



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΣΕΜΦΕ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάπτυξη Βιο-αισθητήρων για Ανάλυση Τροφίμων
με χρήση Λείζερ**

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Μικροσυστήματα & Νανοδιατάξεις»

Ευθύμιος Δ. Σερπετζόγλου

Επιβλέπουσες Καθηγήτριες

Μαρία Μασαούτη, Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια ΕΜΠ

Ιωάννα Ζεργιώτη, Αν. Καθηγήτρια ΕΜΠ

Εξεταστική Επιτροπή

Ι. Ράπτης, Αν. Καθηγητής
Δ. Τσουκαλάς, Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014



Στους Γονείς μου,



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π κα. Ιωάννα Ζεργιώτη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, για τη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Μαρία Μασαούτη, για την βοήθεια που μου προσέφερε, τις οδηγίες που μου παρείχε καθώς και το χρόνο που διέθεσε για να μου λύσει οποιαδήποτε απορία.

Ιδιαίτερη αναφορά οφείλω να κάνω στην Μαριανέζα Χατζηπέτρου με την οποία συνεργάστηκα στα πειράματα της διπλωματικής μου, για την βοήθεια που μου παρείχε καθώς και για την ενθάρρυνση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Τσέκενη και τη Δρ. Μαρία Πατίτσα για τη συνεργασία που είχαμε και για τις χρήσιμες σ' εμένα γνώσεις τους ώστε να καταλάβω όσο το δυνατόν καλύτερα τους μηχανισμούς που διέπουν τον τομέα της Βιολογίας.

Τέλος, δεν πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα άτομα με τα οποία συνεργάστηκα και ήταν δίπλα μου όποτε τα χρειάστηκα, Φιλήμονα Ζαχαράτο, Γιάννη Θεοδωράκο, Μαρίνα Μακρύγιαννη, Σίμο Παπάζογλου και τον φίλο και συμφοιτητή Σταύρο Σαμοθρακίτη.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	4
1 Εισαγωγή	6
2 Βιο-αισθητήρες.....	9
2.1 Βιο-υποδοχείς.....	11
2.2 Μορφο-μετατροπέας.....	12
2.3 Τεχνικές Άμεσης Εκτύπωσης.....	14
2.3.1 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία σταγονιδίων.....	14
2.3.2 Μέθοδος εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης.....	15
2.3.3 Μέθοδος ψεκασμού αεροζόλ.....	16
2.3.4 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία αντλίας.....	17
2.3.5 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία ακίδας.....	18
2.3.6 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία λέιζερ.....	19
2.3.6.1 Μέθοδοι Άμεσης Εκτύπωσης FGDW και LGDW.....	20
2.3.6.2 Τεχνική Απευθείας Μικρο-εναπόθεσης με Λέιζερ.....	21
2.4 Η Τεχνική LIFT στην Ανάπτυξη Βιο-αισθητήρων.....	21
3 Τεχνική Laser Induced Forward Transfer (LIFT).....	23
3.1 Πειραματική Διαδικασία - LIFT.....	25
4 Ανάπτυξη Βιο-αισθητήρα με την Τεχνική LIFT για Τρόφιμα.....	30
4.1 Απταμερή: οι Βιο-υποδοχείς του ανιχνευτή.....	31
4.2 LIFT - Πειραματική Διάταξη.....	33
4.2.1 Λέιζερ.....	34
4.2.2 Σύστημα Τηλεσκοπικών Φακών.....	36
4.2.3 Επίπεδα Κάτοπτρα.....	36
4.2.4 Imaging Plane.....	36



4.2.5	Βάσεις Στήριξης Υποστρώματος Δότη και Αποδέκτη	36
4.2.6	Οπτικό Μικροσκόπιο	37
4.2.7	Μοτέρ και Η/Υ	37
4.3	Μετρήσεις - Αποτελέσματα	38
4.3.1	LTO/SiO ₂ Επιφάνειες	38
4.3.2	Εναπόθεση των aptamers με πιπέτα	39
4.3.3	Εναπόθεση aptamers με την τεχνική Laser LIFT.	41
4.3.4	Ανίχνευση της τοξίνης OTA και regeneration του βιο-αισθητήρα.....	46
4.4	Συμπεράσματα – Μελλοντικοί Στόχοι.....	53
4.5	Πατέντες.....	54
	Αναφορές.....	61

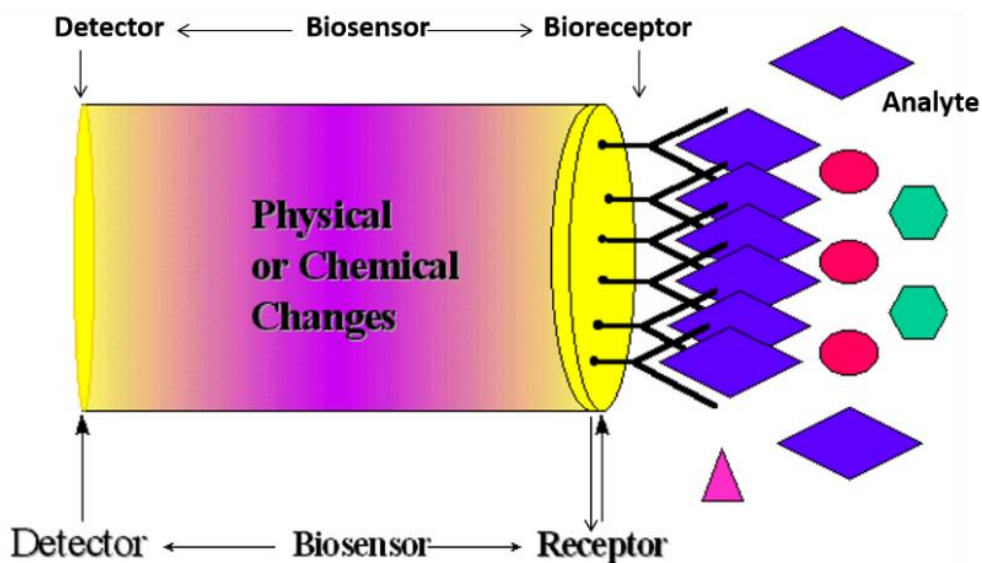
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις” το ακαδημαϊκό έτος 2013 – 2014. Η τριμελής εξεταστική επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας απαρτίζεται από τα ακόλουθα μέλη ΔΕΠ: την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. Ιωάννα Ζεργιώτη (επιβλέπουσα), τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ε.Μ.Π. Ιωάννη Ράπτη και τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. Δημήτριο Τσουκαλά.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η ανάπτυξη οπτικών βιο-αισθητήρων για την ανίχνευση τοξινών σε τρόφιμα, όπως ξηρούς καρπούς. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της ερευνητικής δραστηριότητας της ομάδας Λέιζερ του τομέα Φυσικής, η οποία και πραγματοποιείται στα πλαίσια του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος BIOFOS.

Οι βιο-αισθητήρες είναι ολοκληρωμένες διατάξεις οι οποίες αναπτύχθηκαν με στόχο την άμεση ανίχνευση διάφορων αναλυτών όπως βιο-μορίων, τοξινών, βαρέων μετάλλων, περιβαλλοντολογικών παραγόντων (υγρασία) κτλ. και παρουσιάζουν συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον. Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στην ανίχνευση της αντίδρασης του αναλύτη από έναν βιο-υποδοχέα και την μετατροπή του αποτελέσματος της αντίδρασης σ’ ένα μετρήσιμο μέγεθος, όπως αλλαγή στο ρεύμα εξόδου, στην χωρητικότητα του μέσου, αλλαγή του οπτικού σήματος (π.χ. φθορισμού), κτλ.

Τα βασικά τμήματα ενός βιο-αισθητήρα είναι οι *βιο-υποδοχείς*, το *υπόστρωμα*, και ο *ανιχνευτής*. Οι βιο-υποδοχείς προσδένονται πάνω στην επιφάνεια του βιο-αισθητήρα και είναι υπεύθυνοι για την ανίχνευση του αναλύτη ενώ στο υπόστρωμα-επιφάνεια στην οποία προσδένονται είναι η περιοχή στην οποία γίνονται οι φυσικές ή οι χημικές μεταβολές οι οποίες και καταγράφονται με την βοήθεια του ανιχνευτή. Ένα τυπικό παράδειγμα βιο-αισθητήρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.1.

Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση βιο-αισθητήρα¹

Η μεταφορά βιο-υλικών όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και ολιγονουκλεοτίδια έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη βιο-αισθητήρων. Ως υποστρώματα για την εναπόθεση των βιο-υλικών χρησιμοποιούνται διάφορες επιφάνειες (π.χ. οξείδιο του πυριτίου, νιτρίδιο του πυριτίου, αλκένια), οι οποίες τροποποιούνται χημικά ή όχι.

Στη παρούσα διπλωματική σαν υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένες επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) με σιλάνιο (GOPTS). Το σιλάνιο (GOPTS - 3-glycidoxypyrpyltrimethoxysilane), έχει την ικανότητα να προσδένεται μέσω της διαδικασίας της υδρόλυσης με τα ελεύθερα υδροξείλια του πυριτίου. Σε συγκεκριμένη θερμοκρασία το σιλάνιο πολυμερίζεται πριν προσδεθεί στην επιφάνεια του SiO_2 . Έτσι είναι εφικτή η πρόσδεση βιο-μορίων τροποποιημένων με ελεύθερες ρίζες από θειόλες, αμίνες και υδροξυλικές ομάδες στην τροποποιημένη επιφάνεια ανάλογα με το pH του διαλύματος. Η ακινητοποίηση των βιο-υλικών (απταμερών) στις τροποποιημένες επιφάνειες πραγματοποιήθηκε με χρήση της τεχνικής Laser Induced Forward Transfer (LIFT).

Η επιλογή των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν για την τροποποίηση των επιφανειών έγινε σε συνδυασμό με βιβλιογραφικές μελέτες και πειράματα στα οποία μελετήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης των απταμερών πάνω στις τροποποιημένες επιφάνειες. Τα πειράματα εναπόθεσης σε επίπεδες επιφάνειες



έγιναν με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών εναπόθεσης και ακινητοποίησης απταμερών με απώτερο στόχο την επιλεκτική ανίχνευση τοξινών που συναντώνται συχνά σε τρόφιμα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η εναπόθεση και ακινητοποίηση συγκεκριμένης αλυσίδας απταμερών η οποία έχει την δυνατότητα να προσδένεται επιλεκτικά με την τοξίνη Ochratoxin A (OTA) η οποία συναντάτε συχνά ως επιβλαβής χημική πρόσμειξη σε δείγματα ξηρών καρπών.

Βάση της ποιότητας των εναποτιθέμενων μικροσυστοιχιών βιο-υλικών αναδείχτηκε η δυνατότητα χρήσης του laser για εναπόθεση και ακινητοποίηση βιολογικών διαλυμάτων στις επιφάνειες. Η χρήση του λέιζερ εξασφάλισε την εναπόθεση των βιολογικών υλικών, τα οποία παρέμειναν βιο-ενεργά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εναπόθεσης.

2 ΒΙΟ-ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Η χρήση των βιο-αισθητήρων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια εξαιτίας του γεγονότος της ανάγκης ανίχνευσης ουσιών όπως τοξίνες, βαρέα μέταλλα, αντιβιοτικά και μυκοτοξίνες σε φαγητά, στο περιβάλλον και σε κλινικές μελέτες.

Οι βιο-αισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικές συνιστώσες: τον **βιο-υποδοχέα** (bio-receptor) και τον **μορφο-μετατροπέα** (transducer). Ο βιο-υποδοχέας είναι κατάλληλο βιολογικό μόριο το οποίο μπορεί να αλληλεπιδράσει επιλεκτικά και στοχευμένα με ένα συγκεκριμένο αναλύτη. Ο μορφο-μετατροπέας μετατρέπει το γεγονός της πρόσδεσης-αλληλεπίδρασης του βιο-υποδοχέα με τον αναλύτη σε μετρήσιμο σήμα (ηλεκτρικό, οπτικό, μηχανικό, κ.ά.). Τις δύο συνιστώσες συμπληρώνει ένας επεξεργαστής του μετρούμενου σήματος για την εξαγωγή συμπερασμάτων και την επικοινωνία ή/και παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

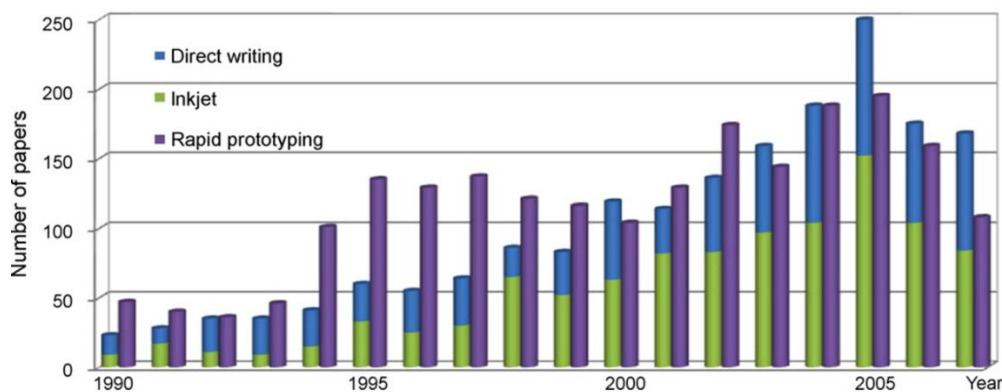
Ένας σημαντικός παράγοντας για τη υλοποίηση και τη λειτουργία ενός βιο-αισθητήρα είναι η ακινητοποίηση των βιολογικών μορίων, που συνιστούν τον βιο-υποδοχέα, πάνω στην επιφάνεια (πεδίο δράσης) του μορφο-μετατροπέα. Η ακινητοποίηση μπορεί να επιτευχθεί είτε με φυσική προσρόφηση (adsorption) ή με χημική προσκόλληση (chemical adhesion) των μορίων πάνω στην επιφάνεια.

Βασικό πλεονέκτημα των βιο-αισθητήρων είναι η δυνατότητα ενσωμάτωσης των δύο βασικών συνιστωσών σε ένα κοινό αισθητήρα (Εικόνα 2.1). Ο συνδυασμός επιτρέπει την στοχευμένη ανίχνευση και τη μέτρηση ενός εκάστοτε αναλύτη, χωρίς τη χρήση αντιδραστηρίων. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση γλυκόζης σε δείγμα αίματος, μπορεί να μετρηθεί άμεσα τοποθετώντας έναν βιο-αισθητήρα μέσα στο δείγμα ο οποίος είναι κατάλληλα φτιαγμένος ώστε να ανιχνεύει είτε την εξοκινάση, είτε την οξειδάση της γλυκόζης, είτε την γλυκόζη-1-αφοδρογονάση. Το μετρούμενο μέγεθος του συγκεκριμένου βιο-αισθητήρα μπορεί να είναι αμπερομετρικό ή και χημικό. Η διαδικασία αυτή βρίσκεται σε αντίθεση με αντίστοιχες συμβατικές εργαστηριακές διαδικασίες οι οποίες απαιτούν πολλαπλά στάδια και τη χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων σε κάθε ένα από αυτά.



Εικόνα 2.1: Διαμόρφωση ενός βιο-αισθητήρα από τις βασικές του συνιστώσες¹

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η ανάγκη της μείωσης των διαστάσεων των βιο-αισθητήρων οι οποίοι ταυτόχρονα είναι πολύ-λειτουργικοί, αξιόπιστοι και ακριβείς στις μετρήσεις τους. Οι απαιτήσεις αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη τεχνικών, με τις οποίες μπορεί να γίνει εναπόθεση υλικών μεγάλου εύρους σε διαφορετικούς τύπους επιφανειών. Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τέτοιου είδους τεχνικές αποτυπώνεται στο παρακάτω ιστόγραμμα (Εικόνα 2.2), όπου παρουσιάζεται ο αριθμός των δημοσιεύσεων από το 1990 έως το 2007, οι οποίες σχετίζονται με τεχνικές άμεσης τύπωσης/μεταφοράς (direct writing techniques). Η αύξηση αυτή ουσιαστικά υποδηλώνει και την αντίστοιχη αύξηση του ενδιαφέροντος των επιστημόνων το οποίο συνοδεύεται από τη βαθμιαία αύξηση της χρήσης αυτών των τεχνικών για τις εναποθέσεις υλικών για βιοαισθητήρες, τρανζίστορ, οργανικά φωτοβολταϊκά, κ.α.



Εικόνα 2.2: Δημοσιεύσεις, στις οποίες περιέχονται οι όροι “direct writing”, “inkjet” και “rapid prototyping” στον τίτλο τους, σύμφωνα με το ISI Compendex database.



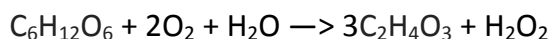
2.1 ΒΙΟ-ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.

Το πρώτο στάδιο για την ανάπτυξη των βιο-αισθητήρων είναι, η αναγνώριση και στοχευμένη ανίχνευση του υπό εξέταση αναλύτη η οποία επιτυγχάνεται με την χρήση κατάλληλων βιο-υποδοχέων όπως ένζυμα, αντισώματα και νουκλεϊκά οξέα. Μία από τις κύριες παραμέτρους που καθορίζουν την ευαισθησία και επιλεκτικότητα ενός βιο-αισθητήρα είναι ουσιαστικά η επιλεκτικότητα και εκλεκτικότητα του βιο-υποδοχέα που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των εκάστοτε αναλυτών. Τα ένζυμα αποτελούν το συνηθέστερο τύπο βιο-υποδοχέα στις εφαρμογές βιο-αισθητήρων. Τα τελευταία χρόνια όμως έχει παρατηρηθεί αυξανόμενο ενδιαφέρον στην χρήση αντισωμάτων και πρωτεϊνών ως βιο-υποδοχείς λόγω των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα:

- **Ένζυμα:** Ένα ένζυμο διαθέτει τρισδιάστατη δομή η οποία ενσωματώνει μόνο ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα. Ένα ένζυμο έχει προέλθει από μια πρωτεΐνη η οποία έχει συντεθεί στο κύτταρο από αμινοξέα με βάση την κωδικοποίηση του DNA. Τα ένζυμα δρουν ως καταλύτες βιοχημικών αντιδράσεων οι οποίες πραγματοποιούνται στο κύτταρο, τα αποτελέσματα των οποίων ανιχνεύονται από τον μορφομετατροπέα. Για να διατηρηθεί υψηλή η δραστηριότητα των ενζύμων, η θερμοκρασία και το pH του περιβάλλοντος πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλα επίπεδα.
- **Αντισώματα:** Τα απλούστερα αντισώματα περιγράφονται συνήθως ως μόρια με δύο όμοια σημεία στα οποία μπορούν να προσκολληθούν αντιγόνα. Σε αντίθεση με τα ένζυμα τα οποία δρουν ως καταλύτες, τα αντισώματα προσελκύουν αντιγόνα αφαιρώντας τα από το βιολογικό σύστημα.
- **Πρωτεΐνες:** Οι πρωτεΐνες – βιο-υποδοχείς είναι πρωτεϊνικά μόρια τα οποία αναπτύσσουν δυνάμεις συνάφειας με ορμόνες, αντισώματα, ένζυμα και άλλα βιολογικά ενεργά στοιχεία τα οποία δρουν ως βιο-υποδοχείς.
- **Άλλοι βιο-υποδοχείς:** Στην θεωρία, οποιοδήποτε βιο-μόριο το οποίο διαθέτει την δυνατότητα αναγνώρισης του αναλύτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βιο-υποδοχέας. Στην πράξη, ολόκληρα κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό.

2.2 ΜΟΡΦΟ-ΜΕΤΑΤΡΟΠΕΑΣ.

Ο μορφο-μετατροπέας είναι το κομμάτι του βιο-αισθητήρα, στο οποίο πραγματοποιείται η μετατροπή του γεγονότος της πρόσδεσης-αλληλεπίδρασης του βιο-υποδοχέα με τον αναλύτη σε ένα μετρήσιμο σήμα. Τυπικά, αυτό επιτυγχάνεται μετρώντας την μεταβολή ενός χαρακτηριστικού μεγέθους, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση του βιο-υποδοχέα με τον αναλύτη. Για παράδειγμα, στους βιο-αισθητήρες μέτρησης γλυκόζης ως βιο-υποδοχέας χρησιμοποιείται το ένζυμο της γλυκοζοξειδάσης, το οποίο ουσιαστικά καταλύει την αντίδραση της γλυκόζης και του οξυγόνου.



Στην περίπτωση αυτή λοιπόν, η συγκέντρωση του αναλύτη (δηλαδή της γλυκόζης) μπορεί να προσδιοριστεί από την:

- Μέτρηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου
- Μέτρηση της οξύτητας των προϊόντων της αντίδρασης - Μέτρηση του pH
- Μέτρηση της συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου (ή άλλων προϊόντων της αντίδρασης).

Για όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, οι αντίστοιχοι μορφο-μετατροπείς μετατρέπουν τις σχετικές συγκεντρώσεις σε ηλεκτρικά σήματα (ρεύμα ή τάση). Παρακάτω ακολουθεί μια σύντομη αναφορά στους συνηθέστερους τύπους μορφο-μετατροπέων ανεξάρτητα από τη κατηγορία στην οποία αυτοί ανήκουν.

- **Αμπερομετρικοί:** Η αμπερομέτρηση εκμεταλλεύεται την παραγωγή υπεροξειδίων του υδρογόνου (H_2O_2) ή διοξειδίων του οξυγόνου κατά την βιολογική αντίδραση του βιο-υποδοχέα με τον αναλύτη. Τα προϊόντα αυτά είναι δυνατόν να μετρηθούν με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων εφαρμόζοντας κατάλληλη τάση στο ένα ηλεκτρόδιο, σε σχέση με την τάση αναφοράς στο άλλο ηλεκτρόδιο. Τότε τα προσδιοριζόμενα στοιχεία (H_2O_2 ή O_2) απωθούνται από το ηλεκτρόδιο γεγονός το οποίο παράγει ροή ηλεκτρικού ρεύματος.
- **Ποτενσιομετρικοί:** Κατά την ποτενσιομέτρηση, χρησιμοποιείται μια μεμβράνη ως ηλεκτρόδιο της οποίας μετράται το ηλεκτρικό δυναμικό. Η διαφορά δυναμικού



προκύπτει από την διαφορά στη συγκέντρωση θετικά φορτισμένων ιόντων (π.χ. H^+) κατά μήκος της μεμβράνης.

- **Αγωγιμομετρικοί:** Σε αυτή την περίπτωση, ο καθορισμός του ρυθμού της βιολογικής αντίδρασης πραγματοποιείται μετρώντας τις διαφοροποιήσεις στην αγωγιμότητα η οποία προκαλείται από τη μετακίνηση ιόντων. Πολλές βιολογικές αντιδράσεις στις οποίες χρησιμοποιείται ένζυμο ως βιο-υποδοχέας, καταλήγουν στην διαφοροποίηση της συνολικής συγκέντρωσης ιόντων.
- **Χωρητικοί:** Σε ορισμένες περιπτώσεις, η βιολογική αντίδραση αναγνώρισης προκαλεί μεταβολές στη διηλεκτρική σταθερά του μέσου στην περιοχή του βιο-υποδοχέα. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο μορφο-μετατροπέας ουσιαστικά μετράει τις όποιες αλλαγές της χωρητικότητας του μέσου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αντίδραση μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων.
- **Φωτομετρικοί:** Στη φωτομέτρηση μετράται το φως το οποίο εκπέμπεται από φθορίζοντα μόρια με τα οποία είναι προσδεμένα ένα εκ των αντιδραστηρίων ή των προϊόντων της βιολογικής αντίδρασης. Για την ανίχνευση του εκπεμπόμενου φθορισμού χρησιμοποιούνται είτε οπτικές ίνες, είτε με απευθείας ακτινοβολήση του δείγματος και ανίχνευση των σήματος με την βοήθεια κάμερας.
- **Πιεζοηλεκτρικοί:** Οι πιεζοηλεκτρικές συσκευές και οι συσκευές ακουστικών συχνοτήτων αξιοποιούν τις ιδιότητες των πιεζοηλεκτρικών κρυστάλλων. επιφάνειες οι οποίες είναι ευαίσθητες στις αλλαγές της μάζας που βρίσκεται στην επιφάνειά τους. Αυτού του τύπου οι μορφο-μετατροπείς αξιοποιούνται σε βιολογικές αντιδράσεις αναγνώρισης οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της μάζας των βιο-υποδοχέων ως αποτέλεσμα την προσκόλληση ή αποκόλληση του αναλύτη. Στους πιεζοηλεκτρικούς κρυστάλλους καταγράφεται είτε το πεδίο που αναπτύσσεται λόγω της ελαστικής τους παραμόρφωσης, είτε η μεταβολή στη συχνότητα ταλάντωσής τους, λόγω της εναπόθεσης επιπλέον μάζας στην επιφάνειά τους.
-

- **Θερμοκρασιακοί:** Όλες οι χημικές αντιδράσεις συνοδεύονται από απορρόφηση (ενδόθερμες αντιδράσεις) ή έκλυση θερμότητας (εξώθερμες αντιδράσεις). Επομένως είναι δυνατό να μετρηθούν μεταβολές στη θερμοκρασία και να συσχετιστούν με την βιολογική αντίδραση αναγνώρισης μεταξύ του βιο-υποδοχέα και του αναλύτη.

2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΆΜΕΣΗΣ ΕΚΤΥΠΩΣΗΣ.

Ένα από τα θεμελιώδη βήματα που απαιτούνται για την ολοκλήρωση και δημιουργία ενός βιο-αισθητήρα είναι η εναπόθεση και ακινητοποίηση των βιο-υποδοχέων στο αντίστοιχο υπόστρωμα. Η εναπόθεση των βιο-μορίων στις επιφάνειες με χρήση τεχνικών άμεσης εκτύπωσης (direct write) διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα όπως π.χ. άμεση χρήση/εφαρμογή του βιο-αισθητήρα, μικρές ποσότητες υλικού, χαμηλό κόστος.

Ο επικρατέστερος ορισμός για τις τεχνικές άμεσης εκτύπωσης είναι η δυνατότητα εναπόθεσης, σε ηλεκτρονικές διατάξεις και σε λειτουργικά ή δομικά μοτίβα, διαφόρων ειδών υλικών από όπου προκύπτει άμεσα μία προκαθορισμένη διάταξη χωρίς τη χρήση μασκών ή επακόλουθων μεθόδων εγχάραξης.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι άμεσης εκτύπωσης. Οι πιο σημαντικές από αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: (1) άμεση εκτύπωση με τεχνολογία σταγονιδίων, (2) με τεχνολογία αντλίας, (3) με τεχνολογία ακίδας, και (4) με τεχνολογία λέιζερ.

Στις παραγράφους που ακολουθούν δίδεται μία σύντομη περιγραφή για τις πιο σημαντικές από τις τεχνικές άμεσης εκτύπωσης που εφαρμόζονται για την μεταφορά /εκτύπωση βιο-υποδοχέων στους αντίστοιχους μορφο-μεταφορείς.

2.3.1 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία σταγονιδίων.

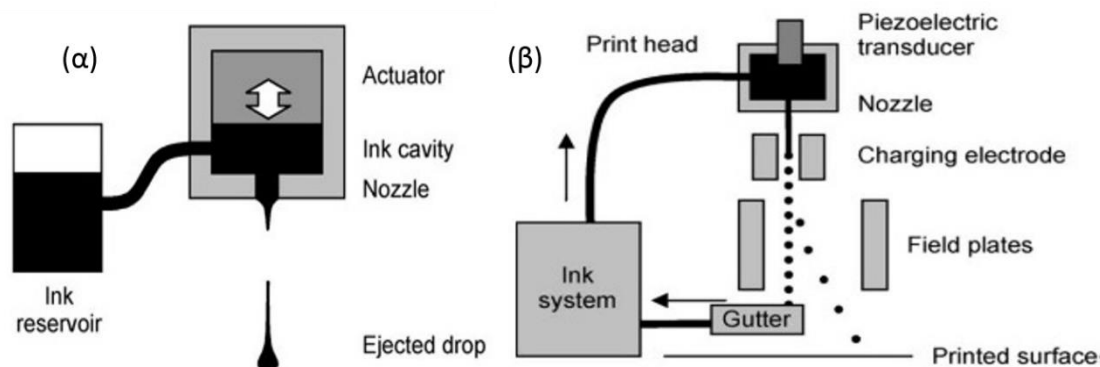
Οι μέθοδοι άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία σταγονιδίων βασίζονται στην εκτίναξη σταγονιδίων ενός υγρού υλικού από ένα ή περισσότερα ακροφύσια. Οι κύριες υποκατηγορίες των μεθόδων με τεχνολογία σταγονιδίων είναι η τεχνική εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης (ink jet printing) και η τεχνική ψεκασμού αεροζόλ (Aerosol Jet).

Σε αυτές τις τεχνικές το προς εκτίναξη υλικό πρέπει να είναι σε υγρή φάση και σε θερμοκρασίες συμβατές με το διαθέσιμο εξοπλισμό.

2.3.2 Μέθοδος εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης.

Η τεχνική αυτή έχει δείξει την αξιοσημείωτη ισχύ της σε εκτυπώσεις τόσο οικιακές όσο και προσωπικών υπολογιστών γραφείου, και έχει αξιοποιηθεί εκτενώς σε βιομηχανικές και εμπορικές εφαρμογές.²

Υπάρχουν δύο τύποι εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης, ο συνεχής (continuous ink jet – CIJ) και ο βηματικός (drop on demand – DOD). Για τα συστήματα βηματικού τύπου, υπάρχουν δύο μέθοδοι ενεργοποίησης της εκτύπωσης, για χρήση σε εμπορικούς εκτυπωτές ψεκασμού μελάνης, τα ακροφύσια θερμικών θαλάμων και τα ακροφύσια πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου.



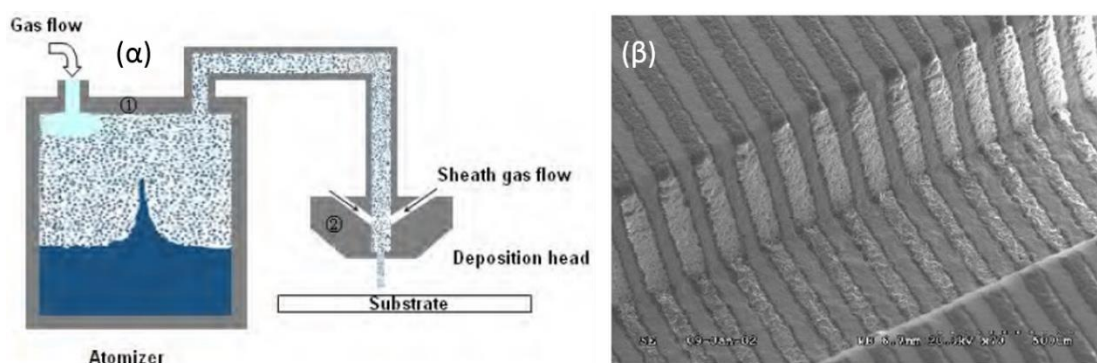
Εικόνα 2.3: (α) Σχηματική αναπαράσταση της εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης με ακροφύσια θερμικού θαλάμου (β) και πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου.³

Και οι δύο τύποι συστήματος είναι διαθέσιμοι από μία ποικιλία προμηθευτών είτε ως κεφαλές εκτύπωσης είτε ως ένα εξ ολοκλήρου σύστημα εκτύπωσης. Υπάρχουν αρκετά σύνολα κεφαλών εκτύπωσης προς επιλογή, ανάλογα με τις ειδικές απαιτήσεις της εκάστοτε εφαρμογής. Η διάμετρος του στομίου του ακροφύσιου ελέγχει τον όγκο των σταγονιδίων και συνεπώς μπορεί να επιτευχθεί η βέλτιστη διακριτική ικανότητα της εκτύπωσης. Η διακριτική ικανότητα εξαρτάται επίσης από διάφορους άλλους παράγοντες, όπως η διαβρεξιμότητα της “μελάνης” πάνω στο υπόστρωμα και η ταχύτητα στεγνώματος της μελάνης. Για συστήματα συνεχούς τύπου εκτύπωσης, το

μέγεθος των σταγονιδίων ποικίλει από 10 μm σε 150 μm , με τα 120 μm να αποτελούν το πιο σύνηθες μέγεθος εκτύπωσης, ενώ για συστήματα βηματικού τύπου εκτύπωσης, η επιτεύξιμη διάμετρος των σταγονιδίων κυμαίνεται από 15 σε 100 μm .⁴

2.3.3 Μέθοδος ψεκασμού αεροζόλ.

Η τεχνική ψεκασμού αεροζόλ είναι κατοχυρωμένο προϊόν της Optomec®. Το σύστημα ψεκασμού αεροζόλ αποτελείται κυρίως από δύο βασικά στοιχεία, τον ψεκαστήρα (1) και την κεφαλή εναπόθεσης (2), όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.4.



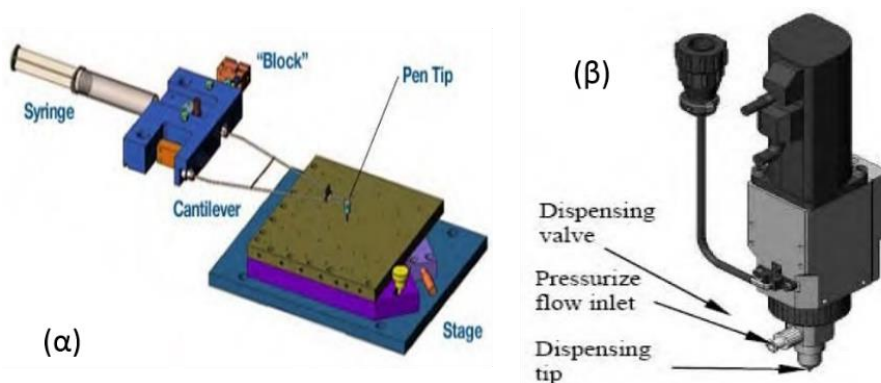
Εικόνα 2.4: (α) Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας του συστήματος ψεκασμού αεροζόλ της Optomec® και (β) γραμμές αργύρου πάχους 60 μm εκτυπωμένες πάνω σε ένα χαράκωμα βάθους 500 μm με το σύστημα ψεκασμού αεροζόλ.⁵

Το προς εναπόθεση ακατέργαστο υλικό πρέπει να είναι σε υγρή μορφή και τοποθετείται πρώτα μέσα σε ένα ψεκαστήρα, ο οποίος χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει από το υλικό ένα πυκνό ατμό σταγονιδίων (αεροζόλ) μεγέθους μεταξύ 1 μm με 5 μm . Κατόπιν, ο ατμός μεταφέρεται σε έναν ερμητικά εγκλεισμένο πίδακα, μέσω μίας ροής αερίου η οποία διατρέχει το εσωτερικό του ψεκαστήρα και στη συνέχεια μεταβιβάζεται εντός της κεφαλής εναπόθεσης. Η ροή αεροζόλ που μεταφέρθηκε στην κεφαλή εστιάζεται με τη σειρά της από μία δεύτερη ροή αερίου που εισάγεται εντός του πίδακα. Αυτές οι δύο ροές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν μία ομοαξονική δακτυλιοειδή ροή η οποία διαφεύγει από την κεφαλή εναπόθεσης μέσω ενός ακροφυσίου που διαθέτει και καταλήγει στο υπόστρωμα.⁶

Η διαδικασία εκτύπωσης της τεχνικής του συστήματος ψεκασμού αεροζόλ παρέχει ένα μέσο εκτύπωσης μη επαφής, όπως η εκτύπωση ψεκασμού μελάνης, χαρακτηριστικό που την καθιστά συμβατική με μεθόδους όπου πρέπει να αποφεύγεται η μόλυνση του υποστρώματος.

2.3.4 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία αντλίας

Η τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία αντλίας (filament based direct writing – FBDW) απαιτεί ένα προς εναπόθεση υγρό υλικό, ωστόσο διαφέρει από τις μεθόδους άμεσης εκτύπωσης ψεκασμού μελάνης στο ότι το υλικό ρέει συνεχόμενα αντί να εκτινάσσεται ως σταγονίδια. Επιπλέον το ιξώδες του υγρού υλικού ενδέχεται να διαφέρει κατά ένα πολύ μεγαλύτερο εύρος. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις της κατηγορίας είναι οι τεχνικές MicroPen⁷ και nScrypt⁸.



Εικόνα 2.5: (α) Αναπαράσταση του συστήματος MicroPen και (β) Η Smart Pump™ του nScrypt.

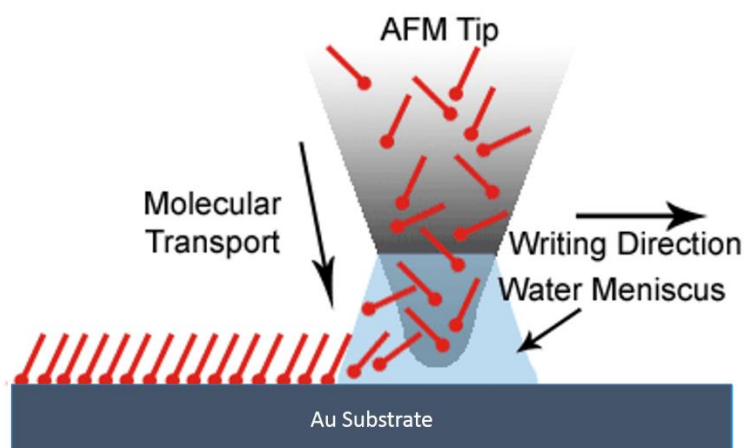
Η αρχή λειτουργίας του MicroPen μπορεί να περιγραφεί ως ακολούθως: το προς εναπόθεση υλικό τοποθετείται αρχικά μέσα σε μία σύριγγα. Στη συνέχεια το υλικό πιέζεται έξω από τη σύριγγα μέσα στην κεφαλή γραφής συμπιέζοντας το έμβολο της σύριγγας. Το υλικό, εν συνεχεία συμπιέζεται και ύστερα ρέει μέσα σε μία μικροτριχοειδή ακίδα γραφής, η οποία εναποθέτει το υλικό πάνω στο υπόστρωμα. Μία σχηματική αναπαράσταση του συστήματος γραφής MicroPen παρουσιάζεται στην **Error! Reference source not found.**(α). Το MicroPen επιπλέον διαθέτει τη δυνατότητα να πραγματοποιήσει την εναπόθεση των υλικών πάνω σε μία ποικιλία

υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων εύκαμπτων και μη επίπεδων υποστρωμάτων. Τέλος, το MicroPen είναι και αυτό με τη σειρά του μία τεχνική τεχνολογίας μη επαφής, καθώς η μικροτριχοειδή ακίδα γραφής δεν ακουμπά την επιφάνεια.

Άλλη μία τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία αντλίας είναι το nScrypt, όπου ένα εργαλείο εναπόθεσης για άμεση εκτύπωση είναι ενσωματωμένο με την καινοτόμα αντλία του nScrypt, τη λεγόμενη Smart Pump™, η οποία παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.5(β). Ένα πλεονέκτημα της “έξυπνης αντλίας” είναι ότι διαθέτει ένα μηχανισμό κίνησης με αναρρόφηση των υλικών προς τα πίσω μέσα στο ακροφύσιο εναπόθεσης μόλις αυτή διακοπεί.

2.3.5 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία ακίδας

Η τεχνική νανολιθογραφίας με πένα εμβαπτίσματος⁹ (dip-pen nanolithography – DPN) χρησιμοποιεί μία ακίδα μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (atomic force microscope – AFM) για να μεταφέρει μόρια από την ακίδα εναπόθεσης AFM πάνω σε υποστρώματα, κάτι το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε εφαρμογές της νανοκλίμακας.



Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου DPN.

Στην ίδια κατηγορία ανήκει και η θερμική νανολιθογραφία με πένα εμβάπτισης¹⁰ (thermal dip-pen nanolithography – tDPN) η οποία είναι μία τροποποιημένη εκδοχή της προηγούμενης τεχνικής. Στην θερμική νανολιθογραφία χρησιμοποιείται μία

ακίδα μικροσκοπίου ατομικής δύναμης συμβατή με τη θερμοκρασία. Η μύτη της πένας επικαλύπτεται αρχικά με το προς εναπόθεση υλικό υπό στερεή μορφή. Μόλις θερμανθεί, το υλικό με το οποίο έχει επικαλυφθεί η πένα θα λιώσει λόγω μεταφοράς της θερμότητας και θα ρεύσει από την επιφάνεια του άκρου της πένας προς το υπόστρωμα.

Μία ακόμη τεχνική είναι η λιθογραφία με πένα από πολυμερές¹¹ (polymer pen lithography), μία τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία ακίδας που χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος και πρόκειται για μία ακόμα παραλλαγή της νανολιθογραφίας με πένα εμβαπτίσματος. Για την ακρίβεια, δεν χρησιμοποιεί μία ακίδα AFM για να εναποθέσει τα υλικά, αλλά αντιθέτως μία ακίδα από πολυμερές. Αυτό την χαρακτηρίζει ως τεχνική υψηλής απόδοσης συμπληρώνοντας την αδυναμία της DPN στη μικροκλίμακα, γεγονός που την καθιστά μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο για κατασκευές στη μεγάλη κλίμακα. Χιλιάδες, ή ακόμα και εκατομμύρια, πένες από πολυμερές μπορούν να δημιουργήσουν από κοινού μία συστοιχία τέτοιων πολυμερικών πενών όπου με την ταυτόχρονη εναπόθεση των υλικών πάνω στο υπόστρωμα μπορούν να εκτυπώσουν σε μεγαλύτερο εύρος σε σύγκριση με τη χρήση μεμονωμένων πενών. Όταν οι ακίδες της συστοιχίας πολυμερικών πενών ακουμπήσουν το υπόστρωμα, η μελάνη με την οποία αυτές έχουν επικαλυφθεί μπορεί να προσγειωθεί πάνω σε αυτό.

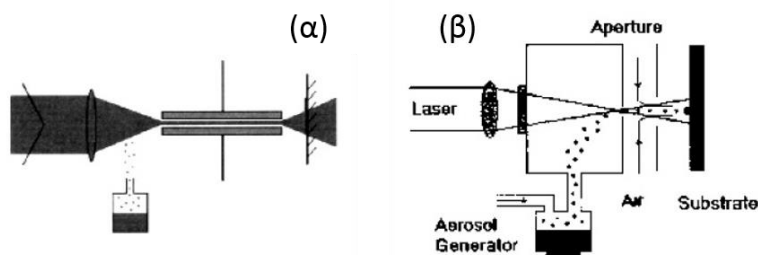
2.3.6 Άμεση εκτύπωση με τεχνολογία λέιζερ

Η τεχνική άμεσης εκτύπωσης με τεχνολογία λέιζερ βασίζεται στη χρήση ενός λέιζερ για την επεξεργασία υλικών ώστε αυτά να εναποτεθούν πάνω σε ένα υπόστρωμα. Η δημοφιλία της χρήσης λέιζερ για άμεση εκτύπωση προκύπτει αναπόφευκτα από μία διαδικασία, τη μικρομηχανική με λέιζερ (laser micromachining), ωστόσο υπάρχουν πολλές άλλες μέθοδοι που εκμεταλλεύονται τα πλεονεκτήματα του λέιζερ, όπως η χημική εναπόθεση ατμών με λέιζερ (laser chemical vapor deposition – LCVD)¹², η ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση (electroplating) με τη χρήση λέιζερ¹³, η παλμική εξάχνωση με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα για άμεση εκτύπωση (matrix assisted pulsed laser evaporation direct write – MAPLE DW)¹⁴, κλπ.. Μερικές μέθοδοι με λέιζερ για κατασκευή μοτίβων είναι αυτόνομες, αλλά μπορούν να θεωρηθούν και ως

εργαλεία άμεσης εκτύπωσης, ωστόσο στην παρούσα εργασία θα περιγράψουν μόνο μέθοδοι εναπόθεσης υλικών, σύμφωνα με τον ορισμό που δόθηκε προηγουμένως ως τεχνικές εκτύπωσης όπου δεν απαιτείται το βήμα της εγχάραξης.

2.3.6.1 Μέθοδοι Άμεσης Εκτύπωσης FGDW και LGDW.

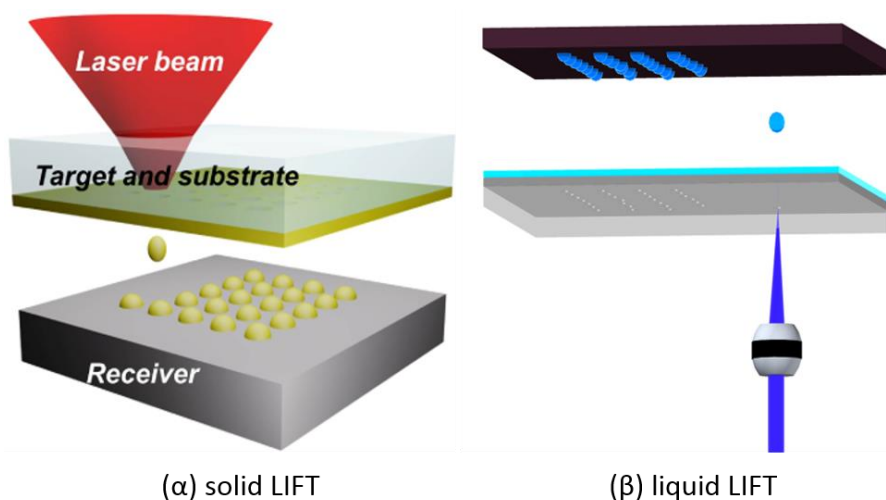
Στις τεχνικές FGDW (flow-guided direct write) και LGDW (καθοδηγούμενης από λέιζερ laser-guided direct write), ένα πρόδρομο υγρό ή ένα κολλοειδές αιωρούμενο αρχικά μετασχηματίζεται σε ένα αεροζόλ μέσω συσκευών υπερήχων εξαέρωσης ή νεφελοποίησης πεπιεσμένου αέρα, αναλόγως του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτό το πυκνό αεροζόλ εισάγεται στη συνέχεια στις συσκευές εναπόθεσης και εστιάζεται δημιουργώντας μία ευρύτερη δέσμη χάρη στις οπτικές και υδροδυναμικές δυνάμεις που προκύπτουν από τη μεταφορά ορμής μεταξύ της δέσμης του λέιζερ και των σωματιδίων του αεροζόλ.



Εικόνα 2.7: Αναπαράσταση των συστημάτων (a) LGDW και (b) FGDW.⁴

2.3.6.2 Τεχνική Απευθείας Μικρο-εναπόθεσης με Λείζερ.

Η τεχνική της απευθείας μικρο-εναπόθεσης με λέιζερ (laser induced forward transfer – LIFT) είναι άλλη μία τεχνική άμεσης εναπόθεσης με τεχνολογία λέιζερ και είναι η τεχνική που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία για την εκτύπωση βιο-υλικών σε τροποποιημένες επιφάνειες πυριτίου. Η βασική αρχή της απεικονίζεται στην Εικόνα 2.8. Το προς εκτύπωση υλικό αρχικά εναποτίθεται σε μορφή λεπτού υμενίου σε ένα υπόστρωμα δότη το οποίο επιτρέπει τη διέλευση της δέσμης του λέιζερ. Το υπόστρωμα του δότη με το λεπτό υμένιο πλησιάζουν κοντά στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Η δέσμη του λέιζερ εστιάζεται στη διεπιφάνεια του διαφανούς υποστρώματος του δότη και του στρώματος του λεπτού υμενίου και προκαλεί τη μερική εξάτμιση του υλικού/στόχου και ωθεί το εναπομένον πάχος του υλικού προς το υπόστρωμα του αποδέκτη.



Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής LIFT.¹⁵

2.4 Η ΤΕΧΝΙΚΗ LIFT ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟ-ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ.

Η ανάπτυξη των μικρομηχανικών συστημάτων δημιούργησε νέες προκλήσεις και έθεσε ιδιαίτερες απαιτήσεις στην επιλεκτική εναπόθεση των βιο-μορίων που θα αποτελέσουν το στοιχείο βιο-αναγνώρισης στο βιο-αισθητήρα. Οι βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν οι τεχνικές εναπόθεσης είναι η υψηλή



διακριτική ικανότητα στην εκτύπωση και η προστασία των ευαίσθητων υποστρωμάτων των βιο-αισθητήρων από την επαφή με το φορέα του υλικού.

Η επαφή του φορέα του υλικού με το υπόστρωμα του βιο-αισθητήρα θα ήταν καταστροφική για λεπτεπίλεπτες δομές μικρής μηχανικής αντοχής (π.χ. η υπέρλεπτη μεμβράνη ενός αισθητήρα χωρητικότητας). Σαν αποτέλεσμα, αποκλείονται αρκετές από τις συμβατικές τεχνικές εναπόθεσης, όπως η εκτύπωση μικροεπαφής (micro contact printing), η εκτύπωση μεταξοτυπίας (screen printing) και άλλες παραλλαγές μεθόδων εκτύπωσης που βασίζονται στην επαφή και τη χρήση στάμπας (όπως η τεχνική roll to roll).

Η τεχνική LIFT είναι μία τεχνική εναπόθεσης στην οποία δεν απαιτείται επαφή (non – contact printing) και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, και ως εκ τούτου εξασφαλίζει την προστασία των ευαίσθητων υποστρωμάτων των βιο-αισθητήρων. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος ταχείας προτυποποίησης δεν απαιτεί την χρήση μασκών, οι οποίες είναι απαραίτητες στη φωτολιθογραφία. Κατά συνέπεια, η τεχνική απευθείας εναπόθεσης με λέιζερ μπορεί να προσαρμοστεί εύκολα και με χαμηλό κόστος ώστε να καλύψει τις απαιτήσεις για εναπόθεση πλήθους διαφορετικών υλικών σε υποστρώματα βιο-αισθητήρων διαφορετικής μορφολογίας. Επίσης, το ιζώδες των προς εναπόθεση υλικών είναι αρκετά διευρυμένο και μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτύπωση τόσο υλικών στερεής φάσης όσο και υγρής.

Η ελάχιστη διακριτική ικανότητα είναι της τάξης των μερικών μικρομέτρων και ανταποκρίνεται στις ανάγκες που θέτουν οι περισσότεροι βιο-αισθητήρες. Μία τυπική διάταξη απευθείας εναπόθεσης με λέιζερ έχει ενσωματωμένο ένα οπτικό μικροσκόπιο το οποίο καθιστά το σύστημα εκτύπωσης κατάλληλο για την επί τόπου ευθυγράμμιση και επιλεκτική μεταφορά υλικού σε μεγάλη ποικιλία διαφορετικών υποστρωμάτων βιο-αισθητήρων, ενώ εξυπηρετεί και τον επί τόπου έλεγχο του αποτελέσματος της εναπόθεσης.¹⁶

3 ΤΕΧΝΙΚΗ LASER INDUCED FORWARD TRANSFER (LIFT).

Η τεχνική LIFT αποτελεί μια εξειδικευμένη μέθοδο για ελεγχόμενη μεταφορά υλικών από ένα διαφανή φορέα, τον στόχο δότη (donor target), σε ένα υπόστρωμα υποδοχής (receiver substrate). Το υπόστρωμα υποδοχής τοποθετείται παράλληλα και σε πολύ κοντινή απόσταση μερικών δεκάδων ή και εκατοντάδων μm) ή σχεδόν σε επαφή (near contact) με τον διαφανή φορέα του προς εναπόθεση υλικού, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεση ή κενού. Στη συνέχεια, η δέσμη ενός παλμικού λέιζερ εστιάζεται στη διεπιφάνεια φορέα/λεπτού υμενίου (carrier/thin film) για να γίνει η μεταφορά του υλικού από τον φορέα στο υπόστρωμα υποδοχής. Η επιτυχία μια τέτοιας μεταφοράς εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του laser (μήκος κύματος, ένταση, εύρος παλμού) και από τη δομή των υπόλοιπων εξαρτημάτων.

Αρχικά η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την εναπόθεση μετάλλων. Στη συνέχεια η χρήση της τεχνικής επεκτάθηκε στην εναπόθεση ενός μεγάλου εύρους υλικών που περιλαμβάνουν οξειδία, ημιαγωγούς, υπεραγωγούς και πρόσφατα για βιο-υλικά και οργανικά υλικά.

Η τεχνική LIFT παρουσιάζει μια σειρά από ενδιαφέρουσες ιδιότητες που καθιστούν τη τεχνική ελκυστική για την εναπόθεση οργανικών υλικών:

- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.
- Διαμορφώνοντας την προσπίπτουσα ακτινοβολία του παλμικού λέιζερ προκαθορίζεται το μέγεθος του εναποτιθέμενου σποτ.
- Είναι μια διαδικασία με ακτινοβολήση μίας φορές (single-shot process).
- Ο ρυθμός της διαδικασίας εκτύπωσης περιορίζεται είτε από τη συχνότητα επανάληψης παλμού (laser repetition rate) ή από το χρόνο που χρειάζεται να μετακινηθεί το υπόστρωμα από το ένα σποτ στο άλλο.
- Μπορεί να εναποτεθεί ένα μεγάλο εύρος υλικών (σε υγρή ή στερεά φάση).



- Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη παρασκευή πολυστρωματικών δομών (σρωοί λεπτών στρωμάτων από διαφορετικά υλικά) με έναν απλό και άμεσο τρόπο.

Ωστόσο εκτός από τα πλεονεκτήματα η τεχνική παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς οι οποίοι είναι οι εξής:

- Τα περισσότερα λέιζερ που χρησιμοποιούνται στην τεχνική LIFT εκπέμπουν στην υπεριώδη (UV) ή στην υπέρυθρη (IR) ακτινοβολία με σχετικά μεγάλες πυκνότητες ρεύματος έτσι ώστε η μεταφορά του υλικού να είναι επιτυχής. Ωστόσο για τέτοια λέιζερ είναι απαραίτητα σύνθετα και ακριβά οπτικά συστήματα. Επίσης για UV ή IR λέιζερ η πιθανότητα καταστροφής (damage) των οργανικών υλικών κατά τη διάρκεια της μεταφοράς μεγαλώνει δεδομένου ότι τα οργανικά υλικά παρουσιάζουν υψηλή απορρόφηση για UV και IR ακτινοβολίες.
- Η δέσμη του λέιζερ μπορεί να προκαλέσει μηχανικές ρωγμές (mechanical cracks) στο μεταφερόμενο υλικό καθώς και οξύτητα στις άκρες του.
- Η χρήση UV λέιζερ μπορεί να δημιουργήσει κέντρα παγίδευσης, τις παγίδες, στο κύριο όγκο του υλικού (bulk) στις δομές TC και BC καθώς και κοντά στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίων/ημιαγωγού στη δομή TC.

3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ - LIFT.

Για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός εναπόθεσης με τη τεχνική LIFT, θα πρέπει αρχικά να γίνει αναφορά στο υπόστρωμα δότη που χρησιμοποιείται για την μετέπειτα εναπόθεση του υλικού στο υπόστρωμα του αποδέκτη. Το υπόστρωμα του δότη είναι πολυστρωματικό: αποτελείται από ένα πλακίδιο χαλαζία (quartz), το οποίο έχει επιστρωθεί με τη τεχνική spin coating από ένα ενδιάμεσο απορροφητικό στρώμα (dynamic release layer – DRL) τιτανίου (Ti), τριαζίνης (N_3H_3), ή άλλων υλικών και ένα ομοιόμορφο στρώμα του υγρού υλικού προς εναπόθεση που έχει τοποθετηθεί με πιπέτα. Όλο το υπόστρωμα του δότη έχει πάχος 1 mm και διάμετρο 2.5 cm (Εικόνα 3.1).

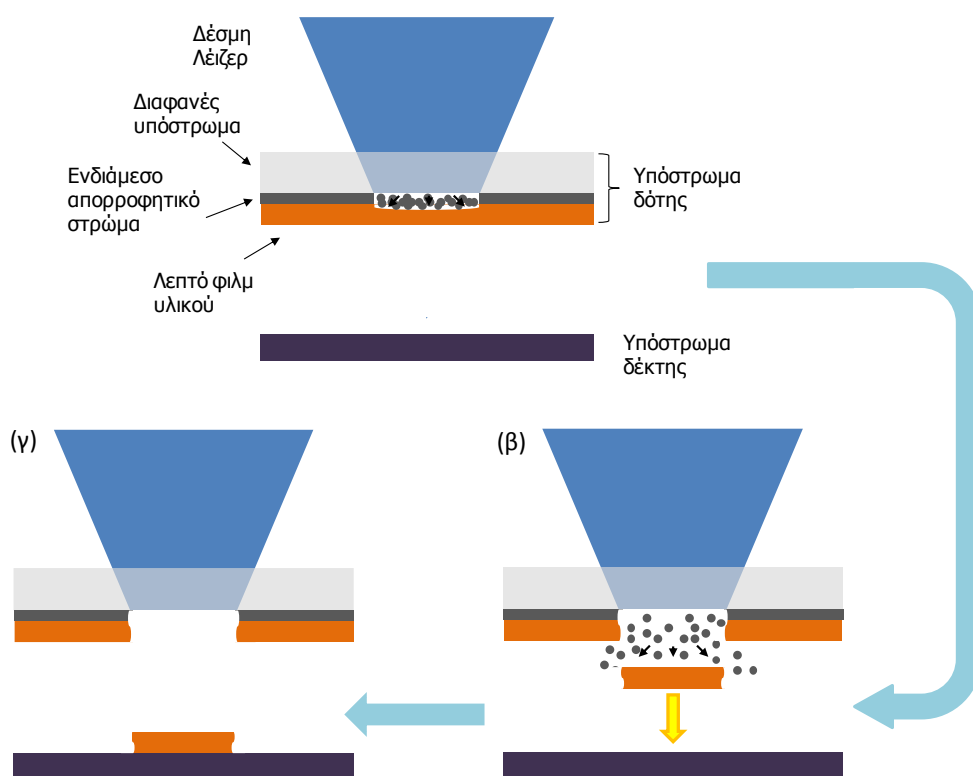


Εικόνα 3.1: Το υπόστρωμα του δότη.

Το quartz είναι διαφανές στην περιοχή του υπεριώθρου, του υπεριώδους και του ορατού φάσματος της ακτινοβολίας, κάτι το οποίο συνεπάγεται ότι επιτρέπει στη δέσμη του λέιζερ να διέρχεται μέσα από αυτό χωρίς να την απορροφά (το quartz έχει πάχος 1 mm και απορροφά το 5% της ακτινοβολίας που εισέρχεται σε αυτό στα 266 nm). Το τιτάνιο (Ti) - ενδιάμεσο απορροφητικό στρώμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας εργασίας- έχει πολύ καλή πρόσφυση με το quartz, με αποτέλεσμα το υπόστρωμα του δότη να επαναχρησιμοποιείται χωρίς να αφαιρείται ποσότητα του τιτανίου από τις πλύσεις με ddH₂O. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι το Ti είναι βιο-συμβατό, δηλαδή ενδείκνυται για χρήση σε εφαρμογές εναπόθεσης βιολογικών υλικών.

Κατά την διαδικασία εναπόθεσης υλικού πάνω στο υπόστρωμα- αποδέκτη με την τεχνική LIFT, η δέσμη του λέιζερ συναντά πρώτα το quartz, διαμέσου του οποίου διέρχεται χωρίς καμία απώλεια, φτάνοντας στο λεπτό στρώμα Ti πάνω στο οποίο

βρίσκεται το προς εναπόθεση υγρό, το οποίο και απορροφά τη δέση με αποτέλεσμα αυτό να θερμαίνεται ή/και αποδομείται τοπικά (Εικόνα 3.2 (α)). Αυτό έχει σαν συνέπεια τη δημιουργία ενός θύλακα υψηλής πίεσης αέρα στη διεπιφάνεια του τιτανίου και του διαλύματος, ο οποίος έχει μεγαλύτερη πίεση από την ατμοσφαιρική. Επειδή πρέπει να επανέλθει η ισορροπία των πιέσεων, ο θύλακας, λόγω μικρού μεγέθους και μεγάλης πίεσης, εκτονώνεται μέχρι το σημείο όπου η εσωτερική του πίεση θα είναι ίση με την ατμοσφαιρική. Σε αυτό το σημείο ο θύλακας θα σπάσει με αποτέλεσμα το συγκεκριμένο τμήμα του διαλύματος να ελευθερωθεί (Εικόνα 3.2 (β)) με τη μορφή ενός κατευθυντικού jet και να προσγειωθεί πάνω στο υπόστρωμα του αποδέκτη (Εικόνα 3.2 (γ)).



Εικόνα 3.2: Αναπαράσταση της τεχνικής LIFT με χρήση ενδιάμεσου απορροφητικού στρώματος (DRL) (α) Η ακτινοβολή του DRL προκαλεί την θέρμανσή του ή και την αποδόμησή του ανάλογα με την πυκνότητα ενέργειας του λέιζερ. (β) Η εκτόνωση του θύλακα αερίων που δημιουργεί.¹⁷

Στα πειράματα στα οποία χρησιμοποιείται η τεχνική LIFT για την εναπόθεση βιολογικών υλικών, είναι απαραίτητο να εξασφαλίζεται η βιο-ενεργότητα του υλικού μετά την εναπόθεση. Για να επιβεβαιωθεί αυτό πρέπει πρώτα να οριστεί το βάθος διείσδυσης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (optical penetration depth).

Για το λόγο αυτό, πρέπει το πάχος του ενδιάμεσου στρώματος να είναι μεγαλύτερο από το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας σε αυτό, ώστε να διέρχεται ένα ενεργειακά αμελητέο ποσό ακτινοβολίας στο, προς εναπόθεση, βιολογικό υλικό.

Το βάθος διείσδυσης (x) της ακτινοβολίας μέσα σε ένα υλικό καθορίζεται βάση του νόμου των Beer-Lambert:

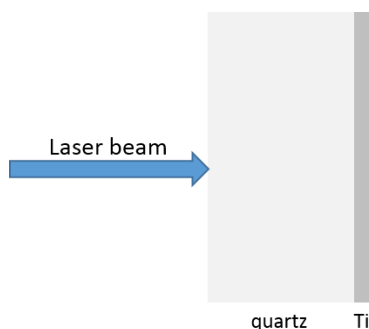
$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\alpha \cdot x} \quad (1)$$

όπου, I_0 η ένταση της ακτινοβολίας στην επιφάνεια του υλικού, α ο συντελεστής απορρόφησης του υλικού, ο οποίος εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και x το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας.

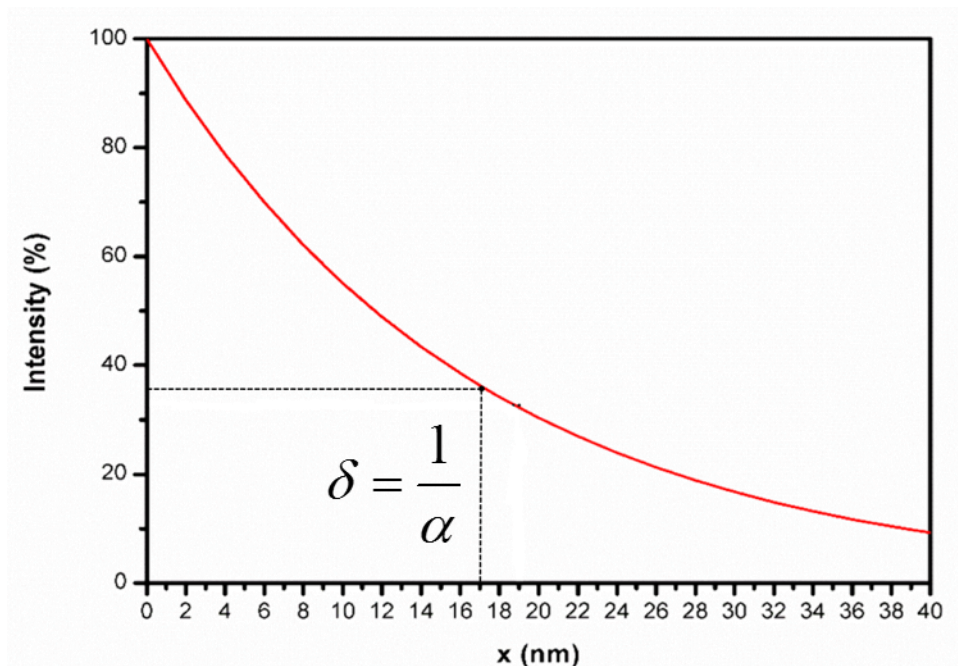
Οπτικό βάθος διείσδυσης, δ , ορίζεται ως το βάθος διείσδυσης της οπτικής ακτινοβολίας στην οποία η ένταση της ακτινοβολίας πέφτει στο $1/e$ (~37%) της αρχικής έντασης στην επιφάνεια του υλικού.

$$\delta = \frac{1}{\alpha} \quad (2)$$

Στην προκειμένη περίπτωση ο συντελεστής απορρόφησης του στρώματος του Ti στα 266 nm είναι $\alpha = 5,96 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ και το αντίστοιχο οπτικό βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας είναι $\delta = 17 \text{ nm}$.

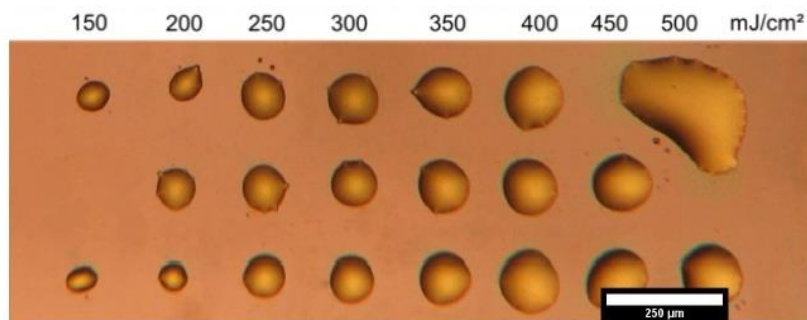


Εικόνα 3.3: Κάτοψη Στόχου – Δότη (Πάχος quartz = 1 mm και πάχος στρώματος Ti = 40 nm).



Εικόνα 3.4: Ποσοστιαία μείωση της ακτινοβολίας σε σχέση με το βάθος διείσδυσης στο στρώμα του τιτανίου (Τi).

Το σταγονίδιο (droplet) που προκύπτει πρέπει να έχει συγκεκριμένο μέγεθος: δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ μικρό, πράγμα το οποίο σημαίνει ελάχιστο υλικό στο υπόστρωμα του αποδέκτη και άρα μικρή απόδοσή του, αλλά ούτε και πολύ μεγάλο, όπου θα δημιουργούνται συσσωματώματα μεταξύ των εναποτιθέμενων σταγονιδίων και δεν θα υπάρχει ομοιομορφία που και πάλι συνεπάγεται όχι καλή απόδοση για το μικροσύστημα. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα η τεχνική LIFT για βιο-μόρια και άλλα υγρά υλικά έχει κατώφλι (threshold) πυκνότητας ενέργειας τα 150 mJ/cm^2 . Τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνεται να τα έχουμε στις πυκνότητες ενέργειας $200 - 350 \text{ mJ/cm}^2$, ενώ από 400 mJ/cm^2 και πάνω τα spots που έχουμε παρουσιάζουν συσσωματώματα με αποτέλεσμα να είναι ακατάλληλα για τους αισθητήρες μας, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.5.

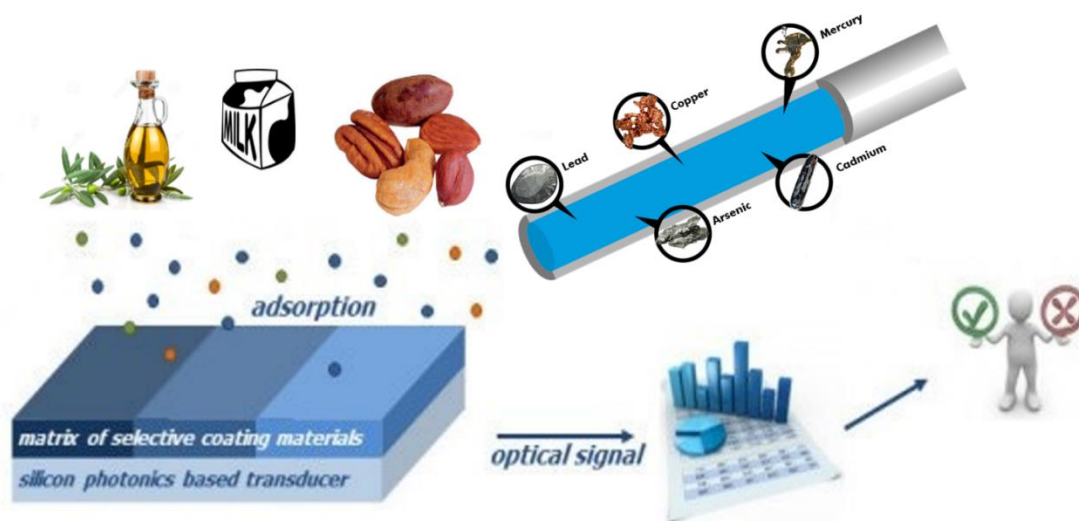


Εικόνα 3.5: Εναπόθεση με την τεχνική LIFT ολιγονουκλεοτιδίων συγκέντρωσης 10 μM διαλυμένα σε 1 M phosphate buffer pH 8 και 2% sodium dodecyl sulphate (SDS) σε επίπεδες επιφάνειες GOPTS/LTO/Si για διαφορετικές πυκνότητες ενέργειας της δέσμης του λέιζερ.:¹⁸

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την ακτινοβολήση του με την δέσμη λέιζερ το τιτάνιο θερμαίνεται ή/και αποδομείται τοπικά, ωστόσο το βιολογικό δείγμα δεν καταστρέφεται ούτε επηρεάζεται η λειτουργικότητά του, με αποτέλεσμα να παραμένει ανεπηρέαστο κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές εργασίες μελέτης του μηχανισμού εναπόθεσης, τόσο σε πειραματικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο, ούτως ώστε να κατανοηθεί όσο το δυνατόν καλύτερα ο σχηματισμός των θυλάκων υψηλής πίεσης και η εξάρτηση του μεγέθους και του σχήματος του σταγονιδίου από την πυκνότητα ενέργειας της δέσμης του λέιζερ, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της τεχνικής LIFT.

4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟ-ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ LIFT ΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.

Απώτερος στόχος είναι η ανάπτυξη βιολογικού οπτικού αισθητήρα, ο οποίος θα είναι ικανός να ανιχνεύσει άμεσα και με μεγάλη ευαισθησία μυκοτοξίνες, βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά, ουσίες που αν και είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο συναντώνται συχνά σε τρόφιμα, όπως γάλα, λάδι και ξηρούς καρπούς. Με την τεχνική LIFT έχουμε τη δυνατότητα της άμεσης εκτύπωσης βιο-υποδοχέων και την ακινητοποίησή τους σε υποστρώματα είτε αυτά είναι τροποποιημένα είτε όχι. Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα εργασία εστιάζεται στην ακινητοποίηση απταμερών, βιο-υποδοχέων που μπορούν να προσδεθούν επιλεκτικά και κατ' επέκταση να ανιχνευτούν με ακρίβεια συγκεκριμένες τοξίνες, πάνω σε χημικά τροποποιημένες επιφάνειες (Εικόνα 4.1).

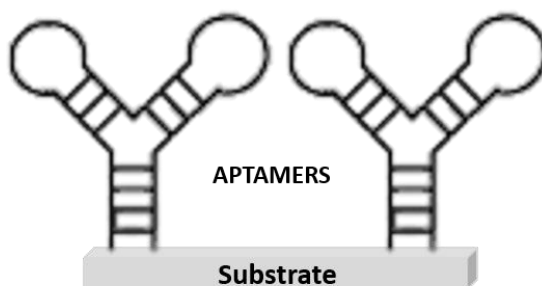


Εικόνα 4.1: Οπτικός Βιο-αισθητήρας για ανάλυση τροφίμων

4.1 ΑΠΤΑΜΕΡΗ: ΟΙ ΒΙΟ-ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ

Τα απταμερή (aptamers) είναι ακολουθίες ολιγονουκλεοτιδίων ή πεπτιδίων που μπορούν να δεσμευθούν, αναγνωρίσουν και συλλάβουν συγκεκριμένους στόχους, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση. Αυτά τα μόρια μπορούν να αποκτήσουν μια ποικιλία σχημάτων λόγω της τάσης τους να σχηματίζουν έλικες και μονής έλικας βρόχους, εξηγώντας την ευελιξία τους στην δέσμευση με ποικίλους στόχους.

Απταμερή νουκλεϊνικού οξέος είναι μια ακολουθία νουκλεϊκών οξέων που έχουν επιλεγεί μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων *in vitro* ή ισοδυνάμως, SELEX κύκλων (συστηματική εξέλιξη προσδεμάτων δι' εκθετικού εμπλουτισμού) ως τα απταμερή εκείνα που συνδέονται συγκεκριμένα με διάφορους μοριακούς στόχους όπως μικρά μόρια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, ακόμη και κύτταρα, ιστούς και οργανισμούς. Τα απταμερή είναι χρήσιμα σε βιο-τεχνολογικές και θεραπευτικές εφαρμογές, δεδομένου ότι προσφέρουν τις ιδιότητες μοριακής αναγνώρισης. Εκτός από την αναγνώριση τους, τα απταμερή προσφέρουν πλεονεκτήματα έναντι των αντισωμάτων, δεδομένου ότι μπορούν να αναπτυχθούν εξ' ολοκλήρου σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, παράγονται εύκολα με χημική σύνθεση, κατέχουν τις επιθυμητές ιδιότητες αποθήκευσης και προκαλούν μικρή ή καθόλου ανοσογονικότητα σε θεραπευτικές εφαρμογές.



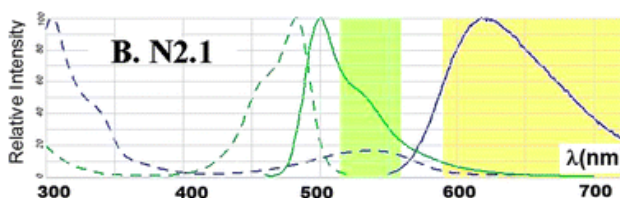
Εικόνα 4.2: Σχηματική αναπαράσταση των aptamers στο υπόστρωμα.

Τα aptamers που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν την ακολουθία 5'-GTTGGGCACGTGTTGTCTCTGTGTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACACA-3' και στοχεύουν στην ανίχνευση της τοξίνης Ochratoxin A (OTA). Η ανίχνευση τους και η διαπίστωση

αν έχουν ακινητοποιηθεί επιτυχώς στις τροποποιημένες επιφάνειες μέσω του οπτικού μικροσκοπίου, τα απταμερή είναι επισημασμένα με δείκτη φθορισμού (Texas Red: φθορισμός στα 615 nm, και κορυφή του φάσματος απορρόφησης στα 589 nm). Οι εικόνες φθορισμού που θα παρουσιαστούν καταγράφηκαν με οπτικό μικροσκόπιο Leica με χρήση των φίλτρων N2.1 και I3, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και Εικόνα 4.3.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά Φίλτρων Οπτικού Μικροσκοπίου

Filter Cube	Excitation Range	Excitation Filter (nm)	Suppression Filter (nm)
N2.1	Green (450 – 495 nm)	BP 450-490 nm	LP 590 nm
N3	Green (450 – 495 nm)	BP 546/12 nm	BP 600/40 nm



Εικόνα 4.3: Γραφική Παράσταση Σχετικής Έντασης Ακτινοβολίας συναρτήσει του μήκους κύματος του φίλτρου N2.1 του μικροσκοπίου φθορισμού.

4.2 LIFT - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ

Η διεξαγωγή των πειραμάτων LIFT πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Λέιζερ του Τομέα Φυσικής, όπου χρησιμοποιήθηκε ένας σταθμός μικρομηχανικής με προσαρμοσμένο σύστημα μικροσκοπίου.

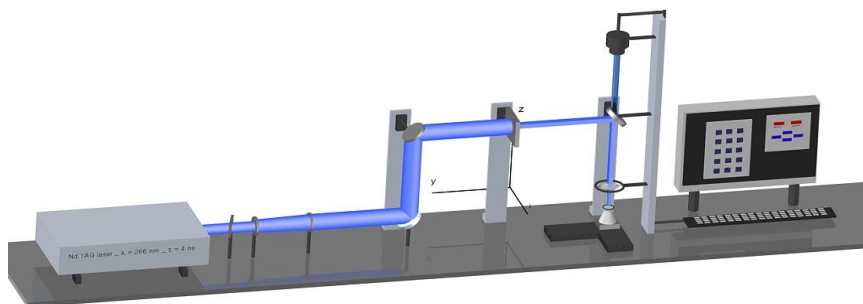
Η πειραματική διάταξη περιλαμβάνει: ένα παλμικό Nd:YAG λέιζερ (LITRON), διάρκειας παλμού 4 ns, στα 2 Hz, έναν εξασθενητή της έντασης της δέσμης λέιζερ, ένα σύστημα τηλεσκοπίου, το σύστημα απεικόνισης το οποίο αποτελείται από μία μάσκα και έναν αντικειμενικό φακό, μία κάμερα CCD και τέλος από τη βάση στήριξης του στόχου-δότη και του στόχου-δέκτη, τα μοτέρ και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το σύνολο των πειραμάτων LIFT πραγματοποιήθηκαν στο υπεριώδες $\lambda = 266\text{nm}$ (Εικόνα 4.4 **Error! Reference source not found.**).

Η μεταφορά και ευθυγράμμιση της δέσμης λέιζερ με το σταθμό μικρομηχανικής γίνεται με τη χρήση δύο κατόπτρων. Πριν το σταθμό μικρομηχανικής, η χρήση ενός εξασθενητή δέσμης (attenuator) δίνει την δυνατότητα μεταβολής της έντασης της δέσμης του λέιζερ που χρησιμοποιείται για το LIFT. Επιπλέον, ένα σύστημα των φακών -ένας αποκεντρωτικός UV φακός ($f=-150\text{mm}$) και ένας συγκεντρωτικός UV φακός ($f=+300\text{mm}$) σε απόσταση 150mm από τον πρώτο φακό- δρα ως τηλεσκόπιο μεγεθύνοντας την διάμετρο της δέσμης κατά δυο φορές. Το σχήμα και οι διαστάσεις της δέσμης λέιζερ πάνω στο υλικό-στόχο ρυθμίζονται μέσω ενός μεταβλητού διαφράγματος (μάσκα) σε διάφορα σχήματα έτσι ώστε κάθε φορά να εκτίθεται συγκεκριμένο τμήμα του υλικού-στόχου, με σκοπό μόνο μία καθορισμένη και ακριβής ποσότητα υλικού με ελεγχόμενο σχήμα να μεταφέρεται πάνω στο υπόστρωμα.

Ο σταθμός μικρομηχανικής αποτελείται από μια κατακόρυφα τοποθετημένη ράβδο στήριξης οπτικών και μικρομετρικών στηριγμάτων, δύο πλατφόρμες εφοδιασμένες με μοτέρ που παρέχουν δυνατότητα ελεγχόμενης κίνησης στους άξονες x-y από H/Y με ακρίβεια 20 μm και συνολική κίνηση 25 mm και ένα κελί στήριξης των δειγμάτων. Για την εστίαση της δέσμης του λέιζερ χρησιμοποιείται αντικειμενικός φακός 15x (OFR, NA=0.32). Παράλληλα, το σύστημα αντικειμενικού φακού - προσοφθάλμιου

φακού ($f=+100$ mm) - κάμερας (UNIBRAIN) παρείχαν την δυνατότητα της on-line παρακολούθησης και καταγραφής των πειραμάτων.

Η δέσμη λέιζερ οδηγείται πάνω στον στόχο-δότη και τον ακτινοβολεί. Η ενέργεια που απορροφάται από το προς εναπόθεση υλικό είναι ικανή να αφαιρέσει και να μεταφέρει ένα συγκεκριμένο μέρος του επάνω στο υπόστρωμα δέκτη. Η επανάληψη της διαδικασίας μεταφοράς σε διαφορετικές θέσεις στόχου και υποστρώματος, πραγματοποιείται είτε μέσω του υπολογιστή, με τον οδηγό των βηματικών κινητήρων με δυνατότητα δημιουργίας μικροσυστοιχιών, είτε χειροκίνητα. Η δέσμη του λέιζερ περνά πρώτα από ένα σύστημα ελεγχόμενης εξασθένησης, στην συνέχεια από ένα σύστημα φακών που διπλασιάζει την διάμετρο της και καταλήγει να "φωτίζει" την μάσκα. Το σχήμα της μάσκας προβάλλεται στην διεπιφάνεια με χρήση ενός αντικειμενικού φακού. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων LIFT τα διάφορα υποστρώματα στερεώθηκαν στην βάση του κελιού με τη βοήθεια μιας ρητίνης.



Εικόνα 4.4: Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης LIFT που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

4.2.1 Λείζερ

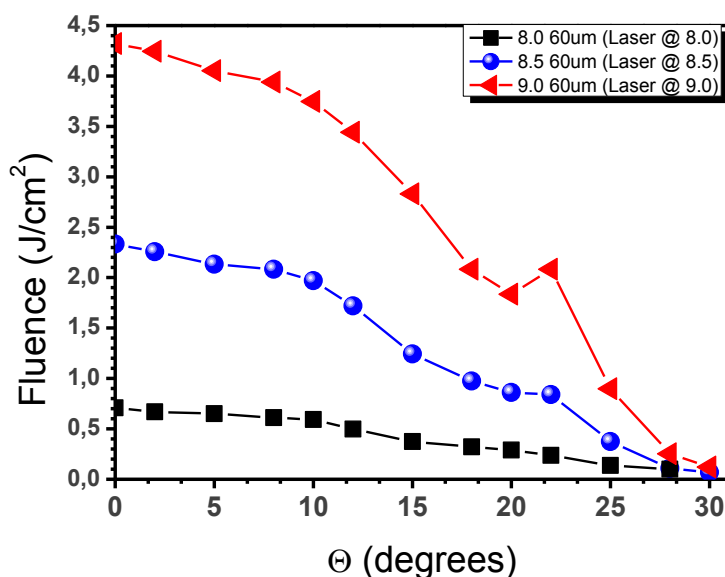
Το λέιζερ που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα Nd:YAG (Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet) λέιζερ με repetition rate 2 Hz και pulse duration 10 nsec. Το λέιζερ έχει ενέργεια ανά παλμό 300 mJ για την κύρια αρμονική στα 1064 nm και έχουμε τη δυνατότητα εκπομπής στη 2^η – 532 nm, 3^η – 355 nm και 4^η – 266 nm αρμονική με χρήση κατάλληλων κρυστάλλων διπλασιασμού συχνότητας. Όλα τα πειράματα εναπόθεσης πραγματοποιήθηκαν με την 4^η αρμονική για το γεγονός ότι στα 266 nm

η ακτινοβολία που χτυπάει το στόχο δότη δεν επηρεάζει το προς εναπόθεση υλικό μας.

Ο εξασθενητής είναι quartz με ειδική επίστρωση (Inconel το οποίο αποτελείται κατά κύριο λόγο από νικέλιο και χρώμιο) ώστε να απορροφά στο συγκεκριμένο μήκος κύματος που χρησιμοποιούμε. Είναι τοποθετημένος μετά την έξοδο του λέιζερ και βρίσκεται πάνω σε ένα μοτέρ με δυνατότητα κυκλικής κίνησης. Καθώς στρέφεται ο εξασθενητής και μεγαλώνει η γωνία που σχηματίζει με τον άξονα της διάδοσης της δέσμης, μικραίνει και η ένταση της διερχόμενης ακτινοβολίας με αποτέλεσμα να μειώνεται και η πυκνότητα ενέργειας με την οποία τελικά γίνεται η εναπόθεση του υλικού μας.

Με τη βοήθεια ενός παλμογράφου και ενός ενεργόμετρου, προκύπτει η τάση εξόδου ΔV για τις διαδοχικές γωνίες. Ρυθμίζοντας τη μάσκα ώστε να δίνει αποτύπωμα (spot size) διαμέτρου 60 μm πάνω στο υπόστρωμα δότη, η ενέργεια υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{Fluence [mJ/cm}^2] = \frac{E}{\pi R^2} = \frac{\Delta V}{\pi R^2 \cdot 1480} \quad (3)$$



Εικόνα 4.5: Διάγραμμα βαθμονόμησης της πυκνότητας ενέργειας της δέσμης του λέιζερ συναρτήσει της γωνίας του εξασθενητή.

4.2.2 Σύστημα Τηλεσκοπικών Φακών

Το σύστημα τηλεσκοπικών φακών αποτελείται από έναν αποκλίνοντα φακό ($f_1 = -150$ mm) και έναν συγκλίνοντα φακό ($f_2 = +300$ mm) τοποθετημένων σε απόσταση 150 mm. Το τηλεσκόπιο μεγεθύνει κατά ένα παράγοντα 2 την διάμετρο της δέσμης ($M = f_2/f_1 = 2$) έτσι ώστε να γίνει αποτελεσματικότερη η επιλογή ενός ομογενούς κομματιού της από την μάσκα.

4.2.3 Επίπεδα Κάτοπτρα

Στη συνέχεια, παρεμβάλλονται δύο επίπεδα κάτοπτρα τα οποία αντανακλούν πλήρως τη δέσμη του λέιζερ στο μήκος κύματος που έχει επιλεγθεί ($\lambda = 266$ nm). Η χρησιμότητά τους έγκειται στο να κατευθύνουν τη δέσμη στην επιθυμητή πορεία.

4.2.4 Imaging Plane

Η μεταβλητή μάσκα ρυθμίζει το αποτύπωμα (spot size) της δέσμης του λέιζερ. Η σπή της έχει εξαγωνικό σχήμα, όπου στα υγρά υλικά, λόγω ιξώδους, συνεπάγεται σφαιρικό σχήμα, δηλαδή ένα σταγονίδιο. Λόγω του ότι το σύστημα τηλεσκοπικών φακών διεύρυνε και εστίασε τη δέσμη, με τη χρήση της μάσκας επιτυγχάνεται μία ομοιόμορφη δέσμη, όπου η πυκνότητα ενέργειας που τη χαρακτηρίζει είναι όσο το δυνατόν πιο ισοκατανεμημένη σε όλα τα σημεία της.

Ο αντικειμενικός φακός LMU-15X-266 έχει αριθμητικό άνοιγμα $NA = 0.32$ και παρόλο που χρησιμοποιείται για την εστίαση της δέσμης πάνω στο υπόστρωμα του δότη, σε συνδυασμό με τη χρήση της μάσκας δημιουργεί φαινόμενα περίθλασης. Η εμφάνιση αυτών των φαινομένων είναι αναμενόμενη καθώς η δέσμη μίας ορισμένης διαμέτρου περνά από ένα εμπόδιο (τη μάσκα) που έχει μικρότερη διάμετρο. Για να μειωθούν σημαντικά αυτά τα φαινόμενα, πρέπει να βρεθεί η βέλτιστη απόσταση της μάσκας από τον αντικειμενικό φακό.

4.2.5 Βάσεις Στήριξης Υποστρώματος Δότη και Αποδέκτη

Οι βάσεις στήριξης του υποστρώματος του δότη και του αποδέκτη αποτελούνται από δύο παράλληλες πλάκες αλουμινίου κατάλληλα προσαρμοσμένες σε δύο

μικρομετρικά συστήματα κίνησης. Τα μικρομετρικά συστήματα κίνησης παρείχαν δυνατότητα ελέγχου της απόστασης μεταξύ των πλακών με ακρίβεια 20 μm . Η στήριξη του υποστρώματος του δότη γίνεται με την τοποθέτησή του στην ειδικά διαμορφωμένη κοιλότητα της αντίστοιχης βάσης στήριξης. Για το υπόστρωμα του αποδέκτη, η στήριξη γινόταν με χρήση ρητίνης στην αντίστοιχη βάση ενώ το σύστημα παρέχει και την δυνατότητα στήριξης μέσω κενού.

4.2.6 Οπτικό Μικροσκόπιο

Το ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο, το οποίο είναι ομοαξονικό σε σχέση με τον αντικειμενικό φακό, είναι συνδεδεμένο με μία CCD κάμερα η οποία φωτίζεται με τη βοήθεια ενός διαχωριστή δέσμης, ο οποίος λαμβάνει φως από μία απλή θερμιονική λάμπα και αφενός φωτίζει το υπόστρωμα του δότη και αφετέρου τη CCD κάμερα. Με αυτό το σύστημα, είναι δυνατή η ακριβής ευθυγράμμιση των υποστρωμάτων του δότη και του αποδέκτη, ο έλεγχος του προφίλ της δέσμης και ο επιτόπου έλεγχος των αποτελεσμάτων της εναπόθεσης.

4.2.7 Μοτέρ και Η/Υ

Για την αυτοματοποίηση της πειραματικής διάταξης χρησιμοποιήθηκαν τρεις βηματικοί κινητήρες. Οι δύο πρώτοι βηματικοί κινητήρες παρείχαν σχετική κίνηση του υποστρώματος δότη και του υποστρώματος αποδέκτη στους άξονες x και y , δίνοντας την δυνατότητα εκτύπωσης δισδιάστατων δομών. Ο τρίτος βηματικός κινητήρας παρείχε ελεγχόμενη περιστροφική κίνηση του εξασθηντή της δέσμης λέιζερ.

Η υλοποίηση του αυτοματισμού έγινε με χρήση του LabVIEW και την ανάπτυξη ενός προγράμματος που παρέχει τις δυνατότητες για εξωτερικό έλεγχο λειτουργίας του λέιζερ (επιλογή συχνότητας ή/και πλήθους παλμών), τον συγχρονισμό των βηματικών κινητήρων και του λέιζερ για την εναπόθεση απλών ή σύνθετων δισδιάστατων δομών, και για αυτοματοποιημένη επιλογή της ενέργειας παλμού του λέιζερ μέσω ελέγχου του βηματικού κινητήρα που ελέγχει την περιστροφή του εξασθηντή.

4.3 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

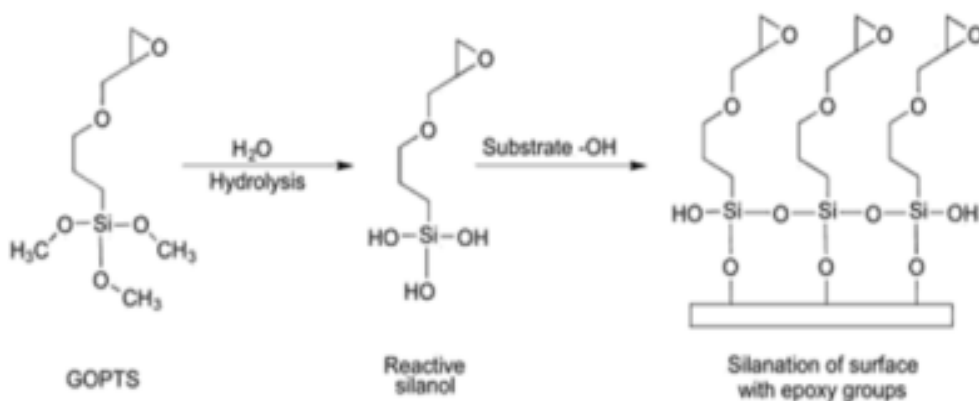
Στα πλαίσια της ανάπτυξης οπτικού βιο-αισθητήρα με βιο-υποδοχείς απταμερή, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την παρούσα εργασία, στα οποία μελετήθηκε η ακινητοποίηση των απταμερών για την ανίχνευση της τοξίνης (Ochratoxin A - OTA) πάνω σε τροποποιημένες επιφάνειες. Συγκεκριμένα σε επιφάνειες LTO/SiO₂ (Low Temperature Oxide / Silicon Dioxide) με σιλάνιο (GOPTS). Επίσης, εξετάστηκε η σωστή λειτουργία του οπτικού βιο-αισθητήρα, δηλαδή η ικανότητά του να ανιχνεύει την συγκεκριμένη τοξίνη.

Ο στόχος μας είναι η ακινητοποίηση των απταμερών σε τροποποιημένες επιφάνειες, LTO/SiO₂ με το σιλάνιο (GOPTS) και μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης και κατ' επέκταση ανίχνευσης της τοξίνης OTA από τα ακινητοποιημένα απταμερή.

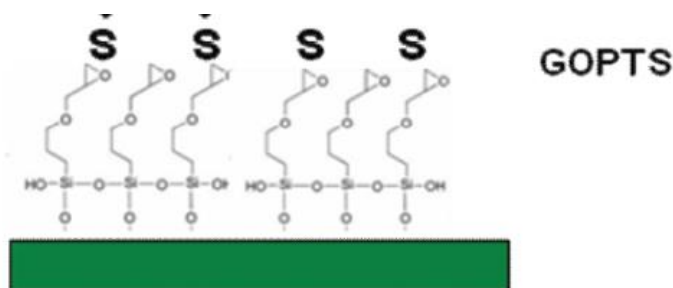
Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστούν οι διαδικασίες και τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την επιτυχή ακινητοποίηση των υπό μελέτη απταμερών στις τροποποιημένες επιφάνειες SiO₂.

4.3.1 LTO/SiO₂ Επιφάνειες

Στα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν η επιφάνεια του υποστρώματος LTO/SiO₂ τροποποιήθηκε με σιλάνιο (GOPTS) ώστε απταμερή χημικά τροποποιημένα με ελεύθερες ρίζες θειόλης να μπορούν να προσδεθούν με ημιπολικούς δεσμούς πάνω σε αυτήν. Το σιλάνιο (GOPTS) προσδένεται με τα ελεύθερα -OH της επιφάνειας του πυριτίου. Επίσης έχει τη δυνατότητα να πολυμερίζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία πριν την πρόσδεση στην επιφάνεια και επιτρέπει την πρόσδεση με τροποποιημένα βιο-μόρια (Εικόνα 4.6). Το τελικό υπόστρωμα είναι διοξείδιο του πυριτίου που δημιουργήθηκε από την οξείδωση του άμορφου πυριτίου σε χαμηλή θερμοκρασία (Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.6: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας τροποποίησης της επιφάνειας με το σιλάνιο (GOPTS).



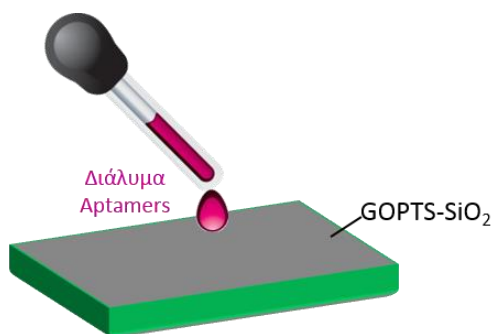
Εικόνα 4.7: Οι τελικές ελεύθερες ρίζες για την πρόσδεση των απταμερών στην τροποποιημένη επιφάνεια.

Τα δείγματα ξεπλένονται δύο φορές με 95% αιθανόλη. Στην συνέχεια αναδεύονται σε διάλυμα 2% 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) σε 95% αιθανόλη για 6 ώρες στους 37°C . Τέλος στεγνώνονται με αέρα και ψήνονται στους 135°C για μία ώρα.

4.3.2 Εναπόθεση των aptamers με πιπέτα

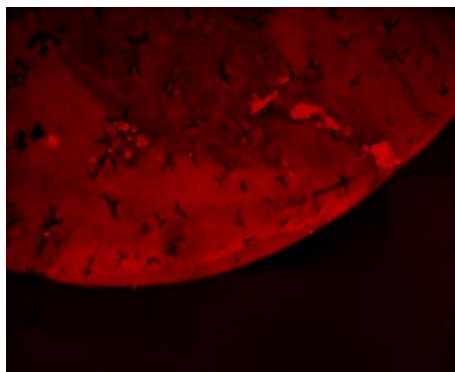
Έχοντας τις τροποποιημένες επιφάνειες, το επόμενο μας βήμα είναι η εναπόθεση των βιολογικών ανιχνευτών μας. Τα aptamers που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τροποποιημένα με ελεύθερη ρίζα θειόλης (S). Για τα δείγματα αναφοράς μας χρησιμοποιήθηκε η εναπόθεση με πιπέτα. Αρχικά εναποτέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις απταμερών στις επιφάνειες μας. Τα καλύτερα αποτελέσματα καταγράφηκαν για διάλυμα απταμερών συγκέντρωσης $10 \mu\text{M}$. Σε αυτά τα πειράματα

η ιδανική ποσότητα των aptamers που εναποτίθεται στις τροποποιημένες με GOPTS επιφάνειες LTO/SiO₂ ήταν 2 μ L (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8: Σχηματική αναπαράσταση εναπόθεσης των aptamers με πιπέτα.

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα 1.0 M potassium phosphate buffer pH 7.4 και ξεπλένονται με διάλυμα 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4. Για την αδρανοποίηση των επιφανειών, τα δείγματα τοποθετούνται στην συνέχεια σε διάλυμα 1M MCH για 1 ώρα και ξεπλένονται με διάλυμα 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4. Το ξέπλυμα των δειγμάτων πραγματοποιείται για την ευθυγράμμιση των ακινητοποιημένων aptamers και την απομάκρυνση των μη ακινητοποιημένων aptamers. Τέλος τα δείγματα στεγνώνονται με αέριο άζωτο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.9 όπου δείχνει την εικόνα φθορισμού των απταμερών που έχουν προσδεθεί πάνω στην τροποποιημένη επιφάνεια, τα απταμερή ακινητοποιούνται πάνω στις τροποποιημένες επιφάνειες. Η εικόνα καταγράφηκε με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού χρησιμοποιώντας το φίλτρο N2.1 για χρόνο έκθεσης 600 ms.

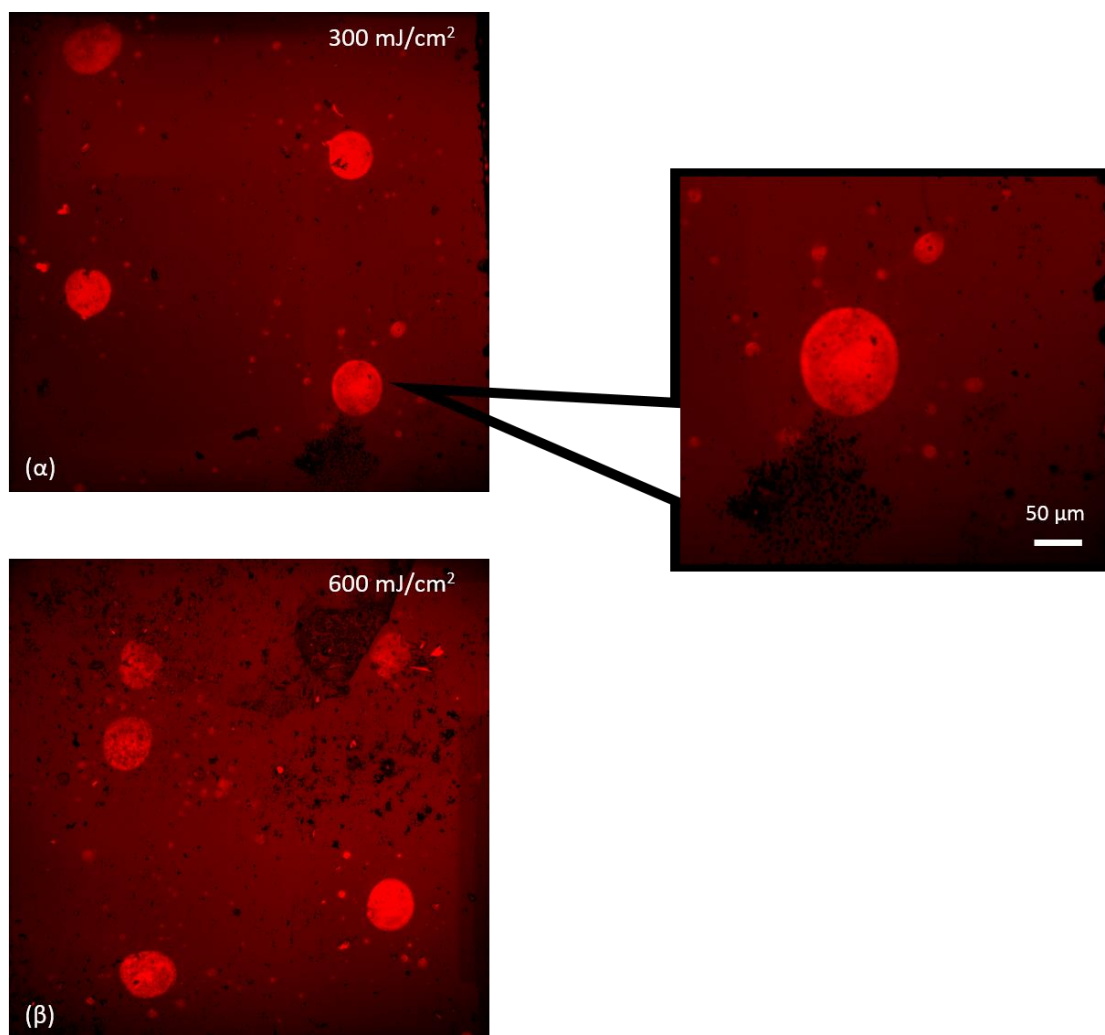


Εικόνα 4.9: (α) Εικόνα φθορισμού των ακινητοποιημένων απταμερών (10 μ L διαλύματος) πάνω στην τροποποιημένη με GOPTS επιφάνειες LTO/SiO₂.

4.3.3 Εναπόθεση aptamers με την τεχνική Laser LIFT.

Η μεταφορά των aptamers στις τροποποιημένες μας επιφάνειες πραγματοποιήθηκε και με την άμεση εκτύπωσή τους με χρήση της τεχνικής LIFT.

Στο στόχο-δότη με DRL στρώμα 40 nm Ti, απλώνουμε 10 μ L από τα aptamers με συγκέντρωση 10 μ M. Η μάσκα που χρησιμοποιήθηκε στην διάταξη ήταν κυκλική, διαμέτρου 50 μ m. Έπειτα από τη διεξαγωγή πολλών πειραμάτων, παρατηρήθηκε ότι οι κατάλληλες πυκνότητες ενέργειας για την άμεση εκτύπωση των aptamers στις τροποποιημένες επιφάνειες είναι οι 300 mJ/cm^2 και 600 mJ/cm^2 . Σε αυτές τις πυκνότητες ενέργειας έχουμε τα καλύτερα εκτυπωμένα spots, με ευδιάκριτα άκρα και χωρίς παράπλευρες απώλειες υλικού (δορυφόρους). Η επαλήθευση της ακινητοποίησης των απταμερών γίνεται και πάλι με το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας το φίλτρο N2.1 (Εικόνα 4.10). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα 1.0 M potassium phosphate buffer pH 7.4. Εν συνεχεία, ξεπλένονται σε διάλυμα 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4. Τέλος, για την αδρανοποίηση των επιφανειών, τα δείγματα τοποθετούνταν σε διάλυμα 1M MCH για 1 ώρα και ακολουθεί ξέπλυμα με διάλυμα 10 mM NaCl σε 5 mM Tris buffer, pH 7.4 και στέγνωμα με αέριο άζωτο.



Εικόνα 4.10: Εικόνες φθορισμού των απταμερών που έχουν εναποτεθεί με την τεχνική LIFT σε 2 διαφορετικές ενέργειες (α) και (β).

Πίνακας Πειραμάτων

Πίνακας 2: Αποτελέσματα πειραμάτων εναντίωσης απταμερών με την τεχνική LIFT

Image Name	Surface	Functionalization of Surface	Aptamers			Ochratoxin A			Fluence (mJ/cm ²)	Objective Lense	Fluorescence Microscope			Confocal Microscope (nm)
			Molar Mass	C [μM]	C [μg/L]	Molar Mass	C [ng/L]	C [nM]			Exp. Time (sec)	Filter	Magnification	
300mJ_cm2_ Direct LIFT	Si ₃ N ₄	-	12423	10	124230	403,81	-	-	300	LMU-15X-266	0,6	N2.1	x10	-
600mJ_cm2_ Direct LIFT	Si ₃ N ₄	-	12423	10	124230	403,81	-	-	600	LMU-15X-266	0,6	N2.1	x10	-
900mJ_cm2_ Direct LIFT	Si ₃ N ₄	-	12423	10	124230	403,81	-	-	900	LMU-15X-266	0,6	N2.1	x10	-
300mJ_cm2_ GOPTS	SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	300	LMU-15X-266	0,6	N2.1	x10	-
600mJ_cm2_ GOPTS	SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	600	LMU-15X-266	0,6	N2.1	x10	-
900mJ_cm2_ GOPTS	SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	900	LMU-15X-266	0,6	N2.1	x10	-



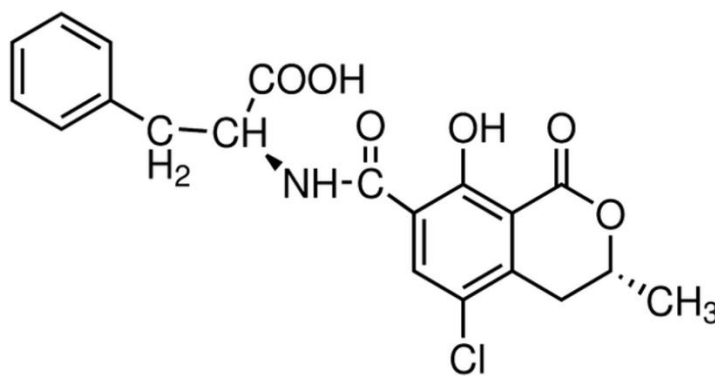
300-600 mJ_cm2_Dire ct LIFTx5_1.2sec	Si ₃ N ₄	-	12423	10	124230	403,81	-	-	300-600	LMU- 15X-266	1,2	N2.1	x5	-
300-600 mJ_cm2_GO PTSx5_0.6s	SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	300-600	LMU- 15X-266	0,6	N2.1	x5	-

Πίνακας 3: Αποτελέσματα πειραμάτων αναπόθεσης απταμερών με πιπέτα

Surface	Functionalization of Surface	Aptamers			Ochratoxin A				Fluorescence Microscope			Confocal Microscope (nm)
		Molar Mass	C [μ M]	C [μ g/L]	Molar Mass	C [ng/L]	C [nM]	Exp. Time (sec)	Filter	Magnification		
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	0,6	N2.1	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	0,6	N2.1	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	50	0,12382	0,6	N2.1	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	50	0,12382	0,6	N2.1	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	0,12	I3	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	-	-	0,12	I3	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	50	0,12382	0,6	I3	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	50	0,12382	0,6	I3	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	50	0,12382	0,12	I3	x10	-	
SiO ₂	GOPTS	12423	10	124230	403,81	50	0,12382	0,12	I3	x10	-	

4.3.4 Ανίχνευση της τοξίνης OTA και *regeneration* του βιο-αισθητήρα.

Το επόμενο και τελευταίο βήμα στην ανάπτυξη του αισθητήρα και στο τελικό συμπέρασμα για το αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην βιομηχανία, είναι η διαδικασία κατά την οποία επαληθεύεται ή όχι, η ικανότητά του να επαναχρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση της τοξίνης σε άλλα δείγματα. Η ανίχνευση της τοξίνης γίνεται με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού. Η συγκεκριμένη τοξίνη (OTA) (**Error! Reference source not found.**) επιδεικνύει φυσικό φθορισμό σε εύρος μηκών κύματος που κυμαίνεται από $\lambda_{det.} = 420 \text{ nm}$ έως 470 nm και με $\lambda_{exc.} = 330 - 340 \text{ nm}$.

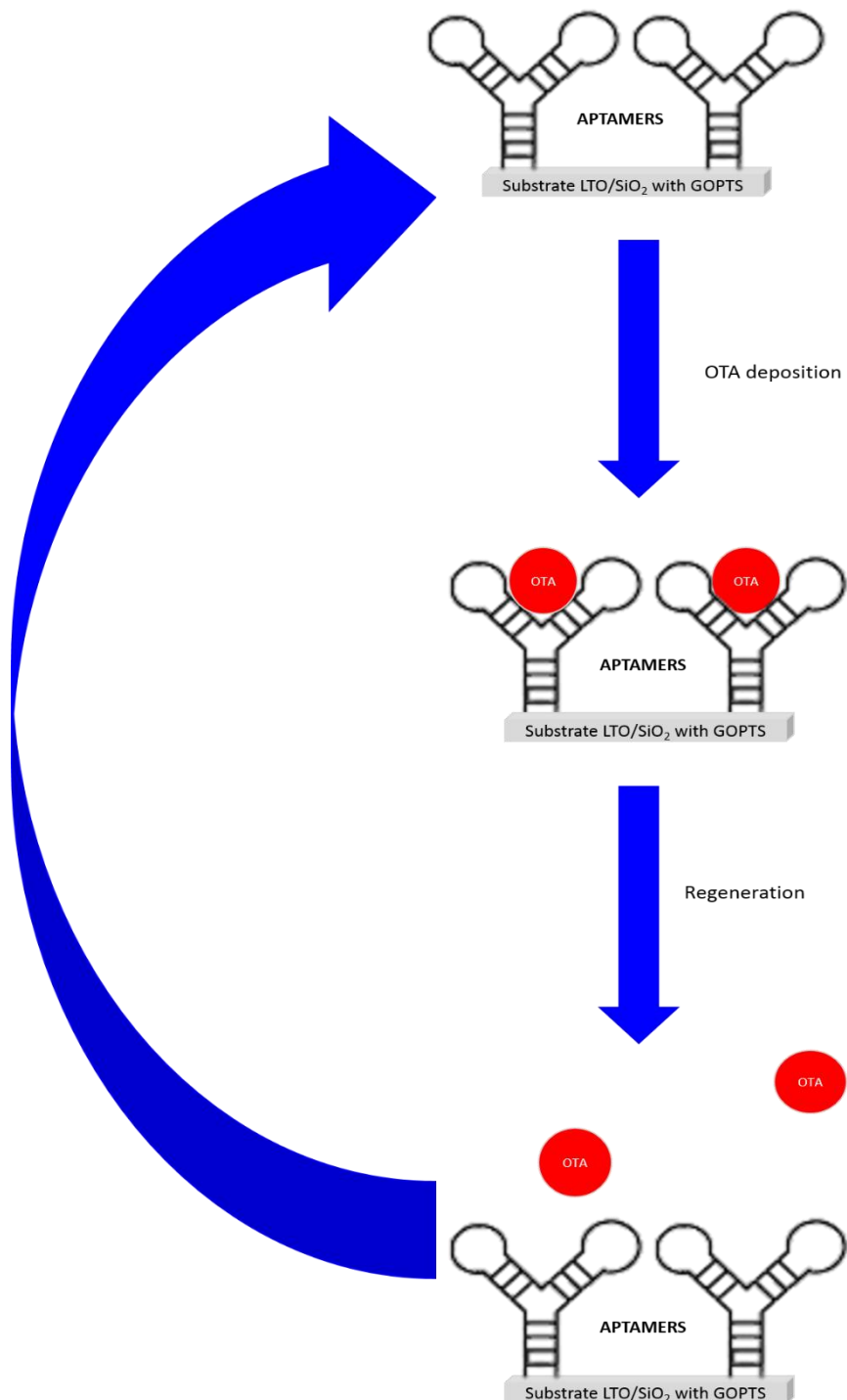


Ochratoxin A (OTA)

Εικόνα 4.11: Αναπαράσταση μορίου τοξίνης (Ochratoxin A – OTA).

Εκμεταλλευόμενοι τον φυσικό φθορισμό της τοξίνης OTA, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης της πρόσδεσης της τοξίνης από τα ακινητοποιημένα απταμερή πάνω στις τροποποιημένες μας επιφάνειες και το κατά πόσον τα ίδια ακινητοποιημένα απταμερή μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για να προσδεθούν εκ νέου με την τοξίνη OTA. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως *regeneration*. Για το σκοπό αυτό οι αισθητήρες (επιφάνειες με ακινητοποιημένα απταμερή) καλύπτονται με μία σταγόνα από το διάλυμα Methanol:Eluting Buffer (10 mM TRIS, 1.0 mM EDTA, pH 9.0) (20:80 %v/v) για 30 sec^{19,20}. Στην συνέχεια ξεπλένονται με το wash buffer (διάλυμα 1.0 M potassium phosphate buffer pH 7.4) που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα βήματα της ανάπτυξης του αισθητήρα και απομένει η επαλήθευση της απομάκρυνσης της τοξίνης από τον αισθητήρα, η οποία πραγματοποιείται με το

οπτικό μικροσκόπιο στο οποίο πλέον δεν είναι εμφανής ο φθορισμός της τοξίνης (Εικόνα 4.12).



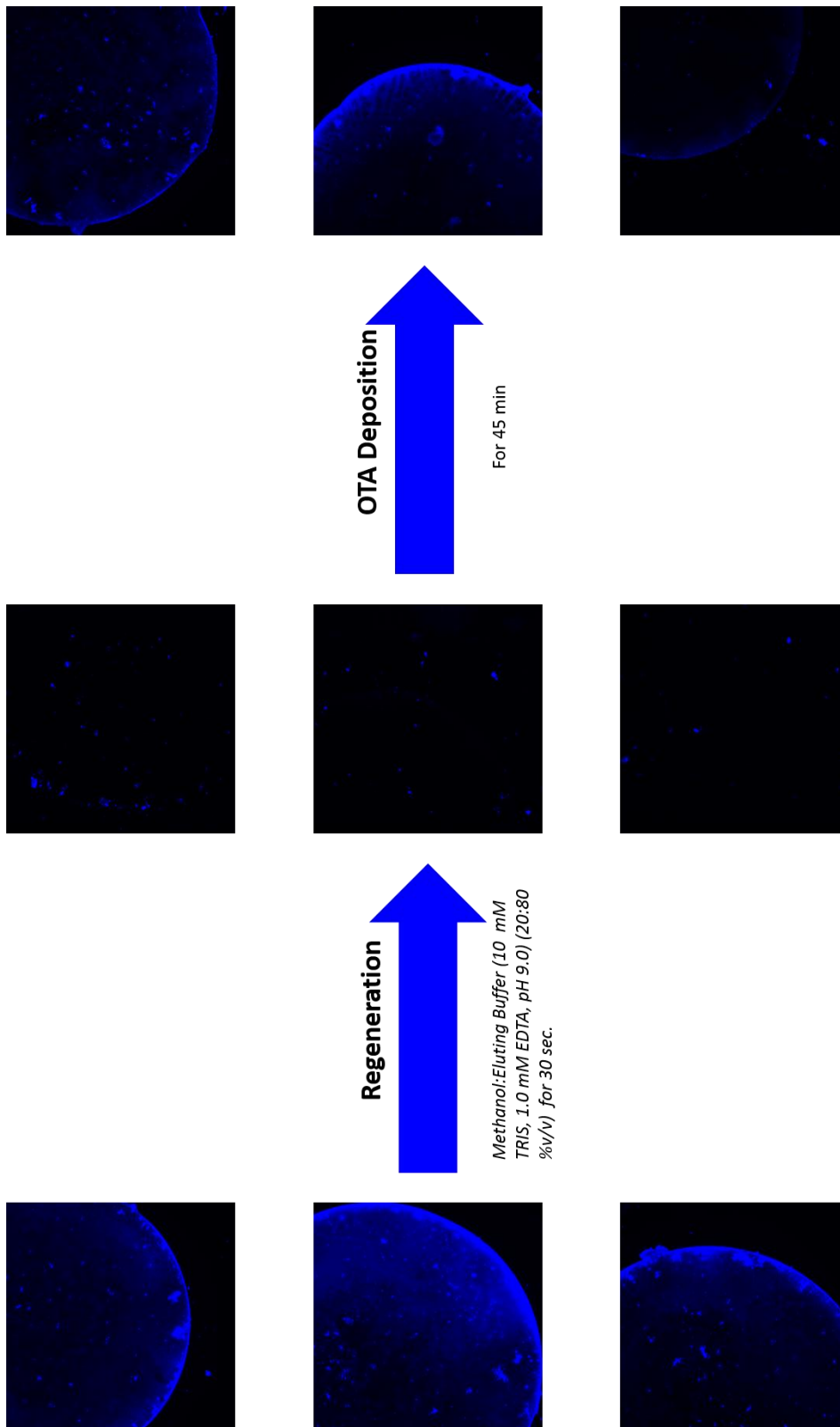
Εικόνα 4.12: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του Regeneration



Έχοντας έτοιμη την τροποποιημένη επιφάνεια LTO/SiO₂ με GOPTS, εναποθέτουμε με πιπέτα τα aptamers σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.3.2. Αφού διαπιστωθεί η ακινητοποίηση των aptamers στο οπτικό μικροσκόπιο ακολουθεί η εναπόθεση της τοξίνης (Ochratoxin A – OTA) με πιπέτα. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση των απταμερών με την τοξίνη χρειάζεται ένα διάστημα 45 min. Έπειτα από αυτό το διάστημα μπορούμε με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου να παρατηρήσουμε αν έχει ανιχνευθεί η τοξίνη από τα ακινητοποιημένα aptamers (**Error! Reference source not found.**).

Ωστόσο, θα πρέπει να επιβεβαιωθεί πως απομακρύνθηκε μόνο η τοξίνη και όχι τα aptamers. Αυτό επιβεβαιώνεται με την εναπόθεση ξανά της τοξίνης στους αισθητήρες και την επιτυχή οπτική καταγραφή του φθορισμού του αισθητήρα (Εικόνα 4.13).

Στη συνέχεια ακολουθεί το ξέπλυμα των δειγμάτων με το διάλυμα του regeneration (*Methanol:Eluting Buffer (10 mM TRIS, 1.0 mM EDTA, pH 9.0) (20:80 %v/v)* για 30 sec) και ακολουθεί η οπτική καταγραφή των δειγμάτων για να διαπιστωθεί η απομάκρυνση της τοξίνης.

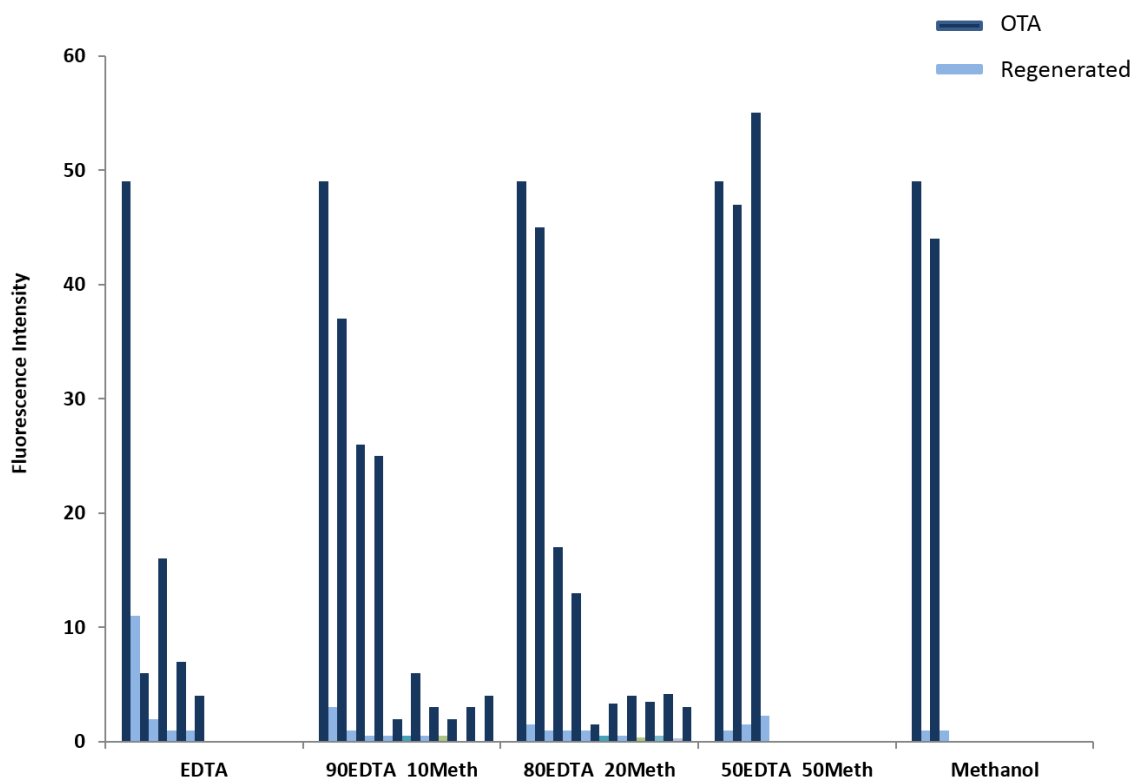


Εικόνα 4.13: Εικόνες ενός κύκλου ζωής του Βιο-αισθητήρα.

Όπως παρατηρούμε και από τις φωτογραφίες στην Εικόνα 4.13 τα απταμερή έχουν ακινητοποιηθεί στις τροποποιημένες μας επιφάνειες επιτυχώς, αλλά έχουν ανιχνεύσει και την τοξίνη η οποία έχει εναποτεθεί στα δείγματά μας.

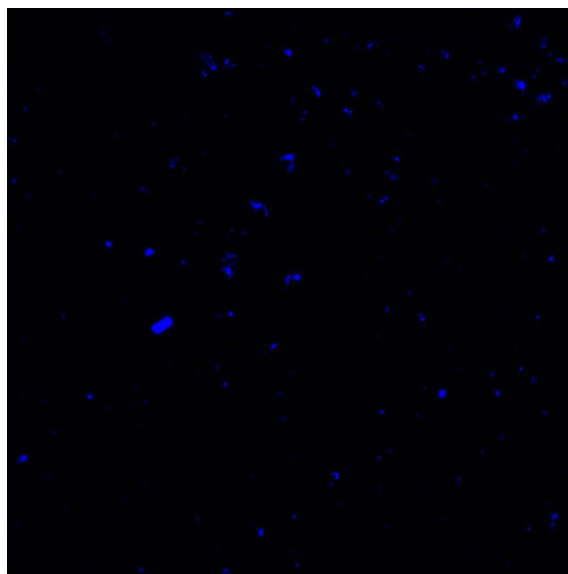
Έτσι ολοκληρώθηκε ένας κύκλος του regeneration. Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλοι κύκλοι, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού μετά από 4ο κύκλο regeneration μειώνεται. Αυτό διαπιστώνεται από το διάγραμμα που ακολουθεί και τη μείωση του σήματος φθορισμού που παρατηρείται.

Το σήμα «OTA» αντιστοιχεί στην ένταση φθορισμού (στη ζώνη φθορισμού της τοξίνης) με την τοξίνη επί του απταμερούς. Το σήμα «Regenerated» αντιστοιχεί στην ένταση φθορισμού (στην ίδια ζώνη) μετά την απομάκρυνση της τοξίνης, και η μη-μηδενική τιμή του δηλώνει ότι ένα μικρό ποσοστό τοξίνης παραμένει στο απταμερές και μετά την αναγέννησή του. Μετά τις διαδοχικές «αναγεννήσεις» παρατηρείται μείωση της έντασης φθορισμού που προκαλεί νέο φορτίο τοξίνης. Η μείωση της ένταξης, εξαρτάται από το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αναγέννηση.



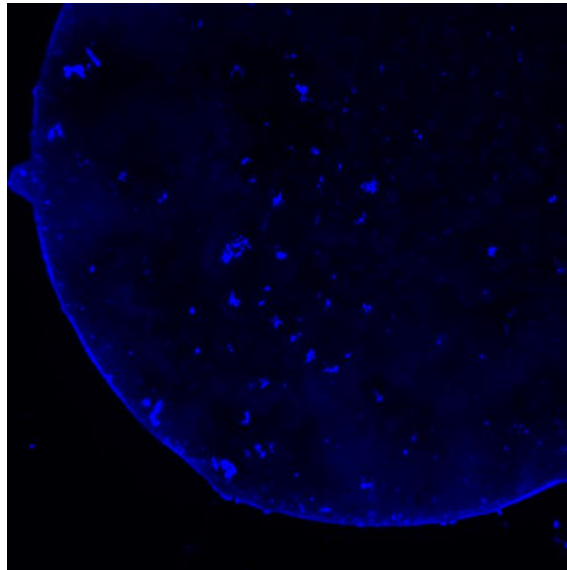
Εικόνα 4.14: Γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού αισθητήρων με 5 διαφορετικά διαλύματα regeneration.

Παρατηρούμε ότι και στα 5 δείγματα στα οποία ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, με διαφορετικά διαλύματα regeneration (Εικόνα 4.14) (άλλαξε το ποσοστό μεταξύ μεθανόλης και EDTA), το σήμα φθορισμού μειώνεται ύστερα από την πραγματοποίηση του regeneration, κάτι το οποίο σημαίνει πως απομακρύνεται επιτυχώς η τοξίνη (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15: Εικόνα από το μικροσκόπιο φθορισμού μετά το regeneration του δείγματος.

Επίσης το σήμα φθορισμού αυξάνεται με την εναπόθεση και πάλι της τοξίνης, επιβεβαιώνοντας ότι κατά την διαδικασία regeneration απομακρύνονται τα μόρια της τοξίνης ενώ τα απταμερή παραμένουν ακινητοποιημένα στην τροποποιημένη μας επιφάνεια (Εικόνα 4.16).



Εικόνα 4.16: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού μετά την εναπόθεση της τοξίνης στο δείγμα για 2^η φορά.

Τέλος, ύστερα από τον 4ο κύκλο regeneration το σήμα πέφτει αισθητά με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να εξάγουμε σωστά συμπεράσματα για την ανίχνευση της τοξίνης από τον αισθητήρα, καθώς το σήμα είναι στα όρια του σφάλματος.

Περαιτέρω πειράματα βρίσκονται υπό εξέλιξη ώστε να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες και τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για το regeneration.

4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Με την πραγματοποίηση επαναλαμβανόμενων πειραμάτων στην εναπόθεση των απταμερών στις τροποποιημένες μας επιφάνειες, δείξαμε την σταθερότητα και την δυνατότητα να τα ανιχνεύσουμε με το μικροσκόπιο φθορισμού. Η ακινητοποίηση των απταμερών είναι πετυχημένη είτε πραγματοποιηθεί με πιπέτα είτε μέσω της τεχνικής άμεσης εκτύπωσης Laser Induced Forward Transfer (LIFT).

Επίσης, με επιτυχία έγινε η εναπόθεση και η ανίχνευση της τοξίνης (Ochratoxin A – OTA) από τα απταμερή, τα οποία είχαν ακινητοποιηθεί στις τροποποιημένες μας επιφάνειες. Τέλος, η διαδικασία του regeneration πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, αν και για λίγους μόνο κύκλους, κάτι το οποίο θα πρέπει να βελτιωθεί και να μπορούν τα δείγματα να χρησιμοποιηθούν για τουλάχιστον 10 κύκλους.

Το επόμενο στάδιο των πειραμάτων θα είναι η εξέταση της ακινητοποίησης των απταμερών σε διαφορετικές επιφάνειες μη τροποποιημένες όπως Si_3N_4 καθώς και σε τροποποιημένες επιφάνειες Si_3N_4 με alkynes. Αν και πραγματοποιήθηκαν ορισμένα πειράματα για αυτές τις επιφάνειες δεν θα παρουσιασθούν στην παρούσα διπλωματική εργασία τα αποτελέσματα λόγω έλλειψης επαρκούς αριθμού πειραμάτων για την εξαγωγή σωστών συμπερασμάτων.

Εφόσον ο αισθητήρας αναπτυχθεί σωστά και είναι ανιχνεύσιμη η τοξίνη με τη χρήση ενός μικροσκοπίου φθορισμού, θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιο-αισθητήρα τουλάχιστον 10 φορές για να μπορέσει να θεωρηθεί πετυχημένος και να έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί στην βιομηχανία.

4.5 ΠΑΤΕΝΤΕΣ

Biological Platforms

1. Method of immobilizing nucleic acid aptamers

Αρ. Πατέντας: [WO 2005080592 A1](#)

Εφευρέτες: John D Brennan, Yingfu Li, Razvan Nutiu, Nicholas Rupcich

Ημ/νία δημοσίευσης 1 Σεπτεμβρίου 2005

Ημ/νία κατάθεσης 21 Φεβρουαρίου 2005

<http://www.google.com/patents/WO2005080592A1?cl=en>

The present invention relates to methods of immobilizing nucleic acid aptamers within a sol-gel matrix. The aptamer system remains functionally intact when it is immobilized within a protein and membrane-compatible sol-gel derived from polyol silane precursors or sodium silicate. Method of immobilizing nucleic acid aptamers.

2. Aptamers

Αρ. Πατέντας: [WO 2013064818 A1](#)

Εφευρέτες: Riikka KÄRKKÄINEN, Mette Ryun DRASBEK, Niall W. G. YOUNG, Graham A. BONWICK, Christopher Smith

Ημ/νία δημοσίευσης 10 Μαΐου 2013

Ημ/νία κατάθεσης 31 Οκτωβρίου 2012

http://www.google.com/patents/WO2013064818A1?cl=en&dq=WO+2013064818+A1&hl=el&sa=X&ei=DY0FVMLKJ4K_yqPPq4D4BQ&ved=0CB4Q6AEwAA

A nucleic acid aptamer comprising the nucleotide sequence shown herein as SEQ ID No. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 2, 3 or 4 or a fragment thereof or a sequence which is at least 80% identical therewith and use of nucleic aptamers to detect the presence of pathogenic bacteria in a sample, particularly in a complex matrix - such as a food system.



3. And a wavelength shift detector; coated with a biological or recognition element which binds preferentially with a target analyte; recognition element and the target analyte adhere to the sidewall surface of laser and increase the effective diameter of the laser which shifts output wavelength

Αρ. Πατέντας: **US 20060046312 A1**

Εφευρέτες: Peter Kiesel, Noble Johnson, Meng Lean, H. Hsieh, Michael Kneissl

Ημ/νία δημοσίευσης 2 Μαρτίου 2006

Ημ/νία κατάθεσης 2 Σεπτεμβρίου 2004

<https://www.google.com/patents/US20060046312?dq=US+20060046312+A1&hl=el&sa=X&ei=RY0FVOOoO8LuyQP6yYGICA&ved=0CB4Q6AEwAA>

A compact sensor for detecting the presence of biological or chemical species includes a microdisk laser and a wavelength shift detector. The microdisk laser is coated with a biological or chemical recognition element, which binds preferentially with a target analyte. Because the recognition element and the target analyte adhere to the sidewall surface of the microdisk laser, they increase the effective diameter of the laser, which shifts the output wavelength by a detectable amount. The presence of a wavelength shift indicates the presence of the target analyte, and the magnitude of the wavelength shift corresponds to the mass load of the target analyte on the sidewall surface of the microdisk laser and a wavelength shift detector; coated with a biological or recognition element which binds preferentially with a target analyte; recognition element and the target analyte adhere to the sidewall surface of laser and increase the effective diameter of the laser which shifts output wavelength.

4 Nucleic acid biosensors

Αρ. Πατέντας: **WO 2004081235 A1**

Εφευρέτες: Juewen Liu, Yi Lu

Ημ/νία δημοσίευσης 23 Σεπτεμβρίου 2004

Ημ/νία κατάθεσης 2 Φεβρουαρίου 2004

https://www.google.com/patents/WO2004081235A1?cl=en&dq=WO+2004081235+A1&hl=el&sa=X&ei=Xo0FVPMsqZ_KA7flgoAG&ved=0CB4Q6AEwAA



Sensors comprising aptazymes capable of detecting the presence and concentration of effectors, as well as methods of using such sensors, are disclosed.

5. Chemically modified aptamers with improved off-rates

Αρ. Πατέντας: [EP 2489743 A2](#)

Εφευρέτες: Dominic Zichi, Sheri K. Wilcox, Chris Bock, Daniel J. Schneider, Bruce Eaton, Larry Gold

Ημ/νία δημοσίευσης 22 Αυγούστου 2012

Ημ/νία κατάθεσης 17 Ιουλίου 2008

<https://www.google.com/patents/EP2489743A3?cl=en&dq=EP+2489743+A2&hl=el&sa=X&ei=eY0FVJXIB-jNygPdtYC4Ag&ved=0CB4Q6AEwAA>

The present disclosure describes improved SELEX methods for producing aptamers that are capable of binding to target molecules and improved photoSELEX methods for producing photo reactive aptamers that are capable of both binding and covalently cross linking to target molecules. Specifically, the present disclosure describes methods for producing aptamers and photoaptamers having slower dissociation rate constants than are obtained using prior SELEX and photoSELEX methods. The disclosure further describes aptamers and photoaptamers having slower dissociation rate constants than those obtained using prior methods. In addition, the disclosure describes aptamer constructs that include a variety of functionalities, including a cleavable element, a detection element, and a capture or immobilization element.



6 Method of mycotoxin detection

Αρ. Πατέντας: [WO 2009086621 A1](#)

Εφευρέτες: [Gregory Allen Penner, Jorge Andres Cruz](#)

Ημ/νία δημοσίευσης 16 Ιουλίου 2009

Ημ/νία κατάθεσης 9 Ιανουαρίου 2009

<https://www.google.com/patents/WO2009086621A1?hl=en&dq=EP+2242761+A1&ei=II0FVLSWLYbuyQOQ0ILICg&cl=en>

The presence of mycotoxins in agricultural products necessitates large scale testing of a wide range of sample material to ensure the safety of food and feed. The mycotoxin Ochratoxin A represents an enablement for all mycotoxins as the level of sensitivity necessary for regulatory requirements for this compound at the part per billion level are as low or lower than any other mycotoxin. This invention describes the identification of a set of DNA ligands with sufficiently high binding affinity and specificity for Ochratoxin A to enable an improvement over existing methods for the separation, concentration and quantitative determination of Ochratoxin A in sample material.

7 Systems and methods pf removing and managing heavy metals

Αρ. Πατέντας: [US 8178306 B2](#)

Εφευρέτες: [Anne Schwartz](#)

Ημ/νία δημοσίευσης 15 Μαΐου 2012

Ημ/νία κατάθεσης 6 Ιουνίου 2008

<https://www.google.com/patents/US8178306?dq=US+8178306+B2&hl=en&sa=X&ei=H44FVJXaJ-fmyQPLk4CQDw&ved=0CB4Q6AEwAA>

Systems and methods remove and manage heavy metals. In one implementation, an exemplary method can be applied to food processing and food consumption to remove heavy metals such as mercury, lead, uranium and cadmium before absorption by a living organism. The exemplary method exposes the food to a heavy-metal binding ligand, such as a concentrated protein or phytic acid, to form a heavy-metal chelate, and then allows the chelate to separate from the food. In another implementation, an exemplary probe possesses innovative molecular layers on its surface to detect and quantify heavy metals by attracting and binding traces of the heavy metals on a ligand layer.



8 Sensors for detecting heavy metals

Αρ. Πατέντας: [WO 2013141692 A1](#)

Εφευρέτες: Rais Ahmad MOHD, Azera Tuhaime NUR

Ημ/νία δημοσίευσης 26 Σεπτεμβρίου 2013

Ημ/νία κατάθεσης 18 Μαρτίου 2013

<https://www.google.com/patents/WO2013141692A1?cl=en&dq=WO+2013141692+A1&hl=el&sa=X&ei=O44FVI25COXlyAOqk4KYAQ&ved=OCB4Q6AEwAA>

Selective lead (II) ion sensor without using reference electrode is used to monitor industrial discharge and quality of water in the rivers, especially those used to supply fresh water for daily use. The lead sensor of the present invention comprises multiple narrow and elongated channels filled with lead recognizing molecule, immobilized by low impedance polymeric binder. The sensing channel is sandwiched between at least to electrodes to measure the current and conductance across the channel. The baseline conductance of the channel is adjusted using conductive particles such as carbon nanotubes and platinum nanoparticles. The detection limit and linear range of the lead sensor can be optimized by changing the composition of the main components; lead ionophore, low impedance binder and conductive filler. The presence of trace amount of lead ion can be detected from the change in the conductivity across the channel. The presence of lead ions linearly increases the conductivity of the sensing channel.



9 Detection method of electrochemical sensor to micro Ochratoxin A

Αρ. Πατέντας: [CN 101699277 B](#)

Εφευρέτες: [刘丽强, 彭池方, 胥传来, 许定花, 金征宇, 陈伟](#)

Ημ/νία δημοσίευσης 5 Σεπτεμβρίου 2012

Ημ/νία κατάθεσης 21 Οκτωβρίου 2009

https://www.google.com/patents/CN101699277B?cl=en&dq=CN+101699277+B&hl=el&sa=X&ei=pY4FVOuIHITMyAP4_oGADg&ved=0CB4Q6AEwAA

The invention relates to a detection method of an electrochemical sensor to micro ochratoxin A, belonging to the technical field of the electrochemical sensor; in the invention, a wave carbon electrode is modified to be an adaptor electrochemical sensor to detect Ochratoxin A standard substance, so as to build a standard curve and achieve the purpose of quantitative detection to a sample containing the Ochratoxin A; the invention aims at providing an electrochemical sensor based on the adaptor, a single-stranded DNA is modified on the surface of the wave carbon electrode, and the single-stranded DNA modified by aptamer and gold nano particles is modified to the surface of the electrode by base pairing, so as to build standard curve of quantitative detection to the Ochratoxin A; the quantitative detection method of the Ochratoxin A has high sensitivity and strong operability.

10. Monoclonal antibody specific to Ochratoxin A

Αρ. Πατέντας: [US 8003766 B2](#)

Εφευρέτες: [Feng-Yih Yu](#)

Ημ/νία δημοσίευσης 23 Αυγούστου 2011

Ημ/νία κατάθεσης 17 Απριλίου 2009

https://www.google.com/patents/US8003766?dq=US+8003766+B2&hl=el&sa=X&ei=OY8FVO_0C8bRywOZvYcGdW&ved=0CB4Q6AEwAA

This invention provides a monoclonal antibody specific to ochratoxin A and methods of assaying the level of Ochratoxin A in food and feed.



11. Ochratoxin A detection kit

Αρ. Πατέντας: [CN 103134922 A](#)

Εφευρέτες: [赵春城, 赵黎明, 王晓东, 单金莲, 钱汝文](#)

Ημ/νία δημοσίευσης 5 Ιουνίου 2013

Ημ/νία κατάθεσης 26 Νοεμβρίου 2011

<https://www.google.com/patents/CN103134922A?cl=en&dq=CN+103134922+A&hl=el&sa=X&ei=T48FVPvWH4rXyQOYsYCAAw&ved=0CB4Q6AEwAA>

The invention relates to an Ochratoxin A detection kit, and belongs to the technical field of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), wherein the ochratoxin A detection kit is used for detecting Ochratoxin A (short for OTA) content in grains, feeds and food. The Ochratoxin A detection kit comprises a box body, a 24-cell OTA coated reaction plate inside the box, a reaction cover plate, 14 bottles of reagents, concave bottle positions for placing the reagents, an ice bag, a frame, an instruction manual, a packet of water absorption paper, two disposable droppers and a quality detection report. The Ochratoxin A detection kit is characterized in that the coated reaction plate adopts a 24-well reagent plate as a solid phase carrier, and the 14 bottles of the reagents comprise 6 bottles of OTA standard substance solutions, enzyme labeled second antibody, OTA antibody, an antibody dilution buffer solution, a sample dilution solution, a concentration washing solution, a substrate solution, a coloration solution and a termination solution, and the number of the concave bottle positions is 16. The kit has characteristics of simple structure, easy use, low price, and high sensitivity, wherein the sensitivity can be more than 0.1 ng/ml.



ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- ¹ NCSR-IMEL / LoC, **“Τεχνικές Προδιαγραφές Βιοαισθητήρων”**, 1–149 (2010).
- ² A. Piqué, D. B. Chrisey, **“Direct-Write Technologies for Rapid Prototyping Applications: Sensors, Electronics, and integrated Power Sources”**, Academic Press, San Diego, CA, 1–551 (2002).
- ³ K. K. B. Hon, L. Li, I. M. Hutchings, **“Direct writing technology—advances and developments”**, CIRP Annals - Manufacturing Technology, **57**, 601–620 (2008).
- ⁴ D. Wallace, D. Hayes, T. Chen, V. Shah, D. Radulescu, P. Cooley, K. Wachtler, A. Nallani, **“Ink-jet as a MEMS Manufacturing Tool”**, Proceedings of the SMTA Pan Pacific Microelectronics Symposium, Hawaii, 1–9(2006).
- ⁵ B. King, M. Renn, **“Aerosol Jet Direct Write Printing for Mil-Aero Electronic Applications”**, 1–6, <http://www.optomec.com/> (2008).
- ⁶ B. E. Kahn, **“The M³D Aerosol Jet System, an Alternative to Inkjet Printing for Printed Electronics”**, Organic and Printed Electronics, **1**, 14–17 (2007).
- ⁷ [http://www.micropen.com /](http://www.micropen.com/).
- ⁸ B. Li, P. A. Clark, K. H. Church, **“Robust Direct-Write Dispensing Tool and Solutions for Micro/Meso-Scale Manufacturing and Packaging”**, Proceedings of the ASME International Manufacturing Science and Engineering Conference, Atlanta, Georgia, 1–7 (2007).
- ⁹ R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, **“‘Dip-Pen’ Nanolithography”**, Science, **283**, 661–663 (1999).
- ¹⁰ P. E Sheehan, W. P. King, A. R. Laracuente, M. Yang, L. J. Whitman, **“Thermal Dip Pen Nanolithography”**, NRL Review Chemical/Biochemical Research, 1–2 (2006).
- ¹¹ F. Huo, Z. Zheng, et al, **“Polymer Pen Lithography”**, Science, **321**, 1658–1660 (2008).
- ¹² K. Williams, J. Maxwell, K. Larsson, M. Boman, **“Freeform Fabrication of Functional Microsolenoids, Electromagnets and Helical Springs Using High-pressure Laser Chemical Vapor Deposition”**, Proceedings of the 12th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Orlando, Florida, 232–237 (1999).
- ¹³ R. J. von Gutfeld, L. T. Romankiw, R. E. Acosta, **“Laser-Enhanced Plating and Etching: Mechanisms and Applications”**, IBM Journal of Research and Development, **26**, 136–144 (1982).
- ¹⁴ A. Piqué, D. B. Chrisey, R. C. Y. Auyeung, J. Fitz-Gerald, H. D. Wu, R. A. McGill, S. Lakeou, P. K. Wu, V. Nguyen, M. Duignan, **“A novel Laser Transfer Process for Direct Writing of Electronic and Sensor Materials”**, Applied Physics A: Materials Science & Processing, **69**, S279-S284 (1999).

- ¹⁵ M. Colina, P. Serra, J. M. Fernández-Pradas, L. Sevilla, J. L. Morenza, **“DNA Deposition through Laser Induced Forward Transfer”**, *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1638–1642 (2005).
- ¹⁶ M. Chatzipetrou, G. Tsekenis, V. Tsouti, S. Chatzandroulis, D. Thanos, I. Zergioti, **“Direct laser printing of oligonucleotides for the fabrication of a label-free biosensor”**, *Procedia Engineering*, **25**, 851–855 (2011).
- ¹⁷ Χ. Μπουτόπουλος, **“Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας Λείζερ και Οργανικών Υλικών με Εφαρμογές σε Μικρο – αισθητήρες”**, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Αθήνα (2011).
- ¹⁸ Μ. Χατζηπέτρου, **“Ενεργοποίηση βιοαισθητήρων και εκτύπωση βιολογικού υλικού με laser”**, Μεταπτυχιακή Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Αθήνα (2010).
- ¹⁹ Akhtar Hayat, Audrey Sassolas, Jean-Louis Marty, Abd-Elgawad Radi, **“Highly sensitive Ochratoxin A impedimetric aptasensor based on the immobilization of azido-aptamer onto electrografted binary film via click chemistry”**, *Talanta*, **103**, 14–19 (2013).
- ²⁰ Annalisa De Girolamo, Maureen McKeague, J. David Miller, Maria C. DeRosa, Angelo Visconti, **“Determination of Ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column”**, *Food Chemistry*, **127**, 1378–1384 (2011).
- ²¹ Y. Zhang, C. Liu, D. Whalley, **“Direct-write Techniques for Maskless Production of Microelectronics: A Review of Current State-of-the-art Technologies”**, *International Conference on Electronic Packaging Technology & High Density Packaging*, 497–503 (2009).
- ²² E. D. Williams, R. U. Ayres, M. Heller, **“The 1.7 Kilogram Microchip: Energy and Material Use in the Production of Semiconductor Devices”**, *Environmental Science and Technology*, **36**, 5504–5510 (2002).
- ²³ M. Mantysalo, P. Mansikkamaki, J. Miettinen, K. Kaija, S. Pienimaa, R. Ronkka, K. Hashizume, A. Kamigori, Y. Matsuba, K. Oyama, N. Terada, H. Saito, M. Kuchiki, M. Tsubouchi, **“Evaluation of Inkjet Technology for Electronic Packaging and System Integration”**, *Proceedings of the 57th IEEE Electronic Components and Technology Conference*, Reno, Nevada, 89–94 (2007).
- ²⁴ A. Piqué, D. B. Chrisey, **“Direct-Write Technologies for Rapid Prototyping Applications: Sensors, Electronics, and integrated Power Sources”**, Academic Press, San Diego, CA, 1–551 (2002).
- ²⁵ J. A. Lewis, G. M. Gratson, **“Direct Writing in Three Dimensions”**, *Materials Today*, **7**, 32–39 (2004).
- ²⁶ C. J. Robinson, B. Stucker, A. J. Lopes, R. Wicker, J. A. Palmer, **“Integration of Direct-Write (DW) and Ultrasonic Consolidation (UC) Technologies to Create Advanced**

Structures with Embedded Electrical Circuitry", Proceedings of the 17th Solid Freeform Fabrication Symposium, Austin, TX, 60–69 (2006).

²⁷ B. King, M. Renn, "**Aerosol Jet Direct Write Printing for Mil-Aero Electronic Applications**", 1–6, <http://www.optomec.com/> (2008).

²⁸ R. J. von Gutfeld, E. E. Tynan, R. L. Melcher, S. E. Blum, "**Laser Enhanced Electroplating and Maskless Pattern Generation**", Applied Physics Letters, **35**, 651–653 (1979).

²⁹ D. Kim, S. Jeong, B. K. Park, J. Moon, "**Direct Writing of Silver Conductive Patterns: Improvement of Film Morphology and Conductance by Controlling Solvent Compositions**", Applied Physics Letters, **89**, 264101–264103 (2006).

³⁰ I. K. Shim, Y. I. Lee, K. J. Lee, J. Joung, "**An Organometallic Route to Highly Monodispersed Silver Nanoparticles and Their Application to Ink-Jet Printing**", Materials Chemistry and Physics, **110**, 316–321 (2008).

³¹ W. A. Tolbert, I.-Y. S. Lee, M. M. Doxtader, E. W. Ellis, D. D. Dlott, "**High-speed color imaging by laser ablation transfer with a dynamic release layer: fundamental mechanisms**", Journal of Imaging Science and Technology, **37**, 411–421 (1993).

³² M. Colina, P. Serra, J. M. Fernández–Pradas, L. Sevilla, J. L. Morenza, "**DNA deposition through laser induced forward transfer**", Biosensors and Bioelectronics, **20**, 1638–1642 (2005).

³³ M. Duocastella, J. M. Fernández–Pradas, J. L. Morenza, P. Serra, "**Time-resolved imaging of the laser forward transfer of liquids**", Journal of Applied Physics, **106**, 084907-1–084907-7 (2009).

³⁴ M. Gruene, C. Unger, L. Koch, A. Deiwick, B. Chichkov, "**Dispensing pico to nanolitre of a natural hydrogel by laser-assisted bioprinting**", Biomedical Engineering Online, **10**, 1–11 (2011).

³⁵ J. A. Barron, H. D. Young, D. D. Dlott, M. M. Darfler, D. B. Krizman, B. R. Ringeisen, "**Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid jetting mechanism**", Proteomics, **5**, 4138–4144 (2005).

³⁶ D. Young, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, D. B. Chrisey, D. D. Dlott, "**Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy**", Applied Surface Science, **197–198**, 181–187 (2002).

³⁷ A. Pearson, E. Cox, J. R. Blake, S. R. Otto, "**Bubble interactions near a free surface**", Engineering Analysis with Boundary Elements, **28**, 295–313 (2004).

³⁸ M. V. Shugaev, N. M. Bulgakova, "**Thermodynamic and stress analysis of laser-induced forward transfer of metals**", Applied Physics A: Materials Science & Processing, **101**, 103–109 (2010).

³⁹ D. A. Willis, V. Grosu, "**The effect of melting-induced volumetric expansion on initiation of laser-induced forward transfer**", Applied Surface Science, **253**, 4759–4763 (2007).



- ⁴⁰ C. Mézel, L. Hallo, A. Souquet, J. Breil, D. Hébert, F. Guillemot, “**Self-consistent modeling of jet formation process in the nanosecond laser pulse regime**”, *Physics of Plasmas*, **16**, 123112-1–123112-12 (2009).
- ⁴¹ A. Prosperetti, “**A generalization of the Rayleigh–Plesset equation of bubble dynamics**”, *Physics of Fluids*, **25**, 409–410 (1982).
- ⁴² L. Xiu–Mei, H. Jie, L. Jian, N. Xiao–Wu, “**Growth and collapse of laser-induced bubbles in glycerol–water mixtures**”, *Chinese Physics B*, **17**, 2574–2579 (2008).