο, γ) εποζυ-τριαλκοζυσιλάνιο, και δ) καρβοζυ-τριαλκοζυσιλάνιο.

3.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων

Η ακινητοποίηση των ειδικών βιομορίων αναγνώρισης του αναλύτη στην επιφάνεια του μεταλλάκτη αποτελεί απαραίτητο και κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα. Οι συνηθέστερες μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων παρουσιάζονται σχηματικά στην Εικόνα 21 και περιλαμβάνουν: εγκλεισμό (entrapment), προσρόφηση (adsorption), ομοιοπολική σύνδεση (covalent binding) ή σύνδεση συγγένειας (affinity) αλλά και συνδυασμούς αυτών των μεθόδων.



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων μεθόδων ακινητοποίησης βιομορίων.78

μέθοδος ακινητοποίησης θα πρέπει να εξασφαλίζει την διατήρηση της Η λειτουργικότητας του βιομορίου αλλά και την σταθερότητα κατά την αποθήκευση ώστε να διατηρείται η επιλεκτικότητα της βιομοριακής αλληλεπίδρασης και η υψηλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα των προσδιορισμών. Τα ακινητοποιημένα βιομόρια πρέπει να διατηρούν, κατά το δυνατόν, τη δομή τους μετά την ακινητοποίηση ώστε να διατηρήσουν την βιολογική τους λειτουργία, καθώς επίσης και να παραμένουν σταθερά δεσμευμένα στην επιφάνεια και να μην απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της χρήσης του βιοαισθητήρα. Επιπλέον, ένας ιδανικός βιοαισθητήρας θα πρέπει να παραμένει σταθερός και για μακροχρόνια χρήση. Ως εκ τούτου η μέθοδος ακινητοποίησης επηρεάζει σημαντικά την δραστικότητα και την σταθερότητα των βιοαισθητήρων. Παράγοντες όπως η ακρίβεια των μετρήσεων, η επαναληψιμότητα από αισθητήρα σε αισθητήρα και ο χρόνος ζωής επηρεάζονται δραματικά από την σταθερότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων. Για το λόγο αυτό έχει καταβληθεί έντονη προσπάθεια ώστε να αναπτυχθούν στρατηγικές ακινητοποίησης που να διασφαλίζουν την ευαισθησία και την σταθερότητα των βιοαισθητήρων. Η επιλογή της μεθόδου ακινητοποίησης εξαρτάται από την φύση του βιομορίου αναγνώρισης, τον μεταλλάκτη και τον τρόπο ανίχνευσης της βιομοριακής αντίδρασης. Έτσι η βέλτιστη μέθοδος ακινητοποίησης μπορεί να διαφέρει εάν η εφαρμογή του βιοαισθητήρα απαιτεί μέγιστη ευαισθησία ή

επικεντρώνεται περισσότερο στην σταθερότητα. Η επαναληψιμότητα, το κόστος και η δυσκολία της διαδικασίας ακινητοποίησης πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψιν. Η ευαισθησία μειώνεται εάν η ακινητοποίηση προκαλεί μετουσίωση ή αλλαγές στη δομή του βιομορίου ή εάν παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση με τον αναλύτη λόγω προσανατολισμού του ακινητοποιημένου βιομορίου, όπως π.χ., κατά την σύνδεση ενός ενζύμου σε θέση πλησίον του ενεργού του κέντρου. Μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης μπορεί να επιτευχθεί με την προσανατολισμένη ακινητοποίηση των βιομορίων αναγνώρισης στην επιφάνεια του μεταλλάκτη ή επιλέγοντας την παρεμβολή ενός άλλου μορίου ή στοιβάδας μεταξύ του βιομορίου αναγνώρισης και της επιφάνειας του μεταλλάκτη ώστε τα βιομόρια να εκθέτουν την περιοχή δέσμευσης του αναλύτη προς το διάλυμα. Ως συνδέτες μεταξύ της επιφάνειας και του βιομορίου προτιμώνται τα μακριά και ευλύγιστα μόρια, όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη, που δεν προκαλούν στερεοχημικές παρεμποδίσεις. Πολλές μέθοδοι ακινητοποίησης καταλήγουν σε τυχαία κατανομή ή ανεπαρκή προσανατολισμό των βιομορίων αναγνώρισης προκαλώντας μερική ή ολοκληρωτική απώλεια της δραστικότητας τους είτε λόγω αλλαγής της τριτοταγούς δομής ή παρεμπόδισης της πρόσβασης του αναλύτη στην περιοχή δέσμευσης. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαφόρων μεθόδων ακινητοποίησης βιομορίων συνοψίζονται στον Πίνακα 5. Ακολουθεί σύντομη περιγραφή των διαφόρων μεθόδων ακινητοποίησης.

Πίνακας 5 . Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μεθόδων ακινητοποίησης	//
---	----

Μέθοδοι ακινητοποίησης	Φύση σύνδεσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Προσρόφηση	Ασθενείς δεσμοί	Απλή και εύκολη μέθοδος Σταθερότητα σύνδεσης	Σημαντική απώλεια της δραστικότητας του ακινητοποιημένου βιομορίου Εκρόφηση των ακινητοποιημένων μορίων Μη προσανατολισμένη σύνδεση
Ομοιοπολική σύνδεση	Χημική σύνδεση μεταξύ ενεργών ομάδων του βιομορίου με ομάδες της επιφάνειας του μεταλλάκτη	Σταθερότητα σύνδεσης Δυνατότητα προσανατολισμένης ακινητοποίησης	Σημαντική απώλεια της δραστικότητας του ακινητοποιημένου βιομορίου

Εγκλεισμός	Ενσωμάτωση βιομορίου σε γέλη ή σε πολυμερές	Διατήρηση της δραστικότητας	Φράγμα διάχυσης του αναλύτη προς το βιομόριο αναγνώρισης Διαρροή βιομορίου από το πλέγμα της γέλης ή του πολυμερούς
Συγγένεια	Δεσμοί συγγένειας μεταξύ βιομορίου και μιας ομάδας ή βιομορίου ακινητοποιημένου στον μεταλλάκτη	Ελεγχόμενη και προσανατολισμένη ακινητοποίηση Διατήρηση της δραστικότητας του ακινητοποιημένου βιομορίου Ανάγκη παρουσίας συγκεκριμένων ομάδων ή τμημάτων αλληλεπίδρασης στο βιομόριο με τον ακινητοποιημένο στον μεταλλάκτη συνδέτη	Σημαντική διατήρηση της δραστικότητας του ακινητοποιημένου βιομορίου

3.3.1 Εγκλεισμός

Αυτού του είδους η ακινητοποίηση είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί με την εναπόθεση των βιομορίων, μονομερών, καταλυτών και διαφόρων προσθέτων κατευθείαν στην επιφάνεια. Επειδή δεν λαμβάνει χώρα τροποποίηση του βιολογικού μορίου κατά την διαδικασία ακινητοποίησης διατηρείται σε μεγάλο βαθμό η δραστικότητα του. Είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για την ακινητοποίηση ενζύμων και την κατασκευή ενζυμικών βιοαισθητήρων.⁷⁹ Βιοαισθητήρες που βασίζονται στον φυσικό εγκλεισμό ενζύμων χαρακτηρίζονται από υψηλή λειτουργική σταθερότητα αλλά και σταθερότητα κατά την αποθήκευση. Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιοι περιορισμοί που προέρχονται από το γεγονός ότι μπορεί να υπάρξει διαρροή του βιομορίου από το δίκτυο της γέλης ή του πολυμερούς.⁷⁹

3.3.2 Προσρόφηση

Η προσρόφηση βιομορίων στην επιφάνεια του μεταλλάκτη αποτελεί την ευκολότερη μέθοδο φυσικής ακινητοποίησης καθώς για την ακινητοποίηση το βιομόριο σε διάλυμα

επωάζεται με το στερεό υπόστρωμα για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο και ακολούθως η ποσότητα που δεν έχει προσροφηθεί ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα. Ο μηχανισμός της προσρόφησης βασίζεται σε ασθενείς δεσμούς, όπως δυνάμεις Van der Waal's, ηλεκτροστατικές ή και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Έχει διαπιστωθεί ότι κατά την προσρόφηση επέρχονται αλλαγές στην τριτοταγή διαμόρφωση των πρωτεϊνικών μορίων που έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγή στη λειτουργικότητάς τους.⁸⁰ Οι αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνικών μορίων κατά την προσρόφησή τους στην επιφάνεια στερεών φορέων σχετίζονται με τη μετακίνηση υδρόφοβων τμημάτων της πρωτεΐνης που σε διάλυμα βρίσκονται στο εσωτερικό της προς την εξωτερική επιφάνεια, ώστε να ενισχυθεί η αλληλεπίδραση με την υδρόφοβη επιφάνεια του στερεού. Σε αυτό αποδίδεται και το ότι πρωτεϊνικά μόρια που έχουν προσροφηθεί σε υδρόφιλες επιφάνειες όπως οι υδρογέλες ή οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, όπου ένα μεγάλο ποσοστό αλληλεπιδράσεων είναι υδρόφιλου χαρακτήρα, διατηρούν τη λειτουργικότητά τους σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα προσροφημένα σε υδρόφοβες επιφάνειες. Γεγονός είναι ότι, παρά την εκτεταμένη καταστροφή των πρωτεϊνικών μορίων κατά την προσρόφησή τους στην επιφάνεια των μεταλλακτών με φυσική προσρόφηση η μέθοδος εξακολουθεί να εφαρμόζεται ευρέως, και ο λόγος είναι ότι η τεχνική της προσρόφησης είναι απλή στην εφαρμογή της, το μικρό δε ποσοστό των δραστικών μορίων που παραμένει είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αρκετό για την εφαρμογή για την οποία προορίζεται.

3.3.3 Ομοιοπολική ακινητοποίηση

Η ομοιοπολική σύνδεση βιομορίων στην επιφάνεια των μεταλλακτών σήματος είναι μια επίσης δημοφιλής μέθοδος ακινητοποίησης που εφαρμόζεται στην κατασκευή βιοαισθητήρων. Η μέθοδος βασίζεται σε αντιδράσεις μεταξύ δραστικών ομάδων που υπάρχουν ή έχουν εισαχθεί στα βιομόρια (π.χ., ε-αμινομάδες λυσίνης στα μόρια των πρωτεϊνών) με ομάδες που υπάρχουν ή έχουν εισαχθεί στην επιφάνεια του μεταλλάκτη π.χ., μέσω τροποποίησης με σιλάνια που φέρουν πλευρικές αλυσίδες με δραστικές ομάδες. Επιπλέον, η ομοιοπολική ακινητοποίηση των βιομορίων μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση κάποιων διδραστικών αντιδραστηρίων (π.χ., γλουταραλδεΰδη, γλυοξάλη, εξαμεθυλενδιαμίνη, μαλεϊμιδοεστέρες) που αντιδρούν με τις ομάδες που υπάρχουν στην επιφάνεια και τις μετατρέπουν σε ομάδες κατάλληλες για απευθείας αντίδραση με ομάδες που υπάρχουν στο

βιομόριο. Στην Εικόνα 22 παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες από τις αντιδράσεις που μπορούν να εφαρμοστούν για την ομοιοπολική σύνδεση βιομορίων σε επιφάνειες. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση βιομορίων στην επιφάνεια μεταλλακτών είναι ελκυστική λόγω των ισχυρών χημικών δεσμών που επιτυγχάνονται μεταξύ της επιφάνειας και των βιομορίων. Το κύριο μειονέκτημα της είναι η μερική απώλεια της δραστικότητας των ακινητοποιημένων βιομορίων δτην διαμόρφωση ή σύνδεση σε περιοχή κοντά στην θέση δέσμευσης του αναλύτη, π.χ, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ή στην θέση δέσμευσης του αντισώματος.⁸⁰



Εικόνα 22. Παραδείγματα αντιδράσεων ομοιοπολικής πρόσδεσης βιομορίων σε στερεούς φορείς.

3.3.4 Σύνδεση συγγένειας

Όπως αναφέρθηκε η απευθείας ακινητοποίηση βιομορίων στην επιφάνεια των μεταλλακτών οδηγεί πολλές φορές είτε σε απώλεια της δραστικότητας τους είτε σε τυχαίο προσανατολισμό με αποτέλεσμα μικρό ποσοστό των ακινητοποιημένων μορίων να είναι προσβάσιμο στον αναλύτη. Για τους λόγους αυτούς έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για ακινητοποίηση βιομορίων με εκμετάλλευση δεσμών (βιο)συγγένειας ανάμεσα σε μια ομάδα ή βιομόριο που έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του μεταλλάκτη (π.χ., λεκτίνη, αβιδίνη, βιοτίνη, γημικές ενώσεις μετάλλων) με μια συγκεκριμένη ομάδα στο βιομόριο (π.γ., υδατάνθρακικό τμήμα, βιοτίνη, ιστιδίνη). Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την ακινητοποίηση του βιομορίου με συγκεκριμένο προσανατολισμό ώστε να αποφευγθεί η απενεργοποίηση του ή/και γίνει παρεμπόδιση της ενεργής του περιοχής. Έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι συγγένειας για την ακινητοποίηση βιομορίων μέσω του συστήματος (στρεπτ)αβιδίνηςβιοτίνης, λεκτίνης-υδατάνθρακα και αλληλεπιδράσεις μεταλλικού κατιόντος-χηλικού συμπλέκτη. Το βιομόριο μπορεί να εμπεριέχει τις ομάδες συγγένειας στην αλληλουχία του (π.χ., ένα τμήμα σακχάρου) αλλά σε αρκετές περιπτώσεις, οι ομάδες συγγένειας (π.χ., βιοτίνη) γρειάζεται να εισαγθούν στο βιομόριο είτε μέσω ομοιοπολικής αντίδρασης ή μέσω μεθόδων γενετικής μηγανικής όπως η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, η τεγνολογία πρωτεϊνικής σύντηξης και η μετα-μεταγραφική τροποποίηση. Ειδικά για την προσανατολισμένη ακινητοποίηση αντισωμάτων σε επιφάνειες μεταλλακτών έχουν χρησιμοποιηθεί πρωτεΐνες βακτηριδίων που δεσμεύουν ανοσοσφαιρίνες όπως η πρωτεΐνη Α που λαμβάνεται από το Staphylococcus aureus και η πρωτεΐνη G που λαμβάνεται από διάφορα στελέχη Streptococcus και μπορούν να δεσμεύουν σταθερά διάφορες ανοσοσφαιρίνες μετά την ακινητοποίηση τους.⁸¹ Επίσης αντισώματα μπορούν να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια μεταλλακτών μέσω ενός ακινητοποιημένου δευτέρου αντισώματος δηλαδή ένος αντισώματος που έχει αναπτυχθεί σε ένα είδος ζώου έναντι των γ-σφαιρινών κάποιου άλλου είδους (π.χ., αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού.82

3.4 Τροποποίηση επιφανειών πυριτίου με (3-αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο (APTES) για πρόσδεση πρωτεϊνικών μορίων

Το (3-αμινοπροπυλο)-τριαιθοξυσιλάνιο ή APTES όπως είναι η συντομογραφία του είναι ένα σιλάνιο που χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή ελεύθερων αμινομάδων σε επιφάνειες πυριτίου (Εικόνα 20α). Η χρήση του APTES (και εν γένει των τεχνικών σιλανοποίησης) πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες τεχνικές επιφανειακής τροποποίησης λόγω της χαμηλής πυκνότητας των δραστικών ομάδωνοι οποίες προστίθενται στην επιφάνεια (περίπου 6 ομάδες NH₂/nm²). Από την άλλη όμως, τα σιλάνια παρουσιάζουν το μειονέκτημα της εξαιρετικής ευαισθησίας στην υγρασία της ατμόσφαιρας, με συνέπεια η ποιότητα της τροποποίησης να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες συντήρησής τους ν και την αυστηρή τήρηση των προδιαγραφών της διαδικασίας σιλανοποίησης. Οι τεχνικές τροποποίησης επιφανειών με το APTES διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, αυτές που πραγματοποιούνται σε κενό και αυτές οι οποίες πραγματοποιούνται σε διάλυμα.

Για την τροποποίηση υπό κενό, τα δείγματα τοποθετούνται στο εσωτερικό ενός ξηραντήρα μαζί με μία μικρή ποσότητα APTES και παραμένουνεκείγια χρόνους που κυμαίνονται από 30 λεπτά μέχρι 2 ώρες, αφού εξαχθεί ο αέρας από τον ξηραντήρα ώστε να δημιουργηθεί μια ατμόσφαιρα κορεσμένη σε ατμούς APTES.⁸³ Αν η τροποποίηση πραγματοποιηθεί σε υψηλή θερμοκρασία, π.χ., στους 100 °C, η απόδοση της αντίδρασης της επιφάνειας με το APTES επιταχύνεται σημαντικά. Αυτό όμως δεν είναι πάντα επιθυμητό καθώς ο σημαντικότερος λόγος, για τον οποίο προτιμάται η σιλανοποίηση υπό κενό, είναι η επίτευξη χαμηλής συγκέντρωσης σιλανίων στην επιφάνεια, για αποφυγή τόσο του πολυμερισμού τους, της δημιουργίας πολυμοριακών υμενίων και της αύξησης της τραχύτητας της επιφάνειας αλλά και για τη μείωση του πλήθους των διαθέσιμων ομάδων για ακινητοποίηση των βιομορίων.⁸⁴ Για επιπλέον έλεγχο της συγκέντρωσης των αμινομάδων στην επιφάνεια, η σιλανοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί από μίγμα ατμών APTES και μεθυλοτριαιθοζυσιλάνιου.⁸⁵

Η σιλανοποίηση σε διάλυμα προϋποθέτει τη χρήση οργανικού διαλύτη, καθώς σε υδατικά διαλύματα το APTES πολυμερίζεται. Συνήθως χρησιμοποιείται ως διαλύτης τολουόλιο και πιο σπάνια ακετόνη ή χλωροφόρμιο, στο οποίο το APTES διαλύεται συνήθως σε τελική συγκέντρωση 5% (o/o). Ο χρόνος επώασης με το διάλυμα APTES είναι συνήθως μία ώρα, αλλά μετά την έκπλυση με καθαρό διαλύτη απαιτείται περαιτέρω θερμική κατεργασία των

επιφανειών σε υψηλή θερμοκρασία, π.χ., 100 °C, προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του διαλύτη από την επιφάνεια και οι αλυσίδες του APTES να ευθυγραμμιστούν σε όσο το δυνατό πιο κατακόρυφη διάταξη.⁸⁶ Για την ακινητοποίηση των βιομορίων στις τροποποιημένες με APTES επιφάνειες θα πρέπει είτε οι αμινομάδες της επιφάνειες είτε ομάδες στο βιομόριο να ενεργοποιηθούν κατάλληλα ώστε να μπορούν να αντιδράσουν απευθείας μεταξύ τους. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται σε χρήση κάποιων ενδιάμεσων μορίων που καλούνται συνδέτες (linkers). Οι συνδέτες αυτοί διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν φέρουν ενός είδους ελεύθερη δραστική ομάδα (homobifunctional) ή δύο διαφορετικές δραστικές ομάδες (heterobifunctional). Παράδειγμα συνδέτη με δύο ίδιες δραστικές ομάδες είναι η γλουταραλδεΰδη, η οποία χρησιμοποιείται για να συνδέσει βιομόρια μέσω αμινομάδων σε επιφάνειες επίσης τροποποιημένες με αμινομάδες, ενώ παράδειγμα συνδέτη με δύο διαφορετικές δραστικές ομάδες είναι ο ηλεκτριμιδυλο εστέρας του 4-(μαλεϊμιδοφαινυλο)βουτυρικού οξέος (SPMB) ο οποίος χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσο για την αντίδραση μεταξύ αμινομάδων και θειολομάδων. Εκτός από το είδος των δραστικών ομάδων το μήκος των μορίων των συνδετών ποικίλει σημαντικά. Ως εκ τούτου, μία παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή κατάλληλου συνδέτη είναι το κατά πόσο είναι επιθυμητό το βιομόριο να είναι περισσότερο ή λιγότερο απομακρυσμένο από την επιφάνεια. Αυτό καθορίζεται από την πυκνότητα του βιομορίου στην επιφάνεια και τη δομή των μορίων στο χώρο (γραμμικές αλυσίδες, ογκώδεις και άκαμπτοι δακτύλιοι κ.λπ.) και το πόσο αυτό επηρεάζει την αλληλεπίδραση του με τον αναλύτη, χαρακτηριστικά που συνοψίζονται στην έννοια της στερεοχημικής παρεμπόδισης.⁸⁷ Στην Εικόνα 23 παρουσιάζονται κάποιες από τις αντιδράσεις με χρήση συνδετών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση βιομορίων σε επιφάνειες πυριτίου τροποποιημένες με APTES.



Εικόνα 23. Παραδείγματα αντιδράσεων ομοιοπολικής πρόσδεσης βιομορίων σε επιφάνειες πυριτίου τροποποιημένες με APTES: (i) πρόσδεση με χρήση γλουταραλδεΰδης ως συνδέτη, (ii) μετατροπή των αμινομάδων σε καρβολυλομάδες με ηλεκτρικό ανυδρίτη και ενεργοποίηση με καρβοδιιμίδιο/ηλεκτριμίδιο, και (iii) αντίδραση με ενεργό ηλεκτρίμιδο εστέρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Ο χαρακτηρισμός της επιφάνειας ενός αισθητήρα μετά την χημική ή/και την βιολογική ενεργοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικιλία μεθόδων οι οποίες δίνουν διαφορετικές πληροφορίες σχετικά με την επιφάνεια. Για παράδειγμα με χρήση φθορισμοσημασμένων μορίων και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού μπορεί να εκτιμηθεί συγκριτικά η απόδοση μιας μεθόδου χημικής/βιολογικής ενεργοποίησης ως προς την ποσότητα των βιομορίων που ακινητοποιούνται αλλά και την ομογένεια του βιομοριακού υμενίου σε μικροκαι μακροσκοπικό επίπεδο. Με εφαρμογή μεθόδων όπως η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) και η μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά την ομοιογένεια και την οργάνωση των βιομορίων στην νανο- και μικρο-κλίμακα. Μέθοδοι όπως η φασματοσκοπία ακτίνων X (XPS) και η φασματοσκοπία μάζας χρόνου πτήσης δευτερογενών ιόντων (ToF-SIMS) παρέχουν πληροφορίες για τη χημική σύσταση της επιφάνειας. Ενώ τεχνικές γαρακτηρισμού των ιδιοτήτων διαβροχής μιας επιφάνειας όπως η μέτρηση της γωνίας επαφής δίνουν πληροφορίες σχετικά με την υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα της επιφάνειας που μπορεί να επηρεάσει την ακινητοποίηση βιομορίων στις χημικά τροποποιημένες επιφάνειες των βιοαισθητήρων. Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των διαφόρων μεθόδων χαρακτηρισμού επιφανειών βιοαισθητήρων.88

4.1 Μικροσκοπία φθορισμού

Μία μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πιστοποίηση της παρουσίας ή όχι μίας ουσίας σε μια επιφάνεια είναι η μικροσκοπία φθορισμού (fluorescence microscopy). Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως όταν αυτά διεγείρονται από δεδομένου μήκους κύματος ακτινοβολία. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι η παρουσία φθορίζουσας ουσίας είτε ως μορίου-στόχου της ανίχνευσης (άμεση μέθοδος), είτε ως σήμανση (ιχνηθέτης) στην ουσία ενδιαφέροντος (έμμεση μέθοδος). Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μέθοδος οπτικής μικροσκοπίας κατά την

οποία το φως αλληλεπιδρά με φθορίζουσα ουσία η οποία απορροφά φως συγκεκριμένου μήκους κύματος και εκπέμπει ακτινοβολία χαμηλότερης ενέργειας δηλαδή μεγαλύτερου μήκους κύματος. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως με την παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης και φάσμα εκπομπής της ακτινοβολίας, τα οποία εξαρτώνται από τη δομή στο χώρο και την ηλεκτρονιακή κατανομή. Για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, χρησιμοποιούνται κατάλληλα φίλτρα, ανάλογα με το φάσμα εκπομπής της εκάστοτε ουσίας.89 Η αργή λειτουργίας του μικροσκοπίου φθορισμού είναι η ίδια με αυτή του κοινού οπτικού μικροσκοπίου αλλά οι φακοί είναι ειδικής κατασκευής από γυαλί που δεν εμφανίζει αυτοφθορισμό. Το φως παράγεται από λυχνία και συγκεντρώνεται από ένα συμπυκνωτή φακό επάνω στο δείγμα. Καθώς το φως περνά μέσα από το αντικείμενο δημιουργεί μια εικόνα με την αρχή της διάθλασης. Την εικόνα αυτή λαμβάνει ένας πρώτος φακός που είναι και μεγεθυντικός (ονομάζεται αντικειμενικός), ενώ στη συνέχεια την εικόνα του αντικειμενικού φακού παραλαμβάνει ο προσοφθάλμιος φακός (είναι ο φακός στον οποίο κοιτάζει το μάτι του ερευνητή). Η μεγέθυνση που προκύπτει είναι το γινόμενο της διαθλαστικής ισχύος του αντικειμενικού επί την ισχύ του προσοφθάλμιου φακού. Η εικόνα που παρέχεται από τα οπτικά μικροσκόπια είναι έγγρωμη, καθώς δημιουργείται με διάθλαση και απορρόφηση του φωτός.⁹⁰ Στην εικόνα 24 παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου φθορισμού.



Εικόνα 24. Σχηματικό διάγραμμα αρχής λειτουργίας του μικροσκοπίου φθορισμού.

Η χρήση φθοριζόντων ιχνηθετών είναι διαδεδομένη, αφενός διότι οι περισσότερες ουσίες δεν εμφανίζουν «αυτοφθορισμό» (ή «πρωτογενή φθορισμό»), αφετέρου επειδή παρέχουν τη δυνατότητα στόχευσης συγκεκριμένων μορίων μέσω πρόσδεσης των φθοριζόντων ιχνηθετών σε αυτά («δευτερογενής φθορισμός»). Χαρακτηριστικά παραδείγματα φθοριζουσών ουσιών είναι η φθορεσκεΐνη (FITC), οι ροδαμίνες (Texas Red) και τα κυανίδια (Cy3, Cy5). Η ένταση φθορισμού των ουσιών αυτών εκφράζεται μέσω ενός συντελεστή μοριακής απορρόφησης, (attenuation $\dot{\eta}$ extinction coefficient).⁹¹ O συντελεστής αυτός εκφράζει πόσο ισχυρά μία ουσία μπορεί να απορροφήσει ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Όσο μεγαλύτερη η τιμή αυτού του συντελεστή, τόσο εντονότερος είναι ο φθορισμός της ουσίας. Σημαντικός περιορισμός της μεθόδου είναι η περιορισμένη σταθερότητα πολλών φθοριζουσών ουσιών και η εξάρτηση του σήματος φθορισμού από παράγοντες όπως το pH, κ.α.. Επίσης, η ένταση φθορισμού τείνει να μειώνεται, και μάλιστα ταχύτατα, όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης στο φως, φαινόμενο γνωστό ως φωτοαπογρωματισμός (photobleaching) το οποίο οφείλεται σε μη αντιστρεπτή φωτογημική διάσπαση των γρωμοφόρων ομάδων του μορίου. Ένας επιπλέον περιοριστικός παράγοντας είναι η παρουσία στο δείγμα που μελετάται ουσιών με αυτοφθορισμό που μειώνει την αντίθεση κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο και εποιμένως την καθαρότητα της λαμβανόμενης εικόνας.⁹² Σε κάθε περίπτωση ο φθορισμός που εκπέμπεται μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω ειδικού λογισμικού ανάλυσης εικόνων ώστε να είναι δυνατές οι συγκρίσεις μεταξύ των εικόνων. Κατά την επεξεργασία αυτή, είναι δυνατό να εξαλειφθεί ο αυτοφθορισμός ουσιών που συνυπάρχουν στο δείγμα. Η τεχνική πλεονεκτεί ως προς την ευαισθησία, καθώς μπορούν να ανιχνευτούν ακόμα και χαμηλές συγκεντρώσεις φθοριζουσών ουσιών, και την εξειδίκευση, δεδομένου ότι η πρόσδεση της φθορίζουσας ουσίας μπορεί να γίνει αποκλειστικά στο μόριο ενδιαφέροντος. Επιπλέον, αποτελεί μία μέθοδο ταχεία και απλή στην εφαρμογή της, μιας και δεν απαιτεί ιδιαίτερη προετοιμασία των δειγμάτων και αρκετά επαναλήψιμη με την προϋπόθεση ότι ακολουθείται αρκετά πιστά ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο τόσο κατά την προετοιμασία των επιφανειών όσο και κατά την επεξεργασία των εικόνων.93

4.2 Μέθοδοι προσδιορισμού ιδιοτήτων διαβροχής

Η γωνία διαβροχής είναι η γωνία που δημιουργείται μεταξύ μίας υγρής σταγόνας που επικάθεται σε στερεή επιφάνεια (εικόνα 25). Η γωνία αυτή είναι συγκεκριμένη για κάθε σύστημα στερεού/υγρού που μελετάται, και αποτελεί μέτρηση η οποία χαρακτηρίζει τις τάσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των φάσεων που έρχονται σε επαφή.⁹⁴



Εικόνα 25. Σταγόνα υγρού η οποία επικάθεται σε επιφάνεια στερεού. Ορισμός γωνίας διαβροχής.

Η τελική μορφή της σταγόνας εξαρτάται από την ισορροπία των μοριακών δυνάμεων του υγρού και των δυνάμεων αλληλεπίδρασης υγρού και στερεού. Η διαβροχή ενός στερεού εξαρτάται από τη σύσταση (υλικό), την ομοιογένεια και την τραχύτητα της εξωτερικής του επιφάνειας. Η ισχύς της αλληλεπίδρασης με το υγρό εξαρτάται από τη πολικότητα ή μη του υλικού.⁹⁵ Κατά τη διεπαφή μίας στερεής επιφάνειας με νερό, στην περίπτωση μερικής διαβροχής, εάν η γωνία επαφής είναι μεταξύ 0° και 10° η επιφάνεια καλείται υπερυδρόφιλη, εάν είναι μικρότερη των 90°, η επιφάνεια χαρακτηρίζεται ως υδρόφοβη, ενώ για τιμές από 150° έως 180° η επιφάνεια χαρακτηρίζεται ως υπερυδρόφοβη. Στην εικόνα 26 που ακολουθεί φαίνεται η μορφή της σταγόνας για τις τέσσερις προαναφερθείσες περιπτώσεις διαβροχής.⁹⁶



Εικόνα 26. Χαρακτηρισμός επιφανειών ως προς τις ιδιότητες διαβροχής.

Γενικά, υγρά με υψηλή επιφανειακή τάση τείνουν να δώσουν πεπερασμένη, μη μηδενική γωνία επαφής. Πρέπει να αναφερθεί ότι η δύναμη αλληλεπίδρασης στην περίπτωση αυτή είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια συνάφειας μεταξύ υγρών και στερεών. Η μορφή μίας σταγόνας η οποία ισορροπεί σε στερεό υπόστρωμα εξαρτάται από τις φυσικές ιδιότητες του στερεού, και του περιβάλλοντος ρευστού, το οποίο τις περισσότερες φορές είναι ο αέρας. Καθώς η σταγόνα έρχεται σε επαφή με τη στερεή επιφάνεια μπορεί να πάρει διαφορετικές μορφές, είτε μορφή τμήματος έλλειψης (οπότε η διαβροχή χαρακτηρίζεται ως ολική), είτε μορφή σφαίρας (οπότε έχουμε μηδενική διαβροχή).⁹⁴ Οι τρεις παραπάνω περιπτώσεις θα αναλυθούν εκτενέστερα.

Στην περίπτωση μερικής διαβροχής (Εικόνα 27) το υγρό διαβρέχει μερικώς τη στερεή επιφάνεια. Η ισορροπία δυνάμεων εκφράζεται μέσω της ακόλουθης σχέση: $\gamma_{sv} = \gamma_{ls} + \gamma_{lv} \cos \theta$ όπου θ η γωνία διαβροχής, που μπορεί να πάρει τιμές από 0 έως 180°.



Εικόνα 27. Σταγόνα υγρού η οποία επικάθεται σε επιφάνεια στερεού με μερική διαβροχή. Απεικόνιση των διεπιφανειών στερεού/αερίου, υγρού/αερίου και στερεού/υγρού, και των αντίστοιχων επιφανειακών τάσεων.

Στην περίπτωση της ολικής διαβροχής (εικόνα 28) η γωνία θ δεν ορίζεται πλέον. Στην περίπτωση αυτή ισχύει ότι: $\gamma_{sl} > \gamma_{sv} + \gamma_{lv}$



Εικόνα 28. Σταγόνα υγρού η οποία επικάθεται σε επιφάνεια στερεού με ολική διαβροχή.

Στην περίπτωση μηδενικής διαβροχής το υγρό έχει τη μορφή σφαίρας και ισχύει ότι:

 $\gamma_{sl}\ <\gamma_{sv}+\gamma_{lv}$

Στην εικόνα 28 απεικονίζεται η μηδενική διαβροχή σταγόνας που επικάθεται σε στερεή επιφάνεια. Είναι εμφανές πως η γωνία επαφής θ είναι 180 μοίρες.



Εικόνα 29. Σταγόνα υγρού η οποία επικάθεται σε επιφάνεια στερεού με μηδενική διαβροχή.

Με βάση τις εξισώσεις (18), (19) ορίζεται η παράμετρος διάβροχης S η οποία μπορεί να υπολογιστεί ως εξής: $S = \gamma_{sl} - (\gamma_{sv} + \gamma_{lv})$

Αν η παράμετρος διαβροχής παίρνει θετικές τιμές το υγρό διαβρέχει πλήρως τη στερεή επιφάνεια πάνω στην οποία επικάθεται, ενώ σε αντίθετη περίπτωση το υγρό παίρνει τη μορφή σταγόνας.⁹⁵

4.3 Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)

Η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) είναι η ιδανική μέθοδος για την απεικόνιση της επιφανειακής νανο-δομής πολλών υλικών και τον προσδιορισμό της επιφανειακής τραχύτητας. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται το γεγονός ότι είναι μη-καταστροφική και έχει πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα στις τρεις διαστάσεις. Στο Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης χρησιμοποιείται μια δοκός με μια ακίδα στην άκρη της, η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος και κάμπτεται ως αποτέλεσμα των δυνάμεων συνάφειας που αναπτύσσονται μεταξύ της ακίδας και του δείγματος. Στην Εικόνα 30 παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης. Καθώς η ράβδος κάμπτεται, μια δέσμη λέιζερ που ανακλάται σε μια

φωτοδίοδο στην θέση Α μετακινείται στην θέση Β. Προσδιορίζοντας τη διαφορά (Α – Β), μπορούν να υπολογιστούν οι μεταβολές στην κάμψη της ράβδου και συνεπώς, σύμφωνα με το νόμο του Hooke για μικρές μετατοπίσεις, η δύναμη αλληλεπίδρασης μεταξύ της ακίδας και του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να υπολογιστούν μικρής εμβέλειας διατομικές δυνάμεις και δυνάμεις τριβής καθώς και μεγάλης εμβέλειας ηλεκτροστατικές ή μαγνητοστατικές δυνάμεις. Το δείγμα μπορεί να είναι είτε αγώγιμο ή μονωτικό. Η κίνηση της ακίδας ελέγχεται από μια συσκευή εξαιρετικής ακρίβειας κατασκευασμένη από πιεζοηλεκτρικά κεραμικά με εφαρμογή τάσεων σε ηλεκτρόδια στις x, y και z διαστάσεις (ο z άξονας είναι κάθετος στο δείγμα). Ο πιεζοηλεκτρικός σαρωτής μπορεί να έχει διακριτική ικανότητα πικομέτρου. Ανάλογα με τον τρόπο επαφής ακίδας-δείγματος, η Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης διακρίνεται στη μέθοδο με συνεχή επαφή (contact mode), η οποία χρησιμοποιείται σε σκληρά και ανθεκτικά δείγματα και στη μέθοδο με περιοδική επαφή ταλάντωσης (tapping mode), η οποία χρησιμοποιείται κυρίως σε μαλακά ή/και εύθραυστα δείγματα (πολυμερή, πρωτεΐνες κλπ).⁹⁷



Εικόνα 30 . Αρχή λειτουργίας μικροσκοπίου ατομικής δύναμης.

4.4 Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM)

Η λειτουργία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, βασίζεται στην χρήση μιας δέσμης ηλεκτρονίων μεγάλης κινητικής ενέργειας που καθώς προσπίπτει στην περιοχή του δείγματος που πρόκειται να μελετηθεί, αλληλεπιδρά με αυτό δημιουργώντας μια ποικιλία σημάτων, συμπεριλαμβανομένων ηλεκτρονίων, φωτονίων και άλλων. Υπάρχουν τρεις τύποι ηλεκτρονίων που εκπέμπονται από την επιφάνεια ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των ηλεκτρονίων της δέσμης με την επιφάνεια του δείγματος: α) τα δευτερογενή ηλεκτρόνια με ενέργεια <50 eV, β) τα ηλεκτρόνια Auger που παράγονται από την αποδιέγερση των διεγειρόμενων ατόμων και γ) τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια ιδίας ενέργειας με αυτή των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων (Εικόνα 31). Η δέσμη των ηλεκτρονίων που προέρχεται από το δείγμα συλλέγεται και επεξεργάζεται με τη βοήθεια του προγράμματος που συνοδεύει το SEM οδηγώντας σε μια τρισδιάστατη εικόνα της εξωτερικής επιφάνειας της δομής. Πριν τη μέτρηση, τα δείγματα επιμεταλλώνονται με εναπόθεση ενός λεπτού στρώματος πλατίνας ώστε να μη φορτίζεται η επιφάνεια από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν πάνω της. Η σάρωση της επιφάνειας μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χρησιμοποιώντας τα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια (secondary electron image, SEI) ή τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (backscattered electron image, BEI).⁹⁸



Εικόνα 31. Αρχή λειτουργίας μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων.

4.5 Φασματοσκοπία εκπομπής ακτίνων Χ

Η φασματοσκοπία εκπομπής ακτίνων-Χ αποτελεί πειραματική αναλυτική τεχνική, η οποία επιτρέπει την στοιχειακή ανάλυση δείγματος, τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική. Βασίζεται στην ακτινοβόληση του δείγματος με ιονίζουσα ακτινοβολία υψηλής ενέργειας. Η πρωτογενής αυτή ακτινοβολία μπορεί να είναι φωτόνια ακτίνων-Χ, φωτόνια ακτίνων-γ, ηλεκτρόνια, πρωτόνια ή φορτισμένα σωμάτια. Ο βομβαρδισμός του δείγματος με ενεργητικά
σωμάτια (ενέργειες της τάξης των keV ή και μεγαλύτερες) έχει ως αποτέλεσμα τον ιονισμό εσωτερικών τροχιακών των ατόμων. Ακολούθως, τα ιονισμένα άτομα αποδιεγείρονται εκπέμποντας φωτόνια χαρακτηριστικής ενέργειας, για κάθε άτομο του περιοδικού πίνακα. Οι ενέργειες των εκπεμπόμενων από το δείγμα φωτονίων αποτελούν δακτυλικό αποτύπωμα του ατόμου που τα εκπέμπει (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Βομβαρδισμός δείγματος με ιονίζουσα ακτινοβολία. Τα άτομα του δείγματος ιονίζονται και στη συνέχεια αποδιεγείρονται εκπέμποντας χαρακτηριστική, για κάθε άτομο του περιοδικού πίνακα, ακτινοβολία ακτίνων-Χ. Μέτρηση της ενέργειας και της έντασης των φωτονίων, επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική στοιχειακή ανάλυση του δείγματος.

Η ενέργεια των εκπεμπόμενων χαρακτηριστικών φωτονίων και η αντίστοιχη έντασή τους (φωτόνια/sec) καταγράφεται με τη βοήθεια κατάλληλης πειραματικής διάταξης, το φασματοσκόπιο ακτίνων Χ, τα βασικά μέρη του οποίου απεικονίζονται στην Εικόνα 33. Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός φασματοσκοπίου ακτίνων-Χ είναι: η ιονίζουσα πηγή ακτινοβολίας που ακτινοβολεί με ενεργητικά σωματίδια (φωτόνια, ηλεκτρόνια, κλπ.) το δείγμα και προκαλεί τον εσωτερικό ιονισμό των ατόμων, ο δειγματοφορέας όπου τοποθετείται το προς ανάλυση δείγμα, ο ανιχνευτής φωτονίων ακτίνων-Χ, και το σύστημα συλλογής δεδομένων.



Εικόνα 33. Φασματοσκόπιο εκπομπής ακτίνων-Χ.

Η φασματοσκοπία εκπομπής ακτίνων-Χ είναι πολυστοιχειακή τεχνική χαρακτηρισμού, μη-καταστροφική, φιλική προς το περιβάλλον, γρήγορη, με υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Δυνητικά, όλα τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα, από το βηρύλλιο (Z=3) και πάνω, μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά και ποσοτικά. Τα δείγματα μπορεί να είναι στερεά ή υγρά. Λόγω της απλών και μη χρονοβόρων απαιτήσεων προετοιμασίας των δοκιμίων, η φασματοσκοπία εκπομπής ακτίνων-Χ αποτελεί γενική μέθοδο ανάλυσης, κοινώς αποδεκτή στα πεδία της έρευνας και των διαδικασιών βιομηχανικού ελέγχου. Για την ποιοτική ανάλυση δεν απαιτείται διάλυση/καταστροφή του δείγματος. Στην ποσοτική ανάλυση η διαδικασία της προετοιμασίας των δοκιμίων είναι τουλάχιστον το ίδιο σημαντική όσο και η ποιότητα των μετρήσεων. Για ποσοτική ανάλυση ένα ιδανικό δοκίμιο πρέπει να είναι προετοιμασμένο έτσι ώστε να είναι: α) αντιπροσωπευτικό του υλικού, β) ομογενές, γ) γνωστού πάχους και δ) να μην εμφανίζει επιφανειακές ανωμαλίες. Τα τυπικά όρια ανίχνευσης ιχνοστοιχείων κυμαίνονται από 0,1 μέχρι 10 ppm ανάλογα με τον ατομικό αριθμό του στοιχείου και τη σύσταση του δείγματος.⁹⁹

4.6 Φασματοσκοπία μάζας χρόνου πτήσης δευτερογενών ιόντων (ToF-SIMS)

Η μέθοδος ToF-SIMS είναι μια μέθοδος φασματομετρίας μάζας που χρησιμοποιεί αυτά καθαυτά τα άτομα του δείγματος για την ανάλυση, οπότε σημειακά το δείγμα καταστρέφεται.

Αυτό μπορεί να φαίνεται αρχικά μη επιθυμητό αλλά παρέχει τη δυνατότητα να αναλύωνται σημεία κάτω από την επιφάνεια του δείγματος παρέχοντας τη σύσταση του δείγματος σε βάθος. Συνδυασμός αυτής της δυνατότητας με σάρωση της επιφάνειας του δείγματος παρέχει την δυνατότητανα διερεύνησης της χημικής σύστασης του δείγματος στις τρεις διαστάσεις.¹⁰⁰

Η τεχνική ToF-SIMS αυτή έχει μεγάλη ευαισθησία (για ορισμένα στοιχεία κάτω του ppb) οπότε είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση ιχνοστοιχείων. Τα υψηλότερης διακριτικής ικανότητας συστήματα μπορούν εύκολα να διαχωρίσουν και τα ισότοπα των περισσότερων από τα στοιχεία για ισοτοπικές αναλύσεις. Επιπλεόν η μέθοδος παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης όλων των στοιχείων από το υδρογόνο έως μοριακά ιόντα με μάζα μεγαλύτερη από 600 amu (atomic mass units - μονάδες ατομικής μάζας) και αυτό σε πάρα πολύ μικρό χρόνο. Ως εκ τούτου η μέθοδος έχει εφαρμοστεί στην ανάλυση και χαρακτηρισμό ανόργανων και οργανικών υλικών, όπως π.χ. στην ανάλυση επιφανειών μεταλλακτών, στον χαρακτηρισμό λεπτών υμενίων ημιαγωγών όπου η σταθερότητα στην χημική σύσταση είναι κρίσιμη για την καλή λειτουργία τους αλλά και τον χρόνο ζωής τους. Εκτός από την επιστήμη υλικών έχει βρει πολλές εφαρμογές και στην ιατρική, βιολογία, περιβαλλοντικές επιστήμες, τεχνολογία των τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, καταλύτες, κ.α.¹⁰¹



Εικόνα 34. Αρχή λειτουργίας μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων.¹⁰²

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΚΟΠΟΣ

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές που συνδυάζουν ένα βιομόριο αναγνώρισης σε στενή επαφή με έναν μεταλλάκτη σήματος ο οποίος μετατρέπει σε μετρήσιμο σήμα μια φυσικοχημική μεταβολή που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του βιομορίου με τον αναλύτη στο δείγμα. Οι οπτικοί αισθητήρες αποτελούν μια από τις πλέον υποσχόμενες κατηγορίες βιοαισθητήρων λόγω των ποικίλων αρχών ανίχνευσης αλλά και της μεγάλης ευαισθησίας ανίχνευσης που προσφέρουν. Προκειμένου να αξιοποιηθούν στο έπακρο οι αναλυτικές ικανότητες των οπτικών αισθητήρων θα πρέπει τα βιομόρια αναγνώρισης να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια του μεταλλάκτη με τρόπο που να εξασφαλίζει την υψηλότερη δυνατή λειτουργικότητα τους αλλά και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την χημική/βιολογική ενεργοποίηση των αισθητήρων εξαρτώνται κυρίως από το υλικό του αισθητήρα. Για οπτικούς αισθητήρες που βασίζονται σε κυματοδηγούς πυριτικών υλικών (οξείδιο πυριτίου, νιτρίδιο πυριτίου, πυρίτιο σε μονωτικό υλικό, γυαλί) η διαδικασία χημικής/βιολογικής ενεργοποίησης που ακολουθείται περιλαμβάνει καθαρισμό/υδροφιλοποίηση της επιφάνειας, χημική τροποποίηση, συνήθως με σιλάνια, και ακινητοποίηση των βιομορίων. Για τον καθαρισμό εφαρμόζεται συνήθως επεξεργασία με διαλύματα Piranha (μίγματα πυκνού θειικού οξέος και διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου), ώστε αφενός να απομακρυνθούν υπολείμματα οργανικών υλικών από την επιφάνεια των αισθητήρων αλλά και να εμπλουτιστεί η επιφάνεια με ομάδες υδροξυλίου οι οποίες αξιοποιούνται για τη σύνδεση των σιλανίων μέσω συμπύκνωσης τους με τις ομάδες σιλοξανίου. Παράμετροι όπως ο διαλύτης, η περιεκτικότητα σε σιλάνιο, η διάρκεια και η θερμοκρασία της επεξεργασίας επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες του υμενίου που προκύπτει. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σιλάνιο που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο για την χημική ενεργοποίηση οπτικών αισθητήρων που βασίζονται σε πυριτικά υλικά είναι το (3-αμινοπροπυλο)-τριαιθοξυσιλάνιο (APTES). Σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES τα βιομόρια μπορούν να ακινητοποιηθούν τόσο με φυσική προσρόφηση όσο και με ομοιοπολική σύνδεση. Η φυσική προσρόφηση βασίζεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις Van der Walls μεταξύ της επιφάνειας και των βιομορίων (κυρίως πρωτεϊνών) ενώ η ομοιοπολική σύνδεση σε γημικές αντιδράσεις μεταξύ ομάδων της επιφάνειας και του προς ακινητοποίηση μορίου. Η ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνικών μορίων

σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES πραγματοποιείται συνήθως με το διδραστικό αντιδραστήριο γλουταραλδεΰδη, ώστε να εισαχθούν στην επιφάνεια δραστικές ομάδες αλδεΰδης οι οποίες αντιδρούν στην συνέχεια με ελεύθερες αμινομάδες στα μόρια των πρωτεϊνών. Η αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων χημικής/βιολογικής ενεργοποίησης πραγματοποιείται μέσω μεθόδων χαρακτηρισμού επιφανείας (π.χ., φασματοσκοπία FT-IR, XPS, ToF-SIMS, AFM, κλπ.) αλλά και με χρήση μορίων σημασμένων με ραδιοϊσότοπα ή φθορίζουσες ουσίες ώστε να εκτιμηθεί τόσο η ποσότητα όσο και η λειτουργικότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της χημικής τροποποίησης ψηφίδων από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου με APTES με στόχο την βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών οπτικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε αυτές τις ψηφίδες μέσω της αύξησης της ποσότητας των βιομορίων αναγνώρισης που ακινητοποιούνται, της λειτουργικότητας τους αλλά και της επαναληψιμότητας της ακινητοποίησης. Επιλέχθηκαν δύο πρωτόκολλα τροποποίησης με APTES, ένα με χρήση υδατικού διαλύματος και ένα με χρήση διαλύματος σε απόλυτη αιθανόλη, και παρασκευάστηκαν επιφάνειες που αξιολογήθηκαν ως προς την ακινητοποίηση γ-σφαιρινών ποντικού τόσο με φυσική προσρόφηση όσο και με ομοιοπολική σύνδεση μετά από τροποποίηση των επιφανειών με το διδραστικό αντιδραστήριο γλουταραλδεΰδη. Η ποσότητα των ακινητοποιημένων γσφαιρινών ποντικού εκτιμήθηκε μέσω αντίδρασης με φθοροσημασμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού και μέτρηση του σήματος φθορισμού. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS), παρακολουθώντας σε πραγματικό χρόνο την αντίδραση των ακινητοποιημένων γ-σφαιρινών ποντικού με μη σημασμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Τέλος, σε ψηφίδες που είγαν τροποποιηθεί με APTES με τα δύο πρωτόκολλα που επιλέγθηκαν ακινητοποιήθηκε αντίσωμα κατά της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου στην κλινική πράξη δείκτη φλεγμονής, και οι ψηφίδες χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της CRP.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Καθαρισμός επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου

Αρχή μεθόδου

Όταν οι επιφάνειες πυριτίου εκτίθενται στο περιβάλλον, ακόμα και για μικρό χρονικό διάστημα, λαμβάνει χώρα προσρόφηση οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Για την προστασία των επιφανειών από το περιβάλλον συχνά αποθηκεύονται σε ειδικές πλαστικές θήκες. Όμως αέριες οργανικές ενώσεις που αποβάλλονται από τις πλαστικές θήκες μπορούν επίσης να προσροφηθούν στις επιφάνειες. Στις ανόργανες ενώσεις που μπορεί να επιμολύνουν τις επιφάνειες πυριτίου περιλαμβάνονται σκόνη, άλατα, ρινίσματα που προέρχεται από προηγούμενη επεξεργασία των επιφανειών κ.α. Για αυτό το λόγο είναι αναγκαίος ο καθαρισμός των επιφανειών πριν από οποιαδήποτε χημική τροποποίηση ο οποίος πραγματοποιείται με υπερήχους κατόπιν εμβάπτισης των επιφανειών σε οργανικούς διαλύτες όπως η ακετόνη και η ισοπροπανόλη και εκτενή έκπλυση με απεσταγμένο νερό.

<u>Υλικά</u>

- Δισκίδια πυριτίου (Si-Mat, Kaufering, Γερμανία) στα οποία είχε αποτεθεί στρώμα SiO₂ πάχους 1000 nm ή και στρώμα Si₃N₄ πάχους 100 nm και τα οποία είχαν κοπεί σε ψηφίδες διαστάσεων 5x15 mm²
- Υάλινα τρυβλία
- Ακετόνη, CH₃COCH₃
- Ισοπροπανόλη, CH₃CH(OH)CH₃
- Δις απεσταγμένο νερό
- Αέριο Ν₂

Όργανα

Συσκευή λουτρού υπερήχων (Crest Ultrasonics, ΗΠΑ)

Εκτέλεση

Τα δείγματα καθαρίζονται αρχικά με ακετόνη για 15 λεπτά σε λουτρό υπερήχων, ξεπλένονται με ισοπροπανόλη, κατεργάζονται στο λουτρό υπερήχων για άλλα 15 λεπτά σε ισοπροπανόλη, ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό, και ξηραίνονται με ροή αερίου N₂.

6.2 Υδροφιλοποίηση ψηφίδων πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου

Αρχή μεθόδου

Η υδροφιλοποίηση των ψηφίδων διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου πραγματοποιείται με στόχο τον περαιτέρω καθαρισμό της επιφάνειας των ψηφίδων από οργανικούς ρύπους αλλά και τον εμπλουτισμό τους με ελεύθερες ομάδες σιλανόλης (εικόνα 37), οι οποίες αντιδρούν σε επόμενο στάδιο με τα μόρια των οργανοσιλανίων για την χημική τροποποίηση της επιφάνειας. Η υδροφιλοποίηση των ψηφίδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία με μίγμα πυκνού θειικού οξέος (H₂SO₄) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε αναλογία 3:1, το οποίο είναι γνωστό ως διάλυμα Piranha.



Εικόνα 35. Υδροφιλοποίηση επιφανειών διοζειδίου/νιτριδίου του πυριτίου.

- <u>Υλικά</u>
- Δισκίδια πυριτίου (Si-Mat, Kaufering, Γερμανία) στα οποία είχε αποτεθεί στρώμα SiO₂ πάχους 1000 nm ή και στρώμα Si₃N₄ πάχους 100 nm τα οποία είχαν κοπεί σε ψηφίδες διαστάσεων 5x15 mm²
- Πυκνό θειικό οξύ, H₂SO₄, 95-97 % (0/0) (Merck, Γερμανία)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου, H₂O₂ 30% (o/o) (CarloErba, Ιταλία)

- Υάλινα τρυβλία
- Δις απεσταγμένο νερό
- Αέριο Ν₂

Εκτέλεση

Οι επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου εμβαπτίζονται σε μίγμα πυκνού H₂SO₄ και H₂O₂ σε αναλογία 3:1 σε υάλινο τρυβλίο επί 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν εκπλένονται με περίσσεια νερού και ξηραίνονται σε ρεύμα αζώτου. Οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες χρησιμοποιούνται αμέσως για τροποποίηση με αμινο-σιλάνιο.

6.3 Μέθοδος χημικής τροποποίησης επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου και αισθητήρων με αμινο-σιλάνιο

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η χημική τροποποίηση των υδροφιλοποιημένων ψηφίδων διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου πραγματοποιείται μέσω σιλανοποίησης με το αντιδραστήριο (3-αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο (APTES). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα APTES ή διάλυμα APTES σε απόλυτη αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τα μόρια του σιλανίου σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανόλες που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου στο στάδιο της υδροφιλοποίησης. Μετά από την απομάκρυνση τους από το διάλυμα APTES ακολουθεί κατεργασία των ψηφίδων σε υψηλή θερμοκρασία κατά την οποία λαμβάνει χώρα αντίδραση συμπύκνωσης με απομάκρυνση μορίων νερού και σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των μορίων του APTES και της επιφάνειας (Εικόνα 36). Οι τροποποιημένες με APTES επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια για την ακινητοποίηση βιομορίων μέσω προσρόφησης ή ομοιοπολικής αντίδρασης.



Εικόνα 36. Τροποποίηση επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου με ΑΡΤΕΣ.

- Υλικά
- Υδροφιλοποιημένες επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου και αισθητήρων διαστάσεων 5x15 mm²
- (3-Αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο (APTES) (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Δις απεσταγμένο νερό
- Απόλυτη αιθυλική αλκοόλη ≥ 98% (VWR Prolabo, Γαλλία)

Όργανα

Φούρνος Heraus T6 (Thermo Fisher Scientific, Germany)

Εκτέλεση: Πρωτόκολλο 1

Για την τροποποίηση των επιφανειών χρησιμοποιήθηκε διάλυμα APTES, συγκέντρωσης 2 % (o/o) σε δις απεσταγμένο νερό, στο οποίο εμβαπτίστηκαν οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου. Οι επιφάνειες παρέμειναν σε αυτό το διάλυμα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλύθηκαν για 30 δευτερόλεπτα με δις απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια ακολούθησε ξήρανση με ρεύμα αζώτου και τελικά μεταφέρθηκαν σε φούρνο όπου παρέμειναν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 120 °C, έτσι ώστε τα υδρολυμένα μόρια σιλανίου να συνδεθούν ομοιοπολικά στην επιφάνεια. Οι σιλανοποιημένες ψηφίδες αποθηκευτήκαν σε τρυβλία πολυστυρενίου σε θερμοκρασία δωματίου για 48-72 ώρες πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση βιομορίων μέσω φυσικής προσρόφησης.

Εκτέλεση: Πρωτόκολλο 2

Οι υδροφιλοποιημένες ψηφίδες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα APTES 5% (o/o) σε απόλυτη αιθανόλη επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, οι επιφάνειες εκπλήθηκαν ελαφρώς με αιθανόλη και ξηράνθηκαν με ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια, οι ψηφίδες παρέμεινων για 20 λεπτά σε φούρνο σε θερμοκρασία 120 °C. Οι σιλανοποιημένες ψηφίδες αποθηκεύτηκαν σε τρυβλία πολυστυρενίου σε θερμοκρασία δωματίου για 48-72 ώρες πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση βιομορίων μέσω φυσικής προσρόφησης.

6.4 Μέθοδος χημικής τροποποίησης επιφανειών πυριτίου με αμινοσιλάνιο και γλουταραλδεΰδη ως διδραστικό συνδετικό μόριο

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε για τη σιλανοποίηση επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ομοιοπολική σύνδεση βιομορίων σε αυτές. Έτσι οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες τροποποιούνται (3-αμινοπροπυλο)τριαιθόξυ-σιλανίου (APTES), αραιωμένο σε νερό ή απόλυτη αθανόλη όπως περιγράφηκε παραπάνω, και στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διάλυμα γλουταραλδεΰδης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Τα μόρια της γλουταραλδεΰδης αντιδρούν με τις αμινομάδες του υμενίου του σιλανίου και εκθέτουν στην επιφάνεια ομάδες αλδεΰδης (Εικόνα 37) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια με ελεύθερες αμινομάδες στα μόρια των πρωτεϊνών ώστε να πραγματοποιηθεί



Εικόνα 37. Τροποποίηση επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου με APTES και γλουταραλδεΰδη.

- <u>Υλικά</u>
- Υδροφιλοποιημένες επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου και αισθητήρων διαστάσεων 5x15 mm²
- (3-Αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο, (APTES) (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Γλουταραλδευδη 25% (β/ο) (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Δις απεσταγμένο νερό

<u>Όργανα</u>

Φούρνος Heraus T6 (Thermo Fisher Scientific, Germany)

<u>Εκτέλεση</u>

Η τροποποίηση με APTES πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιεγράφηκαν και στη συνέχεια οι επιφάνειες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα γλουταραλδεΰδης συγκέντρωσης 2,5% (β/ο) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH 7,4. Οι επιφάνειες παρέμειναν σε αυτό το διάλυμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν εκπλύθηκαν με περίσσεια διαλύματος φωσφορικών και απεσταγμένο νερό και ξηράνθηκαν σε ρεύμα αερίου αζώτου. Οι ενεργοποιημένες επιφάνειες χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για την ομοιοπολική ακινητοποίηση βιομορίων.

6.5 Ακινητοποίηση βιομορίων στις χημικά τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου

6.5.1 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων σε χημικά τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου με φυσική προσρόφηση

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων με φυσική προσρόφηση στις τροποποιημένες με APTES επιφάνειες πυριτίου συνίσταται στην εναπόθεση διαλυμάτων των πρωτεϊνών στις επιφάνειες και επακόλουθη επώαση κατά την οποία οι πρωτεΐνες προσδένονται στην επιφάνεια μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών όμως δεσμοί υδρογόνου, Van der Walls, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κλπ. Οι δεσμοί αυτοί παρότι ασθενείς όταν θεωρηθούν μεμονωμένα στο σύνολο τους οδηγούν σε ισχυρή μη αντιστρεπτή ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων στις επιφάνειες.

<u>Υλικά</u>

- Επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου τροποποιημένες με APTES
- γ-Σφαιρίνες ποντικού (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Αλβουμίνη ορού βοός, BSA (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Διάλυμα ακινητοποίησης: ρυθμιστικό διάλυμα (ρ.δ.) φωσφορικών 0,1 M, pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης: ρ.δ. φωσφορικών 0,05 M, pH 7,4
- Διάλυμα αποκλεισμού: 10 mg/mL BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα (ρ.δ.) φωσφορικών 0,1
 M, pH 7,4
- Δις απεσταγμένο νερό

Εκτέλεση

Σε διάφορες θέσεις πάνω στις τροποποιημένες με APTES ψηφίδες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου εναποτίθενται κηλίδες όγκου 10 μL διαλύματος γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 25-500 μg/mL σε ρ.δ. ακινητοποίησης. Ακολουθεί ολονύχτια επώαση (18-24 ώρες) σε θερμοκρασία δωματίου και ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υγρασία (70-80%). Στην συνέχεια, οι επιφάνειες εκπλένονται με ρ.δ. έκπλυσης και ακολουθεί εμβάπτιση για 1 ώρα σε διάλυμα αποκλεισμού. Ακολούθως, οι επιφάνειες εκπλένονται με ρ.δ. έκπλυσης και αερίου αζώτου. Ακολουθεί ανίχνευση των ακινητοποιημένων γ-σφαιρινών ποντικού όπως περιγράφεται στο εδάφιο 6.5.3.

6.5.2 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων σε χημικά τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου με ομοιοπολική σύνδεση

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων στις τροποποιημένες με APTES/γλουταραλδεΰδη επιφάνειες πυριτίου με ομοιοπολική σύνδεση βασίζεται στην αντίδραση των αλδεϋδομάδων που έχουν εισαχθεί στην επιφάνεια μέσω της τροποποίησης με γλουταραλδεΰδη με τις ελεύθερες ε-αμινομάδες λυσίνης στο μόριο της πρωτεΐνης.

Υλικά

- Επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου τροποποιημένες με ΑΡΤΕS/γλουταραλδεΰδη
- γ-Σφαιρίνες ποντικού (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Αλβουμίνη ορού βοός, BSA (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Διάλυμα ακινητοποίησης: ρυθμιστικό διάλυμα (ρ.δ.) φωσφορικών 0,1 M, pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης: ρ.δ. φωσφορικών 0,05 M, pH 7,4
- Διάλυμα αποκλεισμού: 10 mg/mL BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα (ρ.δ.) φωσφορικών 0,1
 M, pH 7,4

• Δις απεσταγμένο νερό

Εκτέλεση

Σε διάφορες θέσεις πάνω στις τροποποιημένες με ΑΡΤΕS/γλουταραλδεΰδη ψηφίδες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου εναποτίθενται κηλίδες όγκου 10 μL διαλύματος γσφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 25-500 μg/mL σε ρ.δ. ακινητοποίησης. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υγρασία (70-80%). Στην συνέχεια, οι επιφάνειες εκπλένονται με ρ.δ. έκπλυσης και ακολουθεί εμβάπτιση για 1 ώρα σε διάλυμα αποκλεισμού. Ακολούθως, οι επιφάνειες εκπλένονται με ρ.δ. έκπλυσης και απεσταγμένο νερό και ξηραίνονται σε ρεύμα αερίου αζώτου. Ακολουθεί ανίχνευση των ακινητοποιημένων γ-σφαιρινών ποντικού όπως περιγράφεται στο εδάφιο 6.5.3.

6.5.3 Ανίχνευση των ακινητοποιημένων στις επιφάνειες πυριτίου γσφαιρινών ποντικού με μικροσκοπία φθορισμού

Αρχή Μεθόδου

Για την αξιολόγηση της ικανότητας και της ομοιογένειας ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων που παρέχουν οι τροποποιημένες με APTES και APTES/γλουταραλδεΰδη επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου εφαρμόστηκε φθορισμομετρική ανοσοχημική μέθοδος ανίχνευσης των ακινητοποιημένων γ-σφαιρινών ποντικού. Για τον σκοπό αυτό μετά την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού είτε με φυσική προσρόφηση ή ομοιοπολική σύνδεση και κάλυψη των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης των επιφανειών με αδρανή πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού το οποίο ήταν σημασμένο με τη φθορίζουσα AlexaFluor 546 (AF546). Μετά το πέρας της αντίδρασης, οι επιφάνειες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 38) που έφερε ζεύγος φίλτρων διέγερσης/εκπομπής κατάλληλα για την φθορίζουσα ουσία AF546 και ελήφθησαν εικόνες των κηλίδων γ-σφαιρινών ποντικού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του σήματος φθορισμού στις εικόνες που ελήφθησαν με κατάλληλο λογισμικό

<u>Υλικά</u>

- Επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου τροποποιημένες με APTES ή APTES/γλουταραλδεΰδη και γ-σφαιρίνες ποντικού
- Πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε αίγα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με την φθορίζουσα Alexa Fluor 546 (AF546) (Thermo Fisher Scientific, ΗΠΑ)
- Διάλυμα έκπλυσης: ρ.δ. φωσφορικών 0,05 M, pH 7,4
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης: ρ.δ. φωσφορικών 0,1 M, pH 7,4, που περιέχει 10 mg/mL BSA
- Δις απεσταγμένο νερό

<u>Οργανα</u>

Μικροσκόπιο φθορισμού Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Γερμανία) εφοδιασμένο με ζεύγος φίλτρων διέγερσης και εκπομπής για Alexa Fluor 546 (562 και 573 nm, αντίστοιχα) και εξοπλισμένο με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Micropublisher 3.3 RTV (Q Imaging, Kαναδάς) (Εικόνα 38). Η επεξεργασία της ψηφιακής εικόνας και η μέτρηση των σημάτων φθορισμού πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων ImagePro Plus (Media Cybernetics, Inc., ΗΠΑ)



Εικόνα 38. Φωτογραφία του μικροσκοπίου φθορισμού Axioskop 2 Plus με ενσωματωμένη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Micropublisher 3.3 PTV που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του σήματος φθορισμού στις ψηφίδες διοζειδίου/νιτριδίου του πυριτίου.

<u>Εκτέλεση</u>

Οι επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με ΑΡΤΕS ή ΑΡΤΕS/γλουταραλδεΰδη και γ-σφαιρίνες ποντικού επωάστηκαν με διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος αιγός έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 συγκέντρωσης 5 μg/mL αραιωμένο σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, οι ψηφίδες εκπλύθηκαν με ρ.δ. έκπλυσης και απεσταγμένο νερό, και ζηράνθηκαν σε ρεύμα αερίου αζώτου και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Για τον προσδιορισμό του μη ειδικού σήματος χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με ΑΡΤΕS ή ΑΡΤΕS/γλουταραλδεΰδη στις οποίες δεν είχε εναποτεθεί διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού αλλά είχαν επωασθεί με διάλυμα αποκλεισμού. Οι τιμές φθορισμού που προσδιορίστηκαν από αυτές τις επιφάνειες αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές που προσδιορίστηκαν από επιφάνειες οι οποίες είχαν ακινητοποιηθεί γσφαιρίνες ποντικού. Από κάθε επιφάνεια λήφθηκαν τουλάχιστον τέσσερις εικόνες και προσδιορίστηκε η μέση τιμή του σήματος φθορισμού και η τυπική απόκλιση.

6.6 Ανίχνευση των ακινητοποιημένων στις επιφάνειες πυριτίου πρωτεϊνών με φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η ανίχνευση αναλυτών με φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός στηρίζεται στην ακινητοποίηση των μορίων αναγνώρισης σε συγκεκριμένες θέσεις της ενεργοποιημένης επιφάνειας διοξειδίου του πυριτίου. Η επιφάνεια συναρμολογείται στην συνέχεια με το μικροροϊκό κανάλι και τοποθετείται κάτω από το ακροφύσιο ανάκλασης. Κατά την δέσμευση των αναλυτών στα ακινητοποιημένα βιομόρια αναγνώρισης αυξάνεται το πάχος της πρωτεϊνικής στοιβάδας στην επιφάνεια της ενεργοποιημένης επιφάνειας διοξειδίου του πυριτίου. Αυτή η αύξηση προκαλεί μεταβολή του δείκτη διάθλασης και μετατόπιση του φάσματος ανάκλασης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος η οποία καταγράφεται από το λογισμικό. Η αύξηση του πάχους του πρωτεϊνικού υμενίου είναι ανάλογη του αριθμού των μορίων που προσδένονται στην επιφάνεια και κατά συνέπεια ανάλογη με την συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου αναλύτη στο δείγμα. Όταν η συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου αναλύτη στο δείγμα είναι σχετικά μικρή, είναι πιθανό να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή τους παρακολουθώντας μόνο την αντίδραση του αναλύτη με το ακινητοποιημένο μόριο αναγνώρισης, για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα δεύτερο μόριο, π.χ., ένα αντίσωμα που δεσμεύεται σε διαφορετικό επίτοπο από αυτόν που αναγνωρίζει το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Αυτό το σχήμα ανάλυσης εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) ενώ η ανίχνευση των γ-σφαιρινών ποντικού πραγματοποιήθηκε παρακολουθώντας απευθείας την αντίδραση με το αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού.

<u>Υλικά</u>

- Επιφάνειες διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου τροποποιημένες με APTES ή APTES/γλουταραλδεΰδη
- Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινο-μεθάνιο, Tris (Merck, Γερμανία)
- Αλβουμίνη ορού βοός, BSA (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- γ-Σφαιρίνες βοός (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)

- γ-Σφαιρίνες ποντικού (Sigma Chemical Co., ΗΠΑ)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού (Thermo Fisher Scientific, ΗΠΑ)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της CRP (Scripps Laboratories, ΗΠΑ)
- CRP απομονωμένη από ανθρώπινα βιολογικά υγρά (Scripps Laboratories, ΗΠΑ)
- Διάλυμα προσρόφησης πρωτεϊνών: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M, pH 7,4
- Διάλυμα αποκλεισμού : 10 mg/mL BSA σε διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης γ-σφαιρινών ποντικού: ρ.δ. φωσφορικών 0,1 M, pH 7,4, που περιέχει 10 mg/mL BSA
- Διάλυμα έκπλυσης γ-σφαιρινών ποντικού: ρ.δ. φωσφορικών 0,05 M, pH 7,4
- Διάλυμα ανάλυσης CRP: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,8, που περιέχει 5 mg/mL BSA, 0,9 % (β/ο) NaCl και 0,1 mg/mL γ-σφαιρίνες βοός
- Διάλυμα έκπλυσης CRP: Tris-HCl 0,01 M, pH 8,25 που περιέχει 0,9 % (β/o) NaCl
- Δις απεσταγμένο νερό
- *Οργανα*
- Αντλία σύριγγας, Cole Parmer 74900 series (Cole Parmer Inc, ΗΠΑ)
- Συσκευή φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (Thetametrisis, Ελλάδα), η οποία αποτελείται από τα εξής:

i) Μικρορευστομηχανική κυψελίδα και βάση τοποθέτησης της ψηφίδας

Η μικρορευστομηχανική κυψελίδα μέσω της οποίας πραγματοποιείται η διαβίβαση των διαλυμάτων στην αισθητήρια επιφάνεια σχηματίζεται από την συναρμογή: α) μιας αυτοκόλλητης μεμβράνης διπλής όψης στην οποία έχει σχηματιστεί με κοπή με δέσμη λέιζερ το μικροροϊκό κανάλι με β) μια επίπεδη επιφάνεια πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) υψηλής οπτικής καθαρότητας στην οποία έχουν ανοιχθεί κανάλια για την προσαρμογή σωλήνων (Εικόνα 39α και 39β). Το κανάλι είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η απρόσκοπτη ροή των διαλυμάτων των διαφόρων αντιδραστηρίων καθώς και η αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων. Στο επάνω μέρος της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας ενσωματώνονται κατάλληλα σωληνάκια μέσω των οποίων επιτρέπεται η διασύνδεση με

εξωτερική αντλία καθώς και με τα δοχεία των διάφορων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση. Με τον τρόπο αυτόν, πραγματοποιείται η διαβίβαση διαλυμάτων από την μικρορευστομηχανική κυψελίδα με σταθερή ταχύτητα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ενσωματωμένη με τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα ψηφίδα τοποθετείται σε βάση από PMMA, η οποία φέρει εσοχή που επιτρέπει την εισαγωγή και σταθεροποίηση της ψηφίδας σε συγκεκριμένη θέση ως προς το οπτικό σύστημα (Εικόνα 39γ).





Εικόνα 39. α) Φωτογραφία της ψηφίδας, της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας και της βάσης της. (β) Σχηματική απεικόνιση της προσαρμογής της ψηφίδας με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα και την βάση της. (γ) Φωτογραφία της ψηφίδας με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα στην βάση της τοποθετημένη κάτω από το σύστημα οπτικών ινών.

ii) Οπτικό σύστημα

Το οπτικό σύστημα συνίσταται από: την οπτική πηγή, το φασματοφωτόμετρο και το ακροφύσιο ανάκλασης (Εικόνα 40). Η οπτική πηγή είναι μια λυχνία βολφραμίου που εκπέμπει φως σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από τα 360 nm. Η τροφοδοσία της πηγής γίνεται

διαμέσου κατάλληλου ηλεκτρονικού κυκλώματος που διασφαλίζει σταθερότητα λειτουργίας για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιείται για την συλλογή των φασμάτων ανάκλασης είναι το Maya 2000Pro της εταιρείας OceanOptics το οποίο καλύπτει την περιοχή μηκών 400-1100 nm. Το ακροφύσιο ανάκλασης αποτελείται από έξι ίνες φωτισμού, διαμέτρου 200 μm, τοποθετημένες σε περιφέρεια κύκλου και μία ίνα διαμέτρου επίσης 200 μm, που βρίσκεται στο κέντρο του κύκλου, και συλλέγει το φάσμα ανάκλασης. Το ακροφύσιο ανάκλασης στερεώνεται σε κατάλληλο ικρίωμα έτσι ώστε η θέση του να είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος ενώ η θέση της ψηφίδας ως προς το ακροφύσιο ρυθμίζεται ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή ανάκλαση του προσπίπτοντος φωτός.



Εικόνα 40. Φωτογραφία του οπτικού συστήματος φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός.

Το λογισμικό για τη λειτουργία της συσκευής βασίζεται στο λογισμικό FR-Monitor της ThetaMetrisis και παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο της αντίδρασης ως αύξηση του πάχους της στοιβάδας διοξειδίου του πυριτίου (Εικόνα 41α) μέσω συνεχούς παρακολούθησης της ολίσθησης του πειραματικού φάσματος ως προς το αρχικό φάσμα θεωρητικό φάσμα (Εικόνα 41β).





Εκτέλεση

<u>Α) Παρακολούθηση της αντίδρασης γ-σφαιρινών ποντικού/αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών</u> <u>ποντικού</u>

Η ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και ο αποκλεισμός των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης της επιφάνειας πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στα εδάφια 6.5.1 για ψηφίδες τροποποιημένες με APTES και 6.5.2 για ψηφίδες τροποποιημένες με APTES/γλουταραλδεΰδη. Στις ψηφίδες προσαρμόστηκε μικρορεστομηχανική κυψελίδα και τοποθετήθηκαν στην ειδική βάση της συσκευής ανάκλασης λευκού φωτός. Αρχικά, διοχετεύεται στην επιφάνεια ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης και ακολουθεί παροχέτευση διαδοχικά: διαλύματος αντισώματος αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης από 0,5 έως 10 μg/mL σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης για 10 λεπτά και ακολούθως διαλύματος ανοσοαντίδρασης για 3 λεπτά. Η ταχύτητα ροής όλων των διαλυμάτων ήταν 50 μL/mL. Για κάθε συγκέντρωση αντισώματος αίγας κατά των γσφαιρινών ποντικού που χρησιμοποιήθηκε υπολογίστηκε το φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας από την διαφορά του πάχους της στοιβάδας κατά την διαβίβαση διαλύματος ανοσοαντίδρασης πριν και μετά την διαβίβαση του διαλύματος αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού.

<u>Β) Ανοσοχημικός προσδιορισμός της CRP</u>

Σε χημικά ενεργοποιημένες ψηφίδες διοξειδίου του πυριτίου εναποτέθηκε διάλυμα αντισώματος κατά της CRP συγκέντρωσης 100 μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες στις τροποποιημένες με APTES ψηφίδες ή για 1 ώρα στις ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με APTES/γλουταραλδεΰδη. Ακολούθησε έκπλυση των ψηφίδων, εμβάπτιση σε διάλυμα αποκλεισμού και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ψηφίδες εκπλύθηκαν με διάλυμα έκπλυσης CRP και νερό και ξηράνθηκαν με ρεύμα αζώτου. Ακολούθησε προσαρμογή της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας και τοποθέτηση της στη μετρητική διάταξη. Κατόπιν παροχετεύθηκαν διαδοχικά: διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, που περιείχε 5 mg/mL BSA, 9 g/L NaCl (διάλυμα ανάλυσης CRP) για 2-3 λεπτά, πρότυπα διαλύματα CRP σε διάλυμα ανάλυσης για 10 λεπτά, διάλυμα αντισώματος κατά της CRP συγκέντρωσης 10 μg/mL σε διάλυμα ανάλυσης για 5 λεπτά, και τέλος διάλυμα ανάλυσης για 3 λεπτά. Η ταχύτητα ροής όλων των διαλυμάτων ήταν 50 μL/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης CPR κατασκευάστηκε διάγραμμα του φαινόμενου πάγους της βιομοριακής στοιβάδας, όπως αυτό προσδιορίστηκε από την διαφορά του πάχους της στοιβάδας κατά την διαβίβαση διαλύματος ανάλυσης πριν και μετά την ανοσοαντίδραση ως προς την συγκέντρωση της CRP στα πρότυπα διαλύματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόγος της παρούσας μεταπτυγιακής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μεθόδου χημικής τροποποίησης επιφανειών διοξειδίου ή νιτριδίου του πυριτίου οι οποίες χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων. Η μέθοδος πρέπει να παρέχει ομοιογενή ακινητοποίηση των βιομορίων καθώς και μεγάλη επιφανειακή πυκνότητα και σταθερότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων. Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος χημικής τροποποίησης επιφανειών διοξειδίου ή νιτριδίου του πυριτίου είναι η σιλανοποίηση. Για το λόγο αυτό επελέγησαν και συγκρίθηκαν διαφορετικές βιβλιογραφικές μέθοδοι σιλανοποίησης οι οποίες χρησιμοποιούν ως αντιδραστήριο το (3αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο (APTES) και συγκεκριμένα επιλέχθηκε ένα πρωτόκολλο για τροποποίηση με APTES σε υδατικό διάλυμα και ένα σε οργανικό διαλύτη. Στις τροποποιημένες με APTES επιφάνειες πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια ακινητοποίηση των βιομορίων τόσο μέσω φυσικής προσρόφησης όσο και μέσω ομοιοπολικής δέσμευσης μετά από ενεργοποίηση των αμινομάδων της επιφάνειας με γλουταραλδεΰδη. Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών σιλανοποίησης, ακινητοποιήθηκαν στα τροποποιημένα δισκία οξειδίου του πυριτίου γ-σφαιρίνες ποντικού. Η ικανότητα δέσμευσης, η επαναληψιμότητα καθώς και η ομοιογένεια ακινητοποίησης στα τροποποιημένα δισκία οξειδίου του πυριτίου ελέγχθηκε με φθοροεπισημασμένο αντίσωμα αιγός έναντι των γσφαιρινών ποντικού. Ως κριτήρια για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών χρησιμοποιήθηκε το απόλυτο σήμα φθορισμού όπως υπολογίστηκε από το μέσο όρο μετρήσεων πολλαπλών κηλίδων γ-σφαιρινών ποντικού και η επαναληψιμότητα του σήματος φθορισμού μέσω υπολογισμού της τυπικής απόκλισης (SD) των μετρήσεων μεταξύ κηλίδων αλλά μέσα στην ίδια κηλίδα.

Οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν για καθένα από τα διαφορετικά πρωτόκολλα περιλάμβαναν:

- την συγκέντρωση του σιλανίου,
- τον χρόνο επώασης με την επιφάνεια,
- την συγκέντρωση της γλουταραλδεΰδης
- τον χρόνο επώασης με την γλουταραλδεΰδης
- την συγκέντρωση του διαλύματος της πρωτεΐνης

97

- τον χρόνο επώασης με το διάλυμα της πρωτεΐνης
- το χρόνο που μεσολαβεί από την ενεργοποίηση της επιφάνειας έως την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης

Τέλος, τα βέλτιστα για κάθε προσέγγιση πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν για την τροποποίηση ψηφίδων διοξειδίου του πυριτίου για την ανάπτυξη αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός. Με κατάλληλη βιολογική ενεργοποίηση αυτών των ψηφίδων κατέστη δυνατή η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της αντίδρασης γ-σφαιρινών ποντικού/αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού αλλά και ο ανοσοχημικός προσδιορισμός της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) μέσω ακινητοποίησης στις ψηφίδες ειδικού αντισώματος κατά της CRP. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις πριν απο τη σιλανοποίηση των επιφανειών με σκοπό τον εμπλουτισμό τους με υδροξυλομάδες. Στην παρούσα εργασία η υδροφιλοποίηση επετεύχθει με κατεργασία με διάλυμα Piranha (3:1 H₂SO₄/H₂O₂).

7.1. Βελτιστοποίηση μεθόδου τροποποίησης με APTES από υδατικό διάλυμα

7.1.1. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης APTES

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης του διαλύματος APTES, ψηφίδες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα APTES σε νερό που περιείχαν 0,25, 0,5, 1, 2 ή 5 % (0/0) για 20 λεπτά. Ακολούθησε ξήρανση για 20 λεπτά στους 120 °C και οι επιφάνειες παρέμειναν για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και την ανίχνευση των ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και την ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στα εδάφια 5.6.1 και 5.63, αντίστοιχα. Στο διάγραμμα 1, παρουσιάζονται οι μέσες τιμές του σήματος φθορισμού που ελήφθησαν από 4 κηλίδες γ-σφαιρινών ποντικού που είχαν εναποτεθεί σε επιφάνειες οξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις APTES. Όπως φαίνεται, οι τιμές του σήματος φθορισμού που λαμβάνονται και από τα δύο είδη επιφανειών αυξάνονται καθώς η συγκέντρωση του APTES αυξάνεται από 0,25 έως 2% (0/0), ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του APTES δεν προκαλεί σημαντική μεταβολή στο σήμα. Επίσης για συγκέντρωση APTES ίση ή μεγαλύτερη

από 2% (0/0), επιτυγχάνονται οι μικρότερες διακυμάνσεις των τιμών φθορισμού μεταξύ των διαφορετικών κηλίδων αλλά και εντός της ίδιας κηλίδας με συντελεστές διακύμανσης μικρότερους από 6% μεταξύ διαφορετικών κηλίδων και μικρότερους από 10% εντός της κάθε κηλίδας. Επιπλέον, από το σχήμα προκύπτει ότι το νιτρίδιο παρέχει για όλες τις συγκεντρώσεις APTES που ελέγθηκαν κατά περίπου 30% μικρότερες τιμές φθορισμού σε σχέση με αυτές που προσδιορίζονται από τις αντίστοιχες επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου. Επομένως η βέλτιστη συγκέντρωση APTES για την τροποποίηση επιφανειών διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου είναι 2% (0/0). Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε για περαιτέρω βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου τροποποίησης επιφανειών με υδατικό διάλυμα APTES.



Διάγραμμα 1: Τιμές σήματος φθορισμού που προσδιορίστηκαν από επιφάνειες διοξειδίου (κόκκινα τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) οι οποίες είχαν τροποποιηθεί με διαλύματα APTES διαφορετικής συγκέντρωσης σε νερό. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με διάλυμα γσφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 100 μm/mL για 1 ώρα και ακολούθως με αντίσωμα κατά των γσφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.1.2. Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης της επιφάνειας με το υδατικό διάλυμα APTES

Η επόμενη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο χρόνος επώασης των επιφάνειων διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου με το υδατικό διάλυμα APTES. Για τον σκοπό αυτό, οι

επιφάνειες εμβαπτίστηκαν για 5, 20, 60 και 120 λεπτά λεπτά σε διάλυμα APTES σε νερό συγκέντρωσης 2% (ο/ο). Ακολούθησε ξήρανση για 20 λεπτά στους 120 °C και οι επιφάνειες παρέμειναν για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και την ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στα εδάφια 5.6.1 και 5.63, αντίστοιχα. Τα απολέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2 από όπου προκύπτει ότι και για και τα δύο είδη επιφανειών μέγιστες τιμές οροφής επιτυγχάνονται για επώαση μεγαλύτερη ίση από 20 λεπτά. Περαιτέρω αύξηση του χρόνου επώασης οδηγεί σε μικρή αύξηση των τιμών φθορισμού (περίπου 8% για τις επιφάνειες διοξειδίου και 12% για τις επιφάνειες νιτριδίου). Κατά συνέπεια, 20 λεπτά επώασης των επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου με υδατικό διάλυμα APTES 2% (ο/ο) φαίνεται ότι επαρκούν, και για αυτό τον λόγο αυτός ο χρόνος επώασης επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο τροποποίησης με υδατικό διάλυμα ΑΡΤΕS.



Διάγραμμα 2: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρόνου επώασης των επιφανειών διοξειδίου (πράσινα τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) σε υδατικό διάλυμα APTES συγκέντρωσης 2% (ο/ο). Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 100 μm/mL για 1 ώρα και ακολούθως με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.1.3. Βελτιστοποίηση του χρόνου θερμικής κατεργασίας των τροποιημένων με υδατικό διάλυμα APTES επιφανειών

Η θερμική κατεργασία των επιφανειών μετά την τροποποίηση με APTES είναι ένα πολύ κρίσιμο βήμα καθώς στο στάδιο αυτό επιτελείται η ομοιοπολική σύνδεση των μορίων του APTES στην υδροφιλοποιημένη επιφάνεια. Η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να επιτευχθεί και με παραμονή των επιφανειών σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 24 ώρες αλλά με κατεργασία σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες επιτυγχάνεται σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Καθώς ο βέλτιστος χρόνος εξαρτάται από την θερμοκρασία, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε από την βιβλιογραφία η θερμοκρασία των 120 °C και προσδιορίστηκε ο βέλτιστος χρόνος κατεργασίας. Επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με επώαση επί 20 λεπτά σε υδατικό διάλυμα APTES συγκέντρωσης 2% (o/o) κατεργάστηκαν στους 120 °C για 10, 20, 40 και 60 λεπτά. Οι επιφάνειες παρέμειναν για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και την ανίγνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στα εδάφια 5.6.1 και 5.63, αντίστοιχα. Στο διάγραμμα 3 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές φθορισμού που προσδιορίστηκαν από τις επιφάνειες. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι και για τα δύο είδη επιφανειών μέγιστες τιμές οροφής λαμβάνονται για θερμική κατεργασία στους 120 °C για 20 λεπτά. Έτσι αυτός ο χρόνος κατεργασίας επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο της τροποποίησης με υδατικό διάλυμα APTES. Μετά την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, ακολούθησε βελτιστοποίηση της διαδικασίας ακινητοποίησης γ-σφαιρινών ποντικού στις τροποποιημένες επιφάνειες.



Διάγραμμα 3: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρόνου θερμικής κατεργασίας στους 120 °C των επιφανειών διοξειδίου (λευκές στήλες) ή νιτριδίου του πυριτίου (διαγραμμισμένες στήλες) που είχαν τροποποιηθεί με υδατικό διάλυμα APTES συγκέντρωσης 2% (o/o). Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 100 μm/mL για 1 ώρα και ακολούθως με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.1.3. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης γ-σφαιρινών ποντικού για την επικάλυψη των επιφανειών πυριτίου

Έχοντας καταρτίσει το πρωτόκολλο τροποποίησης των επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου με υδατικό διάλυμα APTES μελετήθηκε η προσρόφηση των γ-σφαιρινών ποντικού και συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η βέλτιστη σύγκεντρωση αλλά και ο χρόνος επώασης με την επιφάνεια καθώς και ο χρόνος που μεσολαβεί από την παρασκευή έως την χρήση της επιφάνειας. Για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης του διαλύματος γ-σφαιρινών ποντικού, στις τροποποιημένες επιφάνειες εναποτέθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 25, 50, 100, 200 και 500 μg/mL. Μετά από επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησε ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.63. Οι τιμές φθορισμού που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4. Παρατηρείται μια συνεχής αύξηση του σήματος φθορισμού καθώς η συγκέντρωση των γ-σφαιρινών ποντικού στο διάλυμα εναπόθεσης αυξάνει από 25 έως και 200 μg/mL, οπότε και λαμβάνονται μέγιστες τιμές φθορισμού. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των γ-σφαιρινών ποντικού οδηγεί σε οριακή πτώση των τιμών φθορισμού (<10%). Η πτώση αυτή μπορεί να οφείλεται στο ότι τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια μόρια αποκτούν τέτοια διαμόρφωση που παρεμποδίζεται η δέσμευση του αντισώματος. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 200 μg/mL για περαιτέρω πειράματα.



Διάγραμμα 4: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος γσφαιρινών ποντικού που χρησιμοποιήθηκε για επικάλυψη επιφανειών διοξειδίου (μωβ τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) οι οποίες είχαν τροποποιηθεί με υδατικό διάλυμα APTES. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με τα διαλύματα των γ-σφαιρινών ποντικού για 1 ώρα και ακολούθως με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.1.4. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου επώασης των τροποποιημένων με APTES επιφανειών με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού και χρόνου παραμονής των επιφανειών πριν την εναπόθεση του διαλύματος γσφαιρινών ποντικού

Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου επώασης των τροποποιημένων με APTES επιφανειών με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού, επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του

πυριτίου επωάστηκαν για 0,5, 1, 3 και 18 ώρες με διάλυμα συγκέντρωσης 200 μg/mL. Ακολούθησε ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.63. Στο διάγραμμα 5 παρουσιάζονται οι τιμές φθορισμού που ελήφθησαν για τους διαφορετικούς χρόνους επώασης με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι οι τιμές φθορισμού αυξάνουν συνεχώς με την αύξηση του χρόνου επώασης και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε ολονύχτια επώαση για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού με φυσική προσρόφηση. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι με επώαση για 1 ώρα λαμβάνεται σήμα ίσο με το 85% του σήματος που λαμβάνεται με ολονύχτια επώαση και επομένως θα μπορούσε η διάρκεια της επώασης να



Διάγραμμα 5: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρόνου επώασης επιφανειών διοξειδίου (λευκές στήλες) ή νιτριδίου του πυριτίου (διαγραμμισμένες στήλες) που είχαν τροποποιηθεί με υδατικό διάλυμα APTES συγκέντρωσης 2% (ο/ο) με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 200 μm/mL. Σε όλες τις περιπτώσεις ακολούθησε αντίδραση για 1 ώρα με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Πρσδιορίστηκε επίσης ο ελάχιστος χρόνος μετά την τροποποίηση με APTES που οι επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσρόφηση των γ-σφαιρινών ποντικού. Για τον σκοπό αυτό, επιφάνειες διοξειδίου και

νιτριδίου του πυριτίου επωάστηκαν αμέσως μετά την τροποποίηση (χρόνος 0), 24, 48 και 72 ώρες με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 200 μg/mL. Ακολούθησε ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.63. Όπως προκύπτει από το διάγραμμα 6, όπου παρουσιάζονται οι τιμές φθορισμού που ελήφθησαν, μέγιστες τιμές οροφής λαμβάνονται μετά από παραμονή των επιφανειών για χρονικό διάστημα ίσο με ή μεγαλύτερο από 48 ώρες. Ο λόγος που παρατηρούνται χαμηλές τιμές φθορισμού όταν οι επιφάνειες χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά την παρασκευή τους οφείλεται πιθανότατα στην χαμηλή γωνία επαφής της επιφάνειας (βλέπε εδάφιο 7.4), λόγω της υδροφιλοποίησης, η οποία δεν ευνοεί την ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων.



Διάγραμμα 6: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρόνου παραμονής επιφανειών διοξειδίου (λευκές στήλες) ή νιτριδίου του πυριτίου (διαγραμμισμένες στήλες) που είχαν τροποποιηθεί με υδατικό διάλυμα APTES συγκέντρωσης 2% (o/o) πριν την προσρόφηση διάλυματος γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 200 μm/mL. Σε όλες τις περιπτώσεις ακολούθησε αντίδραση για 1 ώρα με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.2. Βελτιστοποίηση μεθόδου τροποποίησης με διάλυμα APTES σε αιθανόλη

7.2.1. Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης APTES

Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου τροποποίησης επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου με διάλυμα APTES σε απόλυτη αιθανόλη ήταν η συγκέντρωση του APTES. Για τον σκοπό αυτό επιφάνειες εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα APTES σε αιθανόλη συγκέντρωσης 0,2, 0,5, 1, 2, και 5% (o/o) για 20 λεπτά. Ακολούθησε ξήρανση για 20 λεπτά στους 120 °C και οι επιφάνειες παρέμειναν για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και την ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στα εδάφια 5.6.1 και 5.63, αντίστοιχα. Οι τιμές φθορισμού που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στο σχήμα 7. Και σε αυτήν την περίπτωση, όπως και στο πρωτόκολλο με το υδατικό διάλυμα APTES, οι επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου παρέχουν χαμηλότερες τιμές σήματος (περίπου 15%) για όλες τις συγκεντρώσεις APTES σε σχέση με τις τιμές που λαμβάνονται από τις αντίστοιχες επιφάνειες διοξειδίου. Εν τούτοις, και για τα δύο είδη επιφανειών, μέγιστες τιμές οροφής επιτυγχάνονται για αυτό το πρωτόκολο μοι διάλυμα APTES συγκέντρωσης 5% (o/o) ΑΡΤΕS. Για τον λόγο αυτό αυτή η περιεκτικότητα APTES σε αιθανόλη επιλέχθηκε για περαιτέρω βελτιστοποίηση.



Διάγραμμα 7: Τιμές σήματος φθορισμού που προσδιορίστηκαν από επιφάνειες διοξειδίου (μωβ τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) οι οποίες είχαν τροποποιηθεί με διαλύματα

APTES διαφορετικής συγκέντρωσης σε αιθανόλη. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν διάλυμα γσφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 200 μm/mL για 1 ώρα και ακόλουθως με αντίσωμα κατά των γσφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.2.2. Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης της επιφάνειας με το διάλυμα ΑΡΤΕS σε αιθανόλη

Μετά την επιλογή της συγκέντρωσης του APTES, βελτιστοποιήθηκε ο χρόνος επώασης των επιφανειών διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου με το διάλυμα APTES σε αιθανόλη. Μελετήθηκαν τέσσερεις χρόνοι επώασης 5, 20, 60 και 120 λεπτά. Ακολούθησε ξήρανση για 20 λεπτά στους 120 °C και οι επιφάνειες παρέμειναν για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού και την ανίχνευση των ακινητοποιήση των γ-σφαιρινών ποντικού και την ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στα εδάφια 5.6.1 και 5.63, αντίστοιχα. Η μεταβολή του σήματος φθορισμού παρουσιάζεται στο διάγραμμα 8. Όπως προκύπτει από το διάγραμμα, το σήμα φθορισμού αυξάνει για χρόνους επώασης μέχρι και 1 ώρα οπότε και λαμβάνονται μέγιστες τιμές οροφής. Ως εκ τούτου επιλέχθηκε χρόνος επώασης 1 ώρας για περαιτέρω πειραματισμό.



Διάγραμμα 8: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρόνου επώασης των επιφανειών διοξειδίου (πράσινα τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) σε διάλυμα APTES συγκέντρωσης 5% (0/0) σε αιθανόλη. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με διάλυμα γ-σφαιρινών

ποντικού συγκέντρωσης 200 μm/mL για 1 ώρα και ακολούθως με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Εκτός από την βέλτιστη συγκέντρωση και τον χρόνο επώασης του διαλύματος APTES με τις επιφάνειες προσδιορίστηκε ο χρόνος θερμικής κατεργασίας καθώς και ο ελάχιστος χρόνος που οι επιφάνειες ήταν κατάλληλες για προσρόφηση πρωτεϊνικών μορίων και βρέθηκε ότι ήταν όμοιες με αυτές του πρωτοκόλλου τροποποιήσης με υδατικό διάλυμα APTES. Μετά και αυτές τις βελτιστοποιήσεις καταρτίστηκε το τελικό πρωτόκολλο τροποποίησης επιφανειών διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου με διάλυμα APTES 5% (ο/ο) σε αιθανόλη το οποίο περιλαμβάνει επώαση 1 ώρα, θερμική κατεργασία στους 120 °C για 20 λεπτά, και παραμονή για 48 ώρες πριν την χρήση τους για την ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων με προσρόφηση.

7.2.3. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης γ-σφαιρινών ποντικού για την επικάλυψη των επιφανειών πυριτίου

Σε επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου οι οποίες είχαν τροποποιηθεί με το τελικό πρωτόκολλο APTES σε αιθανόλη προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του διαλύματος γ-σφαιρινών ποντικού για την επικάλυψη των επιφανειών. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα γσφαιρινών συγκέντρωσης 25, 50, 100, 200 και 500 μg/mL. Μετά από επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησε ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.63. Οι τιμές φθορισμού που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα 9. Παρατηρείται μια συνεχής αύξηση του σήματος φθορισμού καθώς η συγκέντρωση των γ-σφαιρινών ποντικού οδιάλυμα εναπόθεσης αυξάνει από 25 έως και 200 μg/mL, οπότε και λαμβάνονται μέγιστες τιμές φθορισμού. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των γ-σφαιρινών ποντικού οδηγεί σε πτώση των τιμών φθορισμού (<10%). Η πτώση αυτή μπορεί να οφείλεται στο ότι τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια μόρια αποκτούν τέτοια διαμόρφωση που παρεμποδίζεται η δέσμευση του αντισώματος. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 200 μg/mL για περαιτέρω πειράματα.


Διάγραμμα 9: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος γσφαιρινών ποντικού που χρησιμοποιήθηκε για επικάλυψη επιφανειών διοξειδίου (μωβ τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) οι οποίες είχαν τροποποιηθεί με διάλυμα APTES 5% (o/o) σε αιθανόλη. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με τα διαλύματα των γ-σφαιρινών ποντικού για 1 ώρα και ακολούθως για 1 ώρα με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.2.4. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου επώασης με το διάλυμα των γσφαιρινών ποντικού

Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου επώασης των τροποποιημένων με APTES επιφανειών με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού, επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου επωάστηκαν για 0,5, 1, 3 και 18 ώρες με διάλυμα συγκέντρωσης 200 μg/mL. Ακολούθησε ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο 5.63. Από το διάγραμμα 10, όπου παρουσιάζονται οι τιμές φθορισμού που ελήφθησαν για τους διαφορετικούς χρόνους επώασης με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού, προκύπτει ότι το σήμα αυξάνει με την αύξηση του χρόνου επώασης μέχρι και τις 18 ώρες και για τον λόγο αυτό αυτός ο χρόνος υιοθετήθηκε για το τελικό πρωτόκολλο. Και σε αυτή την περίπτωση, επώαση για 1 ώρα παρέχει σήμα ίσο περίπου με το 85% του σήματος που λαμβάνεται για ολονύχτια επώαση.



Διάγραμμα 10: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρόνου επώασης επιφανειών διοξειδίου (λευκές στήλες) ή νιτριδίου του πυριτίου (διαγραμμισμένες στήλες) που είχαν τροποποιηθεί με διάλυμα APTES συγκέντρωσης 5% (o/o) σε αιθανόλη με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 200 μm/mL. Σε όλες τις περιπτώσεις ακολούθησε αντίδραση για 1 ώρα με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.3. Βελτιστοποίηση μεθόδου τροποποίησης με ΑΡΤΕS και γλουταραλδεΰδη

7.3.1. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης διαλύματος γλουταραλδεΰδης

Η μέθοδος τροποποίησης των επιφανειών με γλουταραλδεύδη βασίζεται στην μετατροπή των αμινομάδων της επιφάνειας, που έχουν εισαχθεί μέσω τροποποίησης με APTES, σε αλδεϋδομάδες οι οποίες στην συνέχεια αντιδρούν με τις ε-αμινομάδες των καταλοίπων λυσίνης των πρωτεϊνικών μορίων, οδηγώντας σε ομοιοπολική ακινητοποίησή τους στην επιφάνεια. Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε για αυτό το πρωτόκολλο ήταν η συγκέντρωση της γλουταραλδεΰδης. Για τον σκοπό αυτό επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη, επώαστηκαν με διαλύμτα γλουταραλδεύδης συγκέντρωσης 0,5, 1, 2,5 και 5% (ο/ο) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM, pH 7,4, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ακινητοποίηση των γσφαιρινών ποντικού και την ανίχνευση των ακινητοποιημένων μορίων με φθορισμοεπισημασμένο αντίσωμα όπως περιγράφεται στα εδάφια 5.6.2 και 5.63, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 11 από όπου προκύπτει ότι μέγιστες τιμές φθορισμού λαμβάνονται για συγκέντρωση γλουταραλδεΰδης ίση ή μεγαλύτερη από 2,5% (0/0). Επίσης και για αυτό το πρωτόκολλο οι επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου παρέγουν υψηλότερες τιμές φθορισμού (15-20%) σε σχέση με τις επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου, χωρίς ωστόσο ιδιαίτερες διαφορές όσον αφορά την επαναληψιμότητα του σήματος από κηλίδα σε κηλίδα στην ίδια επιφάνεια ή την ομοιογένεια του σήματος σε κάθε κηλίδα.



Διάγραμμα 11: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος γλουταραλδεύδη με το οποίο επωαστηκαν επιφάνειες διοξειδίου (καφέ τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) που είχαν τροποποιηθεί με διάλυμα APTES 5% (ο/ο) σε αιθανόλη. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού 200 μg/mL για 1 ώρα και ακολούθως με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.3.2. Προσδιορισμός βέλτιστου διαλύματος αραίωσης της γλουταραλδεΰδης

Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου τροποποίησης με APTES/γλουταραλδεΰδη, δοκιμάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής τιμής pH ως διαλύματα αραίωσης του διαλύματος της γλουταραλδεΰδης. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών συγκέντρωσης 50 mM και pH 6,5, 7,4 και 8,0 καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2. Όπως προκύπτει από το διάγραμμα 12, τα βέλτιστα αποτελέσματα ελήφθησαν για ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 50 mM, pH 7,4. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου.



Διάγραμμα 12: Τιμές φθορισμού που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε διαλύμα γλουταραλδεύδης συγκέντρωσης 2,5% (ο/ο) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,5 (στήλη 1), 7,4 (στήλη 2) και 8,0 (στήλη 3) ή ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών pH 9,2 (στήλη) με το οποίο επωάστηκαν επιφάνειες διοξειδίου (λευκές στήλες) ή νιτριδίου του πυριτίου (διαγραμμισμένες στήλες) που είχαν τροποποιηθεί με διάλυμα APTES 5% (ο/ο) σε αιθανόλη. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού 200 μg/mL για 1 και ακολούθως με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.3.3. Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου αντίδρασης με το διάλυμα γλουταραλδεΰδης

Η επόμενη παράμετρος του πρωτοκόλλου τροποποίησης με APTES/γλουταραλδεΰδη, που μελετήθηκε ήταν η διάρκεια του σταδίου επώασης των τροποποιημένων με APTES επιφανειών με το διάλυμα της γλουταραλδεΰδης. Συγκεκριμένα, οι χρόνοι που εξετάστηκαν ήταν 15, 30, 60, 180 λεπτά και ολονύχτια επώαση (18-22 ώρες). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 13, για το διοξείδιο του πυριτίου μέγιστες τιμές οροφής επιτυγχάνονται για επώαση των επιφανειών με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού επί 60 λεπτά. Για το νιτρίδιο του πυριτίου οι τιμές συνεχίζουν να αυξάνουν ακόμα και μετά από ολονύχτια επώαση με το διάλυμα των γ-σφαιρινών ποντικού. Η αύξηση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα ακινητοποίησης των γ-σφαιρινών και με φυσική προσρόφηση για παρατεταμένο χρόνο επώασης με την επιφάνεια, πέρα από την ομοιοπολική σύνδεση που λαμβάνει χώρα και πιθανώς ολοκληρώνεται μέσα σε 1 ώρα όπως στην περίπτωση του διοξειδίου του πυριτίου.



Διάγραμμα 13: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρόνου επώασης με το διάλυμα γ-σφαιρινών επιφανειών διοξειδίου (γαλάζια τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) που είχαν τροποποιηθεί με διάλυμα APTES σε αιθανόλη περικετικότητας 5% (ο/ο) και στη συνέχεια με διάλυμα γλουταραλδεύδης 2,5% (ο/ο) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4. Ακολούθησε επώαση με διάλυμα γ-σφαιρινών ποντικού 200 μg/mL για 1 ώρα και με αντίσωμα κατά των γσφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546 επίσης για 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.3.4. Προσδιορισμός επίδρασης θερμικής κατεργασίας των τροποποιημένων με APTES επιφανειών στην αντίδραση με την γλουταραλδεΰδη

Βασικό στάδιο της μεθόδου σιλανοποίησης είναι η θερμική κατεργασία μετά την επώαση της επιφάνειας του διοξειδίου ή νιτριδίου του πυριτίου με το διάλυμα APTES και ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι την ακινητοποίηση των βιομορίων. Στην περίπτωση που οι επιφάνειες πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων με φυσική προσρόφηση έχει βρεθεί ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα λαμβάνονταν όταν οι επιφάνειες παρέμεναν για τουλάχιστον 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου αλλά στην περίπτωση που η ακινητοποίηση πραγματοποιείται με ομοιοπολική σύνδεση η παραμονή μπορεί να επηρεάζει αρνητικά την ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων. Για να διευκρινιστεί πως αυτοί οι δύο παράγοντες επηρεάζουν την ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων, επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου τροποποιημένες με APTES 2% (ο/ο) σε νερό και 5% (ο/ο) σε αιθανόλη για 20 λεπτά και 1 ώρα, αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν ή τροποποιήθηκαν με γλουταραλδεΰδη 2,5 % (ο/ο) πριν και μετά από κατεργασία στους 120 °C την ίδια ημέρα ή τρεις ημέρες μετά την παρασκευή τους.

Από το σχήμα προκύπτει ότι για επιφάνειες που παρασκευάστηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο με APTES σε νερό ή αιθανόλη η ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων με φυσική προσρόφηση παρέχει υψηλότερα σήματα όταν εκείνες δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως μετά την παρασκευή τους αλλά 48-72 ώρες μετά. Αντίθετα, όσον αφορά την ομοιοπολική σύνδεση, τα υψηλότερα σήματα ελήφθησαν από επιφάνειες που είχαν θερμανθεί στους 120 °C μετά την τροποποίηση με APTES και χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά για την ακινητοποίηση των γ-σφαιρινών ποντικού.



Διάγραμμα 14: Ένταση σήματος φθορισμού από επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με 5% (o/o) APTES/αιθανόλη (στήλες 1, 3) ή 2% (o/o) APTES/νερό (στήλες 2, 4) και χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν (μαύρες στήλες) ή τροποποιήθηκαν με γλουταραλδεΰδη πριν (κόκκινες στήλες) και μετά από κατεργασία στους 120 °C (μπλε στήλες) την ίδια ημέρα (στήλες 1 & 2) ή τρεις ημέρες μετά την παρασκευή τους (στήλες 3 & 4). Η συγκέντρωση των γ-σφαιρινών ποντικού ήταν 200 ng/mL και του φθορισμοσημασμένου αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού 5 μg/mL και οι χρόνοι επώασης για καθένα από τα διαλύματα ήταν 1 ώρα. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.3.5. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης γ-σφαιρινών ποντικού για την επικάλυψη των επιφανειών πυριτίου που έχουν τροποποιηθεί με ΑΡΤΕS/γλουταραλδεΰδη

Καθώς ο μηχανισμός ακινητοποίησης των πρωτεϊνών είναι διαφορετικός για τις επιφάνειες που έχουν τροποποιηθεί με APTES και γλουταραλδεΰδη σε σχέση με τον αντίστοιχο για τις επιφάνειες που έχουν τροποποιηθεί με APTES προσδιορίστηκε και σε αυτή την περίπτωση η βέλτιστη συγκέντρωση των γ-σφαιρινών ποντικού για ακινητοποίηση σε επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 15 και 16, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό και γλουταραλδευδη, βρέθηκε ότι μέγιστες τιμές σήματος φθορισμού λαμβάνονται για συγκέντρωση ίση με 200 μg/mL, ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος των γ-σφαιρινών ποντικού στα 500 μg/mL οδηγεί με μικρή πτώση του σήματος φθορισμού περίπου 10% της μέγιστης τιμής. Ανάλογη πτώση δεν παρατηρείται για τις επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου για τις οποίες επιτυγχάνονται μέγιστες τιμές οροφής για συγκέντρωση γ-σφαιρινών ποντικού ίση με ή μεγαλύτερη από 200 μg/mL.



Διάγραμμα 15: Μεταβολή του σήματος φθορισμού που ελήφθει από επιφάνειες διοξειδίου (γκρι τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη/γλουταραλδεΰδη συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος γ-σφαιρινών ποντικού. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με τα διαλύματα των γ-σφαιρινών για 1 ώρα και ακολούθησε αντίδραση για 1 ώρα με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά που ελήφθησαν για τις επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδευδη, ελήφθησαν και για τις επιφάνειες διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό και γλουταραλδευδη όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 16. Και σε αυτή περίπτωση μέγιστο σήμα φθορισμού ελήφθει για συγκέντρωση γ-σφαιρινών ποντικού για συγκέντρωση ίση με 200 μg/mL για τις επιφάνειες διοξειδίου.



Διάγραμμα 16: Μεταβολή του σήματος φθορισμού που ελήφθει από επιφάνειες διοξειδίου (καφέ τετράγωνα) ή νιτριδίου του πυριτίου (μαύρα τετράγωνα) που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό/γλουταραλδεΰδη συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος γ-σφαιρινών ποντικού. Όλες οι επιφάνειες επωάστηκαν με τα διαλύματα των γ-σφαιρινών για 1 ώρα και ακολούθησε αντίδραση για 1 ώρα με αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σημασμένο με AF546. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Μετά τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης των γ-σφαιρινών ποντικού για επικάλυψη επιφανειών διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με APTES και γλουταραλδεΰδη, προσδιορίστηκε και ο βέλτιστος χρόνος επώασης των επιφανειών με το διάλυμα των γ-σφαιρινών κουνελιού. Μελετήθηκαν χρόνοι επώασης από 5 λεπτά έως και 2 ώρες και βρέθηκε ότι μέγιστες τιμές οροφής του σήματος φθορισμού λαμβάνονται για χρόνο επώασης ίσο ή μεγαλύτερο της 1 ώρας. Έτσι αυτός ο χρόνος επώασης με το διάλυμα των πρωτεϊνικών μορίων υιοθετήθηκε για το τελικό πρωτόκολλο.

7.4. Σταθερότητα κατά την γήρανση

Μία άλλη σημαντική παράμετρος που μελετήθηκε ήταν σταθερότητα των τροποποιημένων με APTES ή APTES/γλουταραλδεύδη επιφανειών ως προς την ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων.

Στο πλαίσιο αυτό επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό (2% ο/ο) ή αιθανόλη (5% ο/ο) χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση γ-σφαιρινών ποντικού σε διάφορες χρονικές στιγμές σε χρονικό διάστημα 60 ημέρων από την παρασκευή τους. Ακολούθησε ακινητοποίηση γ-σφαιρινών ποντικού και ανίχνευσή τους με αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Οι τιμές φθορισμού που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα 17, από το οποίο προκύπτει ότι αμέσως μετά την παρασκευή των επιφανειών η ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνικών μορίων είναι σχετικά χαμηλή και αυξάνει σταδιακά μέχρι και τις 3 ημέρες οπότε και λαμβάνει τη μέγιστη τιμή, την οποία διατηρεί μέχρι και 21 ημέρες (3 εβδομάδες) μετά την παρασκευή των επιφανειών παρατηρείται μια σταδιακή πτώση του σήματος φθορισμού. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων οι τροποποιημένες με ΑΡΤΕS μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι και 3 εβδομάδες μετά την παρασκευή τους για την ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων είναι τους για την ακινητοποίηση σύστος αρορισμού.



Διάγραμμα 17: Μεταβολή του σήματος φθορισμού συναρτήσει του χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί από την τροποποίηση των επιφανειών διοξειδίου του πυριτίου με 5% (o/o) APTES σε αιθανόλη (πορτοκαλί τετράγωνα) ή 2% (o/o) APTES σε νερό (μαύρα τετράγωνα) έως την προσρόφηση διαλύματος γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 200 μg/mL. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η μεταβολή της γωνίας επαφής των τροποποιημένων με APTES επιφανειών διοξειδίου του πυριτίου είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει την ικανότητα ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων με φυσική προσρόφηση πραγματοποιήθηκαν για τα ίδια χρονικά διαστήματα μετρήσεις της γωνίας επαφής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 18. Όπως φαίνεται η γωνία επαφής είναι αρκετά χαμηλή μέχρι και 1 ημέρα μετά την παρασκευή των επιφανειών, δηλαδή με άλλα λόγια οι επιφάνειες είναι υδρόφιλες, γεγονός που εξηγεί την μικρότερη ικανότητα προσρόφησης πρωτεινικών μορίων. Η γωνία επαφής αποκτά την μέγιστη τιμή της 15 ημέρες μετά την παρασκευή των επιφανειών και παραμένει σταθερή μέχρι και 2 μήνες μετά.



Διάγραμμα 18: Μεταβολή της γωνίας επαφής συναρτήσει του χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί από την τροποποίηση των επιφανειών διοξειδίου του πυριτίου με 5% (o/o) APTES σε αιθανόλη (πράσινα τρίγωνα) ή 2% (o/o) APTES σε νερό (μπλέ κύκλοι). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Επομένως η γωνία επαφής από μόνης της δεν επαρκεί για να εξηγήσει τη μειωμένη προσρόφηση πρωτεϊνικών μορίων στις τροποποιημένες με APTES επιφάνειες που παρατηρήθηκε για χρόνους μεγαλύτερους των 21 ημερών από την παρασκευή τους. Πιθανότατα επέρχονται κάποιες αλλαγές στην χημική σύσταση της επιφάνειας που επιδρούν αρνητικά στην ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων με προσρόφηση.

Όσον αφορά τις επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό (2% ο/ο) ή αιθανόλη (5% ο/ο) και στην συνέχεια με γλουταραλδεΰδη, το μέγιστο σήμα φθορισμού λαμβανόταν όταν χρησιμοποιούνταν για την ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων αμέσως μετά την παρασκευή τους ενώ παρατηρήθηκε σταδιακή πτώση της ικανότητας ακινητοποίησης πρωτεϊνών η οποία καθιστούσε μη αποτελεσματική τη χρήση επιφανειών 3 ημέρες μετά την παρασκευή τους.

7.5. Εφαρμογή των βέλτιστων πρωτοκόλλων τροποποίησης επιφανειών διοξειδίου του πυριτίου για την ανάπτυξη οπτικού αισθητήρα

7.5.1. Ανάπτυξη αισθητήρα που βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός για την παρακολούθηση της αντίδρασης γ-σφαιρινών ποντικού/αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού

Τα πρωτόκολλα χημικής τροποποίησης επιφανείων διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου που αναπτύχθηκαν εφαρμόστηκαν για την τροποποίηση ψηφίδων διοξειδίου του πυριτίου με γσφαιρίνες ποντικού και την χρήση τους ως υποστρωμάτων για την παρακολούθηση της αντίδρασης με μη σημασμένο αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού σε πραγματικό χρόνο με οπτικό αισθητήρα φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (WLRS). Στο διάγραμμα 19, παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από τον βιοαισθητήρα WLRS κατά την διαβίβαση διαλυμάτων αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού συγκέντρωσης 0,5, 1.0, 2,5, 5,0 και 10 μg/mL από ψηφίδες στις οποίες είχαν ακινητοποιηθεί γ-σφαιρίνες ποντικού μετά από τροποποίηση τους με APTES 2% (ο/ο) σε νερό ή 5% (ο/ο) σε αιθανόλη με ή χωρίς επιπλέον τροποποίηση με γλουταραλδεΰδη.



Διάγραμμα 19: Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από τον βιοαισθήρα WLRS κατά τη διαβίβαση διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού από ψηφίδες στις οποίες είχαν ακινητοποιηθεί γ-σφαιρίνες ποντικού (200 μg/mL) μετά από τροποποίηση με (α) 2% (ο/ο) APTES σε νερό, (β) 2% (ο/ο) APTES σε νερό και γλουταραλδεΰδη, (γ) 5% (ο/ο) APTES σε αιθανόλη, και (δ) 5% (ο/ο) APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη. Οι συγκεντρώσεις του αντισώματος ήταν 0,5 (μαύρη γραμμή), 1,0 (κόκκινη γραμμή), 2,5 (μπλε γραμμή), 5,0 (πράσινη γραμμή) και 10 μg/ml (ροζ γραμμή). Η ταχύτητα ροής των διαλυμάτων ήταν 50 μl/min. Το βέλος υποδεικνύει την εισαγωγή του διαλύματος του αντισώματος.

Στο διάγραμμα 20 παρουσιάζονται οι τιμές σήματος που ελήφθησαν από τον αισθητήρα WLRS μετά από διαβίβαση των διαλυμάτων του αντισώματος για 7,5 λεπτά συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος. Η μέθοδος τροποποίησης που παρείχε τις χαμηλότερες αποκρίσεις ήταν το πρωτόκολλο τροποποίησης με 2% (ο/ο) APTES σε νερό και εκείνη που παρείχε τις υψηλότερες τιμές ήταν η τροποποίηση με 5% (ο/ο) APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη. Επίσης από το διάγραμμα προκύπτει ότι υπάρχει διαφορά στην απόκριση

όταν η τροποποίηση με APTES γίνεται με χρήση υδατικού διαλύματος σε σχέση με την απόκριση των επιφανειών που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη. Συγκεκριμένα, οι αποκρίσεις των ψηφίδων που έχουν τροποποιηθεί με APTES σε νερό τείνουν να λαμβάνουν τιμές οροφής σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με APTES σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί μια αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με αρτες συγκεντρώσεις αντισώματος δια αρείς όμως παρέχουν υψηλότερα σήματα για τις μικρότερες συγκεντρώσεις αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού.



Διάγραμμα 20: Τιμές σήματος που προσδιορίστηκαν από επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου κατά την διαβίβαση διαλυμάτων αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού για 7,5 λεπτά με ταχύτητα ροής 50 μl/min συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος. Οι επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τροποποιηθεί με διάλυμα APTES 2% (o/o) σε νερό (μαύρα τετράγωνα), APTES 2% (o/o) σε νερό και γλουταραλδεύδη (κόκκινοι κύκλοι), APTES 5% (o/o) σε αιθανόλη (μπλε τρίγωνα), ή APTES 5% (o/o) σε αιθανόλη και γλουταραλδεύδη (πράσινα τρίγωνα). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.5.2. Ανάπτυξη αισθητήρα που βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP)

7.5.2.1 Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης αντισώματος κατά της CRP για ακινητοποίηση στις ψηφίδες

Ο ανοσοχημικός προσδιορισμός της CRP που αναπτύχθηκε ήταν μη ανταγωνιστικού τύπου δύο σταδίων, δηλαδή περιελάμβανε ένα στάδιο αντίδρασης του ακινητοποιημένου στις ψηφίδες αντισώματος (αντίσωμα δέσμευσης) με την CRP στα πρότυπα διαλύματα και στη συνέχεια αντίδραση της ανοσοπροσροφημένης CRP με αντίσωμα κατά της CRP (αντίσωμα ανίχνευσης). Αρχικά, προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του αντισώματος δέσμευσης για την τροποποίηση των ψηφίδων. Στο διάγραμμα 21 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με 2% (o/o) APTES σε νερό κατά την διαβίβαση προτύπου διαλύματος CRP συγκέντρωσης 2 μg/mL για 10 λεπτά ακολουθούμενη από αντίδραση με διάλυμα αντισώματος κατά της CRP συγκέντρωσης 10 μg/mL για 5 λεπτά συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της CRP που χρησιμοποιήθηκε για ακινητοποίηση στις ψηφίδες.



Διάγραμμα 21: Μεταβολή του σήματος που λαμβάνεται από τον αισθητήρα WLRS κατά τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της CRP συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά της CRP που έχει χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση σε ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με 2% (ο/ο)

APTES σε νερό. Σε όλες τις περιπτώσεις διαβιβάστηκε προτύπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 2 μg/mL για 10 λεπτά και στη συνέχεια διάλυμα αντισώματος κατά της CRP συγκέντρωσης 10 μg/mL για 5 λεπτά υπό σταθερή ροή 50 μl/min. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι μέγιστες τιμές οροφής λαμβάνονται για συγκεντρώσεις αντισώματος ίσες με ή μεγαλύτερες από 100 μg/mL. Αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω πειράματα.

7.5.2.2. Πρότυπες καμπύλες CRP

Χρησιμοποιώντας ψηφίδες διοξειδίου του πυριτίου στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα κατά της CRP (100 μg/mL) μετά από τροποποίηση τους με APTES 2% (0/0) σε νερό, APTES 5% (o/o) σε αιθανόλη ή APTES 5% (o/o) σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη, ελήφθησαν πρότυπες καμπύλες με διαβίβαση προτύπων διαλυμάτων CRP συγκέντρωσης 0,005, 0,02, 0,1, 0,5, και 2µg/ml. Όλα τα πρότυπα διαλύματα διαβιβάστηκαν για 10 λεπτά και ακολούθησε διαβίβαση για 5 λεπτά αντισώματος κατά της CRP. Οι αποκρίσεις του αισθητήρα σε πραγματικό χρόνο παρουσιάζονται στο διάγραμμα 22. Σε όλες τις περιπτώσεις κατά το πρώτο στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού παρατηρείται συνεχής αύξηση του σήματος για τις μικρές συγκεντρώσεις CRP στο διάστημα των 10 λεπτών που διαρκεί η αντίδραση ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φτάνουν στο ίδιο χρονικό διάστημα σε τιμές οροφής. Αντίθετα, για το δεύτερο στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού, οι αποκρίσεις που αντιστοιχούν στις μικρές συγκεντρώσεις CRP φτάνουν σε τιμές οροφής στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών που διαρκεί η αντίδραση ενώ για τις μεγάλες συγκεντρώσεις οι αποκρίσεις, παρότι τείνουν σε τιμές οροφής, συνεχίζουν να αυξάνονται. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς υπάρχουν συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης για την CRP στο ακινητοποιημένο αντίσωμα δέσμευσης οι οποίες κορένυνται ταχύτερα όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της CRP. Ομοίως για το δεύτερο στάδιο της ανοσοαντίδρασης, τα ανοσοπροσροφημένα μόρια της CRP αυξάνονται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της στα πρότυπα διαλύματα που διαβιβάστηκαν στο πρώτο στάδιο και επομένως ο κορεσμός όσον αφορά τα μόρια του αντισώματος που αντιδρά στο δεύτερο στάδιο επέρχεται ταχύτερα για τις μικρότερες συγκεντρώσεις CRP.



Διάγραμμα 22: Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από τον βιοαισθήρα WLRS κατά τη διαβίβαση από ψηφίδες στις οποίες είχαν ακινητοποιηθεί αντίσωμα κατά της CRP (100 μg/mL) προτύπων διαλυμάτων CRP συγκέντρωσης 0 (μαύρη γραμμή), 0,005 (κόκκινη γραμμή), 0,02 (μπλε

γραμμή), 0,1 (πράσινη γραμμή), 0,5 (πορτοκαλί γραμμή), και 2 μg/ml (μωβ γραμμή), για 10 λεπτά ακολουθούμενη από διαβίβαση για 5 λεπτά αντισώματος κατά της CRP υπό σταθερή ροή 50 μl/min. Οι επιφάνειες είχαν τροποποιηθεί με (α) 2% (ο/ο) APTES σε νερό, (β) 5% (ο/ο) APTES σε αιθανόλη, και (γ) 5% (ο/ο) APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη. Τα βέλη υποδεικνύουν την εισαγωγή του προτύπου διαλύματος της CRP και του διαλύματος του αντισώματος, αντίστοιχα.

Στο διάγραμμα 23 παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες CRP με βάση τα αποτελέσματα του διαγράμματος 22. Όπως φαίνεται τις υψηλότερες τιμές για όλη την περιοχή συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων παρείχε η επιφάνεια που είχε τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη. Από κάθε καμπύλη προσδιορίστηκε η ελέχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα CRP ή το όριο ανίχνευσης ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε σήμα ίσο με 3 φορές την τυπική απόκλιση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του σήματος προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης. Έτσι τα όρια ανίχνευσης που προσδιορίστηκαν ήταν 7,5 ng/mL για την επιφάνεια που είχε τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη, 8,5 ng/mL για την επιφάνεια που παρασκευάστηκε με APTES σε αιθανόλη/γλουραταλδεΰδη, και 10 ng/mL για την επιφάνεια που παρασκευάστηκε με APTES σε νερό. Επόμενως στην περίπτωση αυτή, η φυσική προσρόφηση παρείχε ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την ομοιπολική ακινητοποίηση του αντισώματος κατά της CRP.



Διάγραμμα 23: Τυπικές καμπύλες CRP που ελήφθησαν από επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με 2% (o/o) APTES σε νερό (μαύρα τετράγωνα), 5% (o/o) APTES σε αιθανόλη (κόκκινα τετράγωνα),

και 5% (o/o) APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη (μπλε τετράγωνα). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση.

7.5.2.3. Σταθερότητα του ακινητοποιημένου αντισώματος

Για τον έλεγχο της σταθερότητας του ακινητοποιημένου στις ψηφίδες αντισώματος κατά της CRP πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ανοσοαντίδρασης και αναγέννησης της επιφάνειας, δηλαδή απομάκρυνσης των ανοσοσυμπλεγμάτων. Για την αναγέννηση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5, το οποίο είχε προσδιοριστεί σε προηγούμενη εργασία ότι ήταν το βέλτιστο για το συγκεκριμένο αντίσωμα και διαβιβάστηκε από την ψηφίδα για 3 λεπτά. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με 2% (ο/ο) APTES σε νερό, 5% (ο/ο) APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη παρουσιάζονται στο διάγραμμα 24. Από το διάγραμμα προκύπτει πως για τους 8 κύκλους ανοσοανάλυσης/αναγέννησης που πραγματοποιήθηκαν οι αποκρίσεις και από τρεις ψηφίδες ήταν επαναλήψιμες καθώς η επί τοις εκατό διακύμανση των τιμών ήταν σε όλες τις περιπτώσεις <3%.



Διάγραμμα 24: Αποκρίσεις που ελήφθησαν με τον βιοαισθήρα WLRS από ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με 2% (o/o) APTES σε νερό (μαύρα τετράγωνα), 5% (o/o) APTES σε αιθανόλη (κόκκινα τετράγωνα), και 5% (o/o) APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη (μπλε τετράγωνα) για επαναλαμβανόμενους κύκλους ανοσοπροσδιορισμού/αναγγένησης. Στις ψηφίδες είχε ακινητοποιηθεί αντίσωμα κατά της CRP (100 μg/mL) και διαβιβάστηκε πρότυπο διάλυμα CRP συγκέντρωσης 0,1 μg/mL για 10 λεπτά ακολουθούμενη από διαβίβαση για 5 λεπτά αντισώματος κατά της CRP υπό

σταθερή ροή 50 μl/min. Το διάλυμα αναγέννησης που ήταν ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-HCl 0,1 M, pH 2,5, διαβιβάστηκε για 3 λεπτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές που συνδυάζουν ένα βιομόριο αναγνώρισης σε στενή επαφή με έναν μεταλλάκτη σήματος ο οποίος μετατρέπει σε μετρήσιμο σήμα μια φυσικοχημική μεταβολή που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του βιομορίου με τον αναλύτη στο δείγμα. Οι οπτικοί αισθητήρες αποτελούν μια από τις πλέον υποσχόμενες κατηγορίες βιοαισθητήρων λόγω των ποικίλων αρχών ανίχνευσης αλλά και της μεγάλης ευαισθησίας ανίχνευσης που προσφέρουν. Προκειμένου να αξιοποιηθούν στο έπακρο οι αναλυτικές ικανότητες των οπτικών αισθητήρων θα πρέπει τα βιομόρια αναγνώρισης να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια του μεταλλάκτη με τρόπο που να εξασφαλίζει την υψηλότερη δυνατή λειτουργικότητα τους αλλά και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την χημική/βιολογική ενεργοποίηση των αισθητήρων εξαρτώνται κυρίως από το υλικό του αισθητήρα. Για οπτικούς αισθητήρες που βασίζονται σε κυματοδηγούς πυριτικών υλικών (οξείδιο πυριτίου, νιτρίδιο πυριτίου, πυρίτιο σε μονωτικό υλικό, γυαλί) η διαδικασία χημικής/βιολογικής ενεργοποίησης που ακολουθείται περιλαμβάνει καθαρισμό/υδροφιλοποίηση της επιφάνειας, γημική τροποποίηση, συνήθως με σιλάνια, και ακινητοποίηση των βιομορίων. Για τον καθαρισμό εφαρμόζεται συνήθως επεξεργασία με πλάσμα οξυγόνου ή διαλύματα Piranha (μίγματα πυκνού θειικού οξέος και διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου), ώστε αφενός να απομακρυνθούν υπολείμματα οργανικών υλικών από την επιφάνεια των αισθητήρων αλλά και να εμπλουτιστεί η επιφάνεια με ομάδες υδροξυλίου οι οποίες αξιοποιούνται για τη σύνδεση των σιλανίων μέσω συμπύκνωσης τους με τις ομάδες σιλοξανίου. Παράμετροι όπως ο διαλύτης, η περιεκτικότητα σε σιλάνιο, η διάρκεια και η θερμοκρασία της επεξεργασίας επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες του υμενίου που προκύπτει. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σιλάνιο που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο για την χημική ενεργοποίηση οπτικών αισθητήρων που βασίζονται σε πυριτικά υλικά είναι το 3-αμινοπροπυλοτριαιθοξυσιλάνιο (APTES). Σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES τα βιομόρια μπορούν να ακινητοποιηθούν τόσο με φυσική προσρόφηση όσο και με ομοιοπολική σύνδεση. Η φυσική προσρόφηση βασίζεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις Van der Walls μεταξύ της επιφάνειας και των βιομορίων (κυρίως πρωτεϊνών) ενώ η ομοιοπολική σύνδεση σε χημικές αντιδράσεις μεταξύ ομάδων της επιφάνειας και του προς ακινητοποίηση μορίου. Η ομοιοπολική σύνδεση

πρωτεϊνικών μορίων σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES πραγματοποιείται συνήθως με το διδραστικό αντιδραστήριο γλουταραλδεΰδη, ώστε να εισαχθούν στην επιφάνεια δραστικές ομάδες αλδεΰδης οι οποίες αντιδρούν στην συνέχεια με ελεύθερες αμινομάδες στα μόρια των πρωτεϊνών. Η αξιολόγηση των διαφόρων μεθόδων χημικής/βιολογικής ενεργοποίησης πραγματοποιείται μέσω μεθόδων χαρακτηρισμού επιφανείας (π.χ., φασματοσκοπία FT-IR, XPS, ToF-SIMS, AFM, κλπ.) αλλά και με χρήση μορίων σημασμένων με ραδιοϊσότοπα ή φθορίζουσες ουσίες ώστε να εκτιμηθεί τόσο η ποσότητα όσο και η λειτουργικότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της χημικής τροποποίησης ψηφίδων από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου με APTES με στόχο την βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών οπτικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε αυτές τις ψηφίδες μέσω της αύξησης της ποσότητας των βιομορίων αναγνώρισης που ακινητοποιούνται, της λειτουργικότητας τους αλλά και της επαναληψιμότητας της ακινητοποίησης. Επιλέχθηκαν δύο πρωτόκολλα τροποποίησης με APTES, ένα με χρήση υδατικού διαλύματος και ένα με χρήση διαλύματος σε απόλυτη αιθανόλη, και παρασκευάστηκαν επιφάνειες που αξιολογήθηκαν ως προς την ακινητοποίηση γ-σφαιρινών ποντικού τόσο με φυσική προσρόφηση όσο και με ομοιοπολική σύνδεση μετά από τροποποίηση των επιφανειών με το διδραστικό αντιδραστήριο γλουταραλδεΰδη. Η ποσότητα των ακινητοποιημένων γσφαιρινών ποντικού εκτιμήθηκε μέσω αντίδρασης με φθοροσημασμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού και μέτρηση του σήματος φθορισμού.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για καθένα από τα πρωτόκολλα τροποποίησης των επιφανειών διοξειδίου και νιτριδίου του πυριτίου με ΑΡΤΕS. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του σιλανίου και ο βέλτιστος χρόνος επώασης με την επιφάνεια. Βρέθηκε ότι για το πρωτόκολλο τροποποίησης με υδατικό διάλυμα ΑΡΤΕS, τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονταν με εμβάπτιση σε διάλυμα 2% (ο/ο) για 20 λεπτά, ενώ για την τροποποίηση με διάλυμα σε αιθανόλη βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονταν με εμβάπτιση σε διάλυμα 5% (ο/ο) για 1 ώρα. Επίσης βελτιστοποιήθηκε η τροποποίηση με γλουταραλδεΰδη τόσο ως προς την συγκέντρωση του διαλύματος της γλουταραλδεΰδης και τον χρόνο επώασης με τις τροποποιημένες με ΑΡΤΕS επιφάνειες. Βρέθηκε ότι τα τα βέλτιστα αποτελέσματα επιτυγχάνονταν με επώαση σε διάλυμα 2,5% (ο/ο) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4, για 1 ώρα. Τέλος, σε όλα τα πρωτόκολλα την επώαση με το δίαλυμα του ΑΡΤΕS ήταν απαραίτητο να ακολουθήσει θερμική κατεργασία των επιφανειών για 20 λεπτά στους 120 °C για την ομοιοπολική του σύνδεση του υμενίου του APTES με την επιφάνεια και κατά επέκταση την σταθεροποίησή του.

Για κάθε πρωτόκολλο προσδιορίστηκαν επίσης η συγκέντρωση του διαλύματος γσφαιρινών ποντικού και ο χρόνος επώασης με αυτό που παρείχε τα υψηλότερα σήματα. Ο χρόνος επώασης για τον οποίο ελήφθησαν τα υψηλότερα σήματα για τα δύο είδη επιφανειών ήταν 18-22 ώρες (ολονύχτια επώαση) για τις επιφάνειες στις οποίες η ακινητοποίηση βασιζόταν σε φυσική προσρόφηση και 1 ώρα για τις επιφάνειες στις οποίες η ακινητοποίηση βασιζόταν σε ομοιοπολική σύνδεση. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι και στην περίπτωση της φυσικής προσρόφησης μετά από επώαση για 1 ώρα λαμβάνοταν σήμα ίσο περίπου με το 85% του σήματος που επιτυγχανόταν κατά την ολονύχτια επώαση και επομένως και σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος επώασης μπορούσε να περιοριστεί στην 1 ώρα. Για όλα τα πρωτόκολλα ακινητοποίησης παρατηρήθηκε ότι οι επιφάνειες διοξειδίου παρείχαν σταθερά υψηλότερα σήματα (10-15%) σε σχέση με τις επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν σε ένα βαθμό αναμενόμενο καθώς κατά το στάδιο της υδροφιλοποίησης αναμένεται να δημιουργηθούν περισσότερες ομάδες σιλανόλης στο διοξείδιο σε σχέση με το νιτρίδιο και επομένως η τροποποίηση με APTES είναι πιο αποτελεσματική για το διοξείδιο από ότι για το νιτρίδιο. Επίσης για όλα τα πρωτόκολλα τροποποίησης στα οποία η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με φυσική προσρόφηση, οι υψηλότερες τιμές σήματος ελήφθησαν για συγκέντρωση των γ-σφαιρινών ποντικού ίση με 200 μg/mL, ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης στα 500 μg/mL οδήγησε σε πτώση του σήματος (8-10%). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στις πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις γ-σφαιρινών ποντικού τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια μόρια αποκτούν τέτοια πυκνότητα και διαμόρφωση με αποτέλεσμα είτε να παρεμποδίζεται η δέσμευση του αντισώματος ή η πυκνότητα των φθορισμοεπισημασμένων αντισωμάτων που δεσμεύονται είναι τέτοια ώστε παρατηρούνται φαινόμενα απόσβεσης φθορισμού. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε για τις επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου στις οποίες η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με ομοιοπολική σύνδεση αλλά όχι για τις επιφάνειες νιτριδίου πιθανότατα λόγω της ακινητοποίησης μικρότερης ποσότητας γ-σφαιρινών ποντικού και κατά συνέπεια φθορισμοεπισημασμένου αντισώματος.

Διαφορετική συμπεριφορά παρουσίασαν οι επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί μόνο με APTES σε σχέση με αυτές που είχαν τροποποιηθεί με APTES/γλουραραλδεΰδη ως προς την σταθερότητα της ικανότητας πρόσδεσης πρωτεϊνικών μορίων κατά την γήρανση. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι οι επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με APTES παρείχαν τα υψηλότερα σήματα 2-3 ημέρες και μέχρι 3 εβδομάδες μετά την παρασκευή τους. Οι χαμηλές τιμές σήματος για το διάστημα των 2-3 ημέρων αποδόθηκε στην σχετικά χαμηλή γωνία επαφής καθώς οι υδρόφιλες επιφάνειες δεν ευνοούν την ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων με φυσική προσρόφηση. Η μείωση που παρατηρείται όταν οι επιφάνειες χρησιμοποιούνται μετά την πάροδο 3 εβδομάδων από την παρασκευή τους μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή της χημικής σύστασης της επιφάνειας λόγω προσρόφησης οργανικών ή άλλων μορίων από την ατμόσφαιρα η οποία δεν επηρεάζει τη γωνία επαφής αλλά μπορεί να επηρεάζει την προσρόφηση των πρωτεϊνικών μορίων. Όσον αφορά τις επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με APTES/γλουραραλδεΰδη, το μέγιστο σήμα λαμβάνετο όταν χρησιμοποιούνταν αμέσως μετά την παρασκευή τους.

Από την σύγκριση των σημάτων φθορισμού που ελήφθησαν τόσο από επιφάνειες διοξειδίου όσο και από επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου με τις βέλτιστες συνθήκες παρασκευής και ακινητοποίησης των γ-σφαιρινών ποντικού προκύπτει ότι την υψηλότερη ικανότητα ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων παρέχουν οι επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη.

Μετά την κατάρτιση των τελικών πρωτοκόλλων τροποποίησης των επιφανειών διοξειδίου/νιτριδίου του πυριτίου με APTES ή APTES/γλουταραλδεΰδη, τα πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν για την τροποποίηση ψηφίδων πυριτίου οι οποίες έφεραν υμένιο διοξειδίου του πυριτίου πάχους 1000 nm και αποτελούν την αισθητήρια επιφάνεια του οπτικού αισθητήρα WLRS. Ο αισθητήρας αυτός παρέχει την δυνατότητα παρακολούθησης βιομοριακών αντιδράσεων σε πραγματικό χρόνο χωρίς τη χρήση σημασμένων μορίων και χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αρχικά για την παρακολούθηση της αντίδρασης ακινητοποιημένων στις ψηφίδες γ-σφαιρινών ποντικού με μη σημασμένο αντίσωμα αίγας κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Χρησιμοποιήθηκε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων αντισώματος και διαπιστώθηκε ότι υπήρχε διαφορά στην απόκριση των ψηφίδων όταν η τροποποίηση με ΑΡΤΕS γίνεται με χρήση υδατικού διαλύματος σε σχέση με την απόκριση των επιφανειών που είχαν τροποποιηθεί με ΑΡΤΕS σε αιθανόλη. Συγκεκριμένα, τα σήματα που ελήφθησαν για όλη τη περιοχή συγκεντρώσεων του αντισώματος ήταν υψηλότερα για τις επιφάνειες που είχαν παρασκευαστεί με APTES σε αιθανόλη σε σχέση με αυτές που είχαν παρασκευαστεί με APTES σε αιθανόλη. Επιπλέον, και για τα δύο πρωτόκολλα τροποποίησης οι τιμές σήματος που ελήφθησαν από τις επιφάνειες APTES που

είχαν τροποποιηθεί με γλουταραλδεΰδη και στις οποίες οι γ-σφαιρίνες είχαν ακινητοποιηθεί με ομοιοπολική σύνδεση ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες επιφάνειες που δεν είχαν τροποποιηθεί με γλουταραλδεΰδη και στις οποίες οι οι γ-σφαιρίνες είχαν ακινητοποιηθεί με φυσική προσρόφηση. Μια άλλη διαφορά που παρατηρήθηκε οι αποκρίσεις των ψηφίδων που έχουν τροποποιηθεί με APTES σε νερό τείνουν να λαμβάνουν τιμές οροφής σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντισώματος σε σχέση με τις ψηφίδες που έχουν τροποποιηθεί με ΑΡΤΕS σε αιθανόλη, οι οποίες όμως παρέχουν υψηλότερα σήματα για τις μικρότερες συγκεντρώσεις αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού. Επομένως, οι επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη με ή χωρίς γλουταραλδεΰδη παρείχαν την υψηλότερη ευαισθησία ανίχνευσης του αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών ποντικού με τον αισθητήρα WLRS. Συγκεκριμένα η μικρότερη συγκέντρωση που μπορούσε να ανιχνευτεί, υπολογιζόμενη ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε σήμα ίσο με 3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος για το διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης, ήταν 0,07 μg/mL για τις επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με ΑΡΤΕS σε αιθανόλη με ή χωρίς γλουταραλδεΰδη και 0,17 μg/mL για τις επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό με ή χωρίς γλουταραλδεΰδη. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με εκείνα που ελήφθησαν από τις μετρήσεις φθορισμού για την αντίδραση γ-σφαιρινών ποντικού/αντισώματος κατά των γσφαιρινών ποντικού.

Τέλος, ψηφίδες WLRS που είχαν τροποποιηθεί με τα δύο πρωτόκολλα APTES χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για το μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοχημικό προσδιορισμό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου στην κλινική πράξη δείκτη φλεγμονής, μέσω της ακινητοποίησης ειδικού αντισώματος κατά της CRP. Ο ανοσοπροσδιορισμός περιελάμβανε ένα στάδιο αντίδρασης με πρότυπα διαλύματα CRP γνωστής συγκέντρωσης και ένα δεύτερο στάδιο αντίδρασης με ειδικό αντίσωμα κατά της CRP το οποίο ήταν ίδιο με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Διαπιστώθηκε ότι οι επιφάνειες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη και στις οποίες το αντίσωμα ακινητοποιήθηκε με φυσική προσρόφηση παρείχαν υψηλότερα σήματα για όλες τις συγκεντρώσεις CRP σε σχέση με τις ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε νερό. Επιπλέον, ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη και γλουταραλδεΰδη παρείχαν χαμηλότερες τιμές για όλη την περιοχή συγκεντρώσεων CRP. Συγκεκριμένα, η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση CRP ήταν 7,5, 8,5 και 10 ng/mL για τις επιφάνειες που παρασκευάστηκαν με APTES σε αιθανόλη, APTES σε αιθανόλη/γλουραταλδεΰδη, και APTES σε νερό, αντίστοιχα. Επομένως στην περίπτωση της ακινητοποίησης του αντισώματος κατά της CRP τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν από ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με APTES σε αιθανόλη παρά με APTES σε αιθανόλη/γλουταραλδεΰδη. Ο λόγος μπορεί να είναι ότι σε αντίθεση με τις ακινητοποιημένες γ-σφαιρίνες ποντικού όπου διαφορές στην διαμόρφωση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης δεν παίζουν τόσο σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση από το αντίσωμα, στην περίπτωση του αντισώματος της CRP μικρές διαφορές στον τρόπο πρόσδεσης στην επιφάνεια μεταξύ προσρόφησης και ομοιοπολικής σύνδεσης μπορεί να επηρεάζουν την δραστικότητα του ακινητοποιημένου αντισώματος. Σε κάθε περίπτωση, η επίδραση στην ευαισθησία του ανοσοπροσδιορισμού είναι σχετικά μικρή.

Συμπερασματικά, η μέθοδος χημικής ενεργοποίησης ψηφίδων πυριτίου η οποία συνίσταται στην κατεργασία με διάλυμα APTES 5% (o/o) σε απόλυτη αιθανόλη οδηγεί σε επιφάνειες με υψηλότερη ικανότητα ακινητοποίησης πρωτεϊνικών μορίων σε σχέση με την αντίστοιχη μέθοδο τροποποίησης με υδατικό διάλυμα APTES. Ανάλογα με το είδος του μορίου που ακινητοποιείται, η ικανότητα ακινητοποίησης αλλά και η δραστικότητα του ακινητοποιημένου μορίου μπορεί να ευνοείται αν η πρόσδεση λαμβάνει χώρα με φυσική προσρόφηση σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES ή με ομοιοπολική σύνδεση σε επιφάνειες τροποποιημένες με APTES/γλουταραλδεΰδη. Επόμενως τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναμένεται να βοηθήσουν στην βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών οπτικών αισθητήρων με μεταλλάκτες σήματος που κατασκευάζονται από διοξείδιο ή νιτρίδιο του πυριτίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

³ https://goldbook.iupac.org/html/B/B00663.html

⁴ Streyer J. (1997). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997

⁵Mascini M., Tombelli S. (2008). *Biosensors for biomarkers in medical diagnostics*. Biomarker 13, 637-657.

⁷ http://ecourse.uoi.gr/pluginfile.php/123385/mod_resource/co-

tent/1/%CE%91%CE%BA%CE%B9%CE%BD%CE%B7%CF%84%CE%BF%CF%80%CE%BF%CE%AF%CE%B7%CF%83 %CE%B7%20%28%CE%B2%CE%B9%CE%BF%29%CE%BC%CE%BF%CF%81%CE%AF%CF%89%CE%BD.pdf ⁸ Enderle J.D., Blanchard S.M., Blanchard J.D. (2005). Introduction to biomedical engineering, 2nd edition, Elsevier Academic Press.

⁹ Butt H., Graf K., Kappl M. 2003. Physics and Chemistry of Interfaces. Wiley VCH. USA.

¹⁰ Agricultural University of Athens, "Βιοαισθητήρες." http://www.aua.gr/gr/dep/bio/lab/enzym/HP18.htm.

¹¹ Mandal A., "Biosensors," 2014. http://www.newsmedical.net/health/What-are-Biosensors.aspx.

¹² "Biosensors," Nature.

¹³ Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., *Βιοχημεία*, 5^η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2013

¹⁴ Goldsby R., Osborne B., Kindt T., Kuby J., *Ανοσολογία*, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007

¹⁵ Wu A.H.B. (2006). *A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry*. Clin. Chim. Acta 369, 119-124.

¹⁶ Lequin R.M. (2005). *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Clin. Chem. 51, 2415-2418.

¹⁷ Catt K., Tregear G.W. (1967). *Solid-Phase Radioimmunoassay in Antibody-Coated Tubes*. Science 158, 1570-1572.

¹⁸ Diamandis E.P., Christopoulos T.K., *Immunoassay*, Academic Press, 1996

¹⁹ Pereira V.L., Fernandes J.O., Cunha S.C. (2014). *Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis*. Trend Food Sci. & Technol. 36, 96-136.

²⁰ Zain M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. J. Saudi Chem. Soc. 15, 129-144.

²¹ Shortliffe E.H., Cimono J.J. (2006). Biomedical Informatics: Computer Applications in Health Care and Biomedicine, Springer.

¹Clark L. Jr, Lyons C. (1962). *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. An. NY Acad. Sci. 102, 29-45.

² Clarke S.F., Foster J.R. (2012). *A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus*. British J. Biomed. Sci. 69, 83-93; Cruz A.P.D, Norena N., Kaushik A., Bhansali S. (2014). *A low-cost miniaturized potensiostat for point-ofcare diagnosis*. Biosens. Bioelectron. 62, 249-254.

⁶ Beattie K.L, Beattie W.G, Meng L., Turner S.L, Coral-Vazquez R., Smith D.D., McIntyre P.M., Daot D.D. (1995). *Advances in genosensor research*. Clin. Chem. 41, 700-706.

²² Yang M., McGovem M.E, Thompson M. (1997). *Genosensor Technology and the Detection of Interfacial Nucleic Acid Chemistry*. Anal. Chim. Acta 346, 259-275.

²³ Yen P-W, et al. (2014). A device design of an integrated CMOS poly-silicon biosensor-on-chip to enhance performance of biomolecular analytes in serum samples. Biosens. Bioelectron. 61, 112-118.

²⁴ Zhou Y., Zhang Z., Xu Z., Yin H., Ai S. (2012). *MicroRNA-21 detection based on molecular switching by amperometry*. New J. Chem. 36, 1985-1991.

²⁵ Zangheri M., et al. (2015). *A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescencebased lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection*. Biosens. Bioelectron. 64, 63-68.

²⁶ Kara P., Erdem A., Girousi S., Ozsoz M. (2005). *Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode*. J. Pharm. Biomed. Anal. 38, 191195.

²⁷ Ioannou A., Alexiadou D., Kouidou S., Girousi S., Voulgaropoulos A. (2009). *Use of Adsorptive Transfer Stripping Voltammetry for analysing variations of cytosine methylation in DNA*. Electroanalysis 21, 2685-2692.

²⁸ Rasooly A., Jacobson J. (2006). *Development of biosensors for cancer clinical testing*. Biosens. Bioelectron. 21, 1851-1858.

²⁹ Milligan C., Ghindilis A. (2002). *Laccase based sandwich scheme immunosensor employing mediatorless electrocatalysis*. Electroanalysis, 14, 415-419.

³⁰ Starodub, N.F., Dzantiev, B.B., Statorub, V.M., Zherdev, A.V. (2000). *Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion selective field-effect transistor*. Anal. Chim. Acta, 424, 37-43.

³¹ Zhang S., Wright G., Yang Y. (2000). *Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction*. Biosens. Bioelectron. 15, 273-282.

³² Zhou Y., Zhang Z., Xu Z., Yin H., Ai S. (2012). *MicroRNA-21 detection based on molecular switching by amperometry*. New J. Chem. 36, 1985-1991.

³³ Κοκκινίδης Γ.Ι. (1992). Αρχές και μέθοδοι μελέτης ηλεκτροδιακών δράσεων. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη

³⁴ Bard A.J., Faulkner L.R. (2001). Electrochemical methods; Fundamentals and applications, John Wiley & Sons INC, New York.

³⁵ I.R. Sinclair, Sensors and Transducers, Newnes 3rd edition, 2001.

³⁶ Giavazzi F., Salina M., Cerbino R., Bassi M., Prosperi D., Ceccarello E., Damin F., Sola L., Rusnati M., Chiari M., Chini B., Bellini T., Buscaglia M. (2013) *Multispot, label-free biodetection at a phantom plastic–water interface*. PNAS, 110, 9350-9355.

³⁷ Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. (2001). *Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry*.
Clin. Chim. Acta, 314, 1-25.

³⁸ Homola J. (2003). *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Anal. Bioanal. Chem. 377, 528-539.

³⁹ Lukosz, W. (1991). *Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing*. Biosens. Bioelectron. 6, 215-225.

⁴⁰ Homola J. (2003). *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Anal. Bioanal. Chem 377, 528–539.

⁴¹ Cooper M.A. (2002). Optical biosensors in drug discovery, Nature Rev. Drug Discovery 1, 515-528.

⁴² Psarouli A., Salapatas A., Botsialas A., Petrou P.S., Raptis I., Makarona E., Jobst G., Tukkiniemi K., Sopanen M., Stoffer R., Kakabakos S.E., K. Misiakos K. (2015). *Monolithically integrated broad-band Mach-Zehnder interferometers for highly sensitive label-free detection of biomolecules through dual polarization optics*. Sci. Rep. 5, 17600.

⁴³ Wiese R., Belosludtsev Y., Powdrill T., Thomson P., Hoga, M. (2001). *Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform*. Clin. Chem., 47, 1451-1457.

⁴⁴ Delehanty J.B., Ligler F.S. (2002). *A microarray immunoassay of simultaneous detections of proteins and bacteria*. Anal. Chem. 74, 5681-5687.

⁴⁵ Pagkali V., Petrou P.S., Salapatas A., Makarona E., Peters J., Haasnoot W., Jobst G., Economou A., Misiakos K., Raptis I., Kakabakos S.E. (2017). *Detection of ochratoxin A in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor*. J. Hazard. Mater. 323, 75-83.

⁴⁶ Angelopoulou M., Botsialas A., Salapatas A., Petrou P.S., Haasnoot W., Makarona E., Jobst G., Goustouridis D., Siafaka-Kapadai A., Raptis I., Misiakos K., Kakabakos S.E. (2015). *Assessment of goat milk adulteration with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor*. Anal. Bioanal. Chem. 407, 3995-4004.

⁴⁷ Kitsara M., Misiakos K., Raptis I., Makarona E. (2010). *Integrated optical frequency-resolved Mach- Zehnder interferometers for label-free affinity Sensing*. Opt. Exp. 8193, 8.

⁴⁸ Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W. (1993). *Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers*. Sensor Actuator B 11, 21-27.

⁴⁹ Gauglitz G. (2005). *Direct optical sensors: principles and selected applications*. Anal. Bioanal. Chem. 381, 141– 155.

⁵⁰ Albrecht C., Fechner P., Honcharenko D., Baltzer L., Gauglitz G. (2010). *A new assay design for clinical diagnostics based on alternative recognition elements.* Biosens. Bioelectron. 25, 2302-2308.

⁵¹ Ewald M., Le Blanc A.F., Gauglitz G., Proll G. (2013). *A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera*. Anal. Bioanal. Chem. 405, 6461–6469.

⁵² Petrou P.S., Ricklin D., Zavali M., Raptis I., Kakabakos S.E., Misiakos K., Lambris J.D. (2009). *Real-time labelfree detection of complement activation products in human serum by white light reflectance spectroscopy*. Biosens. Bioelectron. 24, 3359–3364.

⁵³ Koukouvinos G., Petrou P.S., Misiakos K., Drygiannakis D., Raptis I., Goustouridis D., Kakabakos S.E. (2015). *A label-free flow-through immunosensor for determination of total-and free-PSA in human serum samples based on white-light reflectance spectroscopy*. Sensor Actuator B 209, 1041-1048.

⁵⁴ Zavali M., Petrou P.S., Goustouridis D., Rapti I., Misiakos K., Kakabakos S.E. (2010). *A regenerable flowthrough affinity sensor for label-free detection of proteins and DNA*. J. Chrom. B 878, 237-242. ⁵⁵ Koukouvinos G., Petrou P., Misiakos K., Drygiannakis D., Raptis I., Stefanitsis G., Martini S., Nikita D., Goustouridis D., Moser I., Jobst G., Kakabakos S. (2016). *Simultaneous determination of CRP and D-dimer in human blood plasma samples with White Light Reflectance Spectroscopy*, Biosens. Bioelectron. 84, 89-96.

⁵⁶ Koukouvinos G., Tsialla Z., Petrou P.S., Misiakos K., Goustouridis D., Ucles Moreno A., Fernandez-Alba A.R., Raptis I., Kakabakos S.E. (2017). *Fast simultaneous detection of three pesticides by a White LightReflectance Spectroscopy sensing platform*. Sensor Actuator B 238, 1214-1223.

⁵⁷ Manoli K., Goustouridis D., Chatzandroulis S., Raptis I., Valamontes E.S., Merope Sanopoulou M. (2006). *Vapor sorption in thin supported polymer films studied by white light interferometry*. Polymer 47, 6117-6122.

⁵⁸ De Vos K., Bartolozzi I., Schacht E., Bienstman P., R. Baets R. (2007). *Silicon-onInsulator microring resonator for sensitive and label-free biosensing*. Opt. Exp. 15, 7610–7615.

⁵⁹ Bazaka K., Jacob M., Chrzanowski W., Ostrikov K. (2015). *Anti-bacterial surfaces: natural agents, mechanisms of action, and plasma surface modification*. R. Soc. Chemi. 5, 48739-48759.

⁶⁰ Hasan J. Crawford R., Ivanova E. (2013). *Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials*. Trend Biotechnol. 31, 295-304.

⁶¹ Beaucage S. (2001). *Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications*. Curr. Med. Chem. 8, 1213-1244.

⁶² Kwaadsteniet M., Botes M., Cloete T. (2011). *Application of Nanotechnology in antimicrobial coatings in water industry*. NANO: Brief Rep. Rev. 6, 395-407.

⁶³ Ivanova E, Russell C., 2015. Antibacterial Surfaces. Springer International Publishing, Switzerland.

⁶⁴ Butt H., Graf K., Kappl M. 2003. Physics and Chemistry of Interfaces. Wiley VCH, USA.

⁶⁵ Banuls M.-J., Puchades R., Maquieira A. (2013). *Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: A review*. Anal. Chim. Acta 777, 1-16.

⁶⁶ Bazaka K., Jacob M., Chrzanowski W., Ostrikov K. (2015). *Anti-bacterial surfaces: natural agents, mechanisms of action, and plasma surface modification*. R. Soc. Chem. 5, 48739-48759.

⁶⁷ Tsougeni K., Petrou P.S., Tserepi A., Kakabakos S.E., Gogolides E. (2009). *Nanotexturing of poly(methyl meth-acrylate) polymer using plasma*. *Processes and applications in wetting control and protein adsorption*. Microe-lectron. Eng. 86, 1424-1427.

⁶⁸ Tsougeni K., Petrou P.S., Awsiuk K., Marzec M.M., Ioannidis N., Petrouleas V., Tserepi A., Kakabakos S.E., Gogolides E. (2015). *Direct covalent biomolecule immobilization on plasma-nanotextured chemically stable substrates*. ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 14670-14681.

⁶⁹ Tsougeni K., Tserepi A., Constantoudis V., Gogolides E., Petrou P.S., Kakabakos S.E. (2010). *Plasma nanotextured PMMA surfaces for protein arrays: Increased protein binding and enhanced detection sensitivity*. Langmuir 26, 13883-1389.

⁷⁰ Soderquist M.E., Walton, A.G. (1980). *Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces*. J. Colloid Intrface Sci. 75, 386-397.

⁷¹ Dierks S.E., Butler J.E., Richerson H.B. (1986). *Altered recognition of surface-adsorbed compared to antigenbound antibodies in the ELISA*. Mol. Immunol. 23, 403-411. ⁷² Jitsukawa T., Nakajim, S., Sugawara. I., Watanabe H. (1989). *Increased coating efficiency of antigens and preservation of original antigenic structure after coating in ELISA*. J. Immunol. Methods 116, 251-257.
⁷³ Sharma B.P., Bailey L.F., Messing R.A. (1982). *Immobilized Biomaterials—Techniques and Applications*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 21, 837-854.

⁷⁴ Butler J.E., Spradling J.E., Suter M., Dierks S.E., Heyermamm H., Petermam J.H. (1986). *The immunochemistry of sandwich ELISAs—I. The binding characteristics of immunoglobulins to monoclonal and polyclonal capture antibodies adsorbed on plastic and their detection by symmetrical and asymmetrical antibody-enzyme conjugates*. Mol. Immunol., 23, 971-982.

⁷⁵ Oreskes I., Singer J.M. (1961). *The Mechanism of Particulate Carrier Reactions: I. Adsorption of Human* γ-*Globulin to Polystyrene Latex Particles*. J. Immunol. 86, 338-344.

⁷⁶ Joshi K.S., Hoffmann L.G., Butler J.E. (1992). *The immunochemistry of sandwich ELISAs—V. The capture antibody performance of polyclonal antibody-enriched fractions prepared by various methods*. Mol. Immunol. 29, 971-981.

⁷⁷ Butler J.E., Ni I., Nessler R., Joshi K.S., Suter M., Rosenberg B., Chang J., Brown W.R., Cantarero L.A. (1992).
The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. J. Immunol. Method 150, 77-90.

⁷⁸ (http://ecourse.uoi.gr/pluginfile.php/123385/mod_resource/con-

tent/1/%CE%91%CE%BA%CE%B9%CE%BD%CE%B7%CF%84%CE%BF%CF%80%CE%BF%CE%AF%CE%B7%CF%83 %CE%B7%20%28%CE%B2%CE%B9%CE%BF%29%CE%BC%CE%BF%CF%81%CE%AF%CF%89%CE%BD.pdf)

⁷⁹ Butler J.E., Ni N., Brown W.R., Joshi K.S., Chang J., Rosenberg B., Voss E.W. (1993). *The immunochemistry of sandwich elisas—VI. Greater than 90% of monoclonal and 75% of polyclonal anti-fluorescyl capture antibodies (CAbs) are denatured by passive adsorption*. Mol. Immunol. 30, 1165-1175.

⁸⁰ Tothill I.E. (2009). *Biosensors for cancer markers diagnosis*. Sem. Cell Develop. Diagn. 20, 55-62.

⁸¹ Mascini M., Palchetti I., Marrazza G., (2001). *DNA electrochemical biosensors*. Fresenius J. Anal. Chem. 369 15-22.

⁸² Palecek E. (1986). *Electrochemical behavior of biological macromolecules*. Bioelectrochem. & Bioenergetic 15, 275-295.

⁸³ Leyden, D.E. Silanes, Surfaces, and Interfaces; Gordon and Breach: New York, 1986.

⁸⁴ Plueddemann, E. W. Silane Coupling Agents; 2nd ed.; Plenum: New York, 1991.

⁸⁵ Krumpfer J.W., Gao L., Fadeev A.Y., McCarthy, T. J. In Advances in Silicon Science; Dvomic, P. R., Owen, M. J., Eds.; Springer: New York, 2012; Vol. 4, pp 95-114.

⁸⁶ Levresse P., Feke D.L., Manas-Zloczower I. (1998). *Analysis of the formation of bound poly(dimethylsiloxane) on silica*. Polymer 39, 3919-3924.

⁸⁷ Clarkson S. J., Semlyen J.A. (1986). *Studies of cyclic and linear poly(dimethyl-siloxanes): 21. High temperature thermal behavior*. Polymer 27, 91-95.

⁸⁸ Awsiuk K., Budkowski A., Psarouli A., Petrou, P., Bernasik A., Kakabakos S., Rysz J., Raptis I. (2013). *Protein adsorption and covalent bonding to silicon nitride surfaces modified with organo-silanes: Comparison using AFM, angle-resolved XPS and multivariate ToF-SIMS analysis*. Colloid Surf. B Biointerfaces 110, 217–224.
⁸⁹ Θ. Τσώλη, "Τα μικροσκόπια στο... μικροσκόπιο," Το ΒήμαScience.

⁹⁰ Κ. Φασσέας, "Οπτικά (φωτονικά) μικροσκόπια," Agricultural University of Athens. [Online]. Available: http://www.aua.gr/fasseas/optika mikroskopia.htm.

⁹¹ Πανεπιστήμιο Κρήτης, "Μικροσκοπία φθορισμού.

⁹² IUPAC, Compendium of chemical terminology - Gold book. 2014.

⁹³ University of Cyprus, "Μικροσκοπία."

⁹⁴ Χαμάκος Θ.Ν., Υπολογιστική Ανάλυση Διαβροχής Στερεών Επιφανειών από Σταγόνες, Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 2011. 25. Σάββας Α., Μελέτη της επίδρασης του μεγέθους των νανοσωματιδίων στην υπερυδροφοβικότητα σύνθετων υμενίων πολυμερών – νανοσωματιδίων, Διπλωματική Εργασία, ΑΠΘ, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, 2010.

⁹⁵ Ευσταθίου Ε., Προσρόφηση / Προσκόλληση Νέων Προσθετικών Λιπαντικών από Δωδεκάνιο σε Στερεές Επιφάνειες, Διαδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Hull Ηνωμένου Βασιλείου, Σχολή Φυσικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, 2007.

⁹⁶ Stachowiak G., Batchelor A., Engineering Tribology, Butterworth Heinemann, Australia, 2009.

⁹⁷ Göken M., Kempf M., Nix W.D. (2001). *Hardness and Modulus of the Lamellar Microstructure in PST-TiAl Studied by Nanoindentations and AFM*. Acta Mater. 49, 903-911.

⁹⁸ Materials Characterization Techniques, Sam Zhang, Lin Li, Ashok Kumar (2008) CRC Press.

⁹⁹ http://www.ld-didactic.de/phk/a.asp?a=554801&L=2

¹⁰⁰ Braun R.M., Blenkinsopp P., Mullock S.J., Corlett C., Willey K.F., Vickerman J.C., Winograd N. (1998). *Performance characteristics on chemical imaging time-of-flight mass spectrometer*. Rapid Commun. Mass Spec. 12, 1246-1252.

¹⁰¹ Chatzitheodoridis E., Kiriakidis G., Lyon L. (2002), Chapter 13: "Secondary ion mass spectrometry and its application to thin film characterization" in Handbook of Thin Film Materials, volume 2: Characterisation at Spectroscopy of thin Films, HS. Nalwa (editor), pp. 637-683. Academic Press 2002.

¹⁰² Stephan T. (2001). TOF-SIMS in cosmoschemistry: Planet. Space Sci. 49, 859-906.