



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Ηλεκτρικός Χαρακτηρισμός Βιοαισθητήρων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΒΟΥΤΥΡΑΣ

Επιβλέπων: Δημήτριος Τσουκαλάς

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβριος 2014



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Ηλεκτρικός Χαρακτηρισμός Βιοαισθητήρων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΒΟΥΤΥΡΑΣ

Επιβλέπων: Δημήτριος Τσουκαλάς

Καθηγητής ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 3^η Οκτωβρίου 2014.

.....

Δ. Τσουκαλάς

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....

Ι. Ζεργιώτη

Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

.....

Α. Γεωργακίλας

Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβριος 2014

.....

Κωσταντίνος Ν. Βουτυράς

Διπλωματούχος Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών
Επιστημών Ε.Μ.Π.

Copyright ©

Κωνσταντίνος Ν. Βουτυράς

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε χρήση συστοιχιών αισθητήρων ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων χρυσού με δίκτυα αυτοοργανωμένων νανοσωματιδίων πλατίνας. Οι συστοιχίες αισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της υβριδοποίησης προτύπων κλώνων βιολογικού υλικού μήκους 15 αζωτούχων βάσεων μέσω αλλαγής στην αντίσταση υπό συνθήκες συνεχούς ρεύματος. Η εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη. Στα δύο πρώτα κεφάλαια γίνεται αναφορά και κριτική στα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας όπου χρησιμοποιήθηκαν παρόμοιες τεχνικές για την ανίχνευση βιολογικού υλικού. Στα δύο τελευταία κεφάλαια γίνεται λεπτομερής αναφορά της κατασκευαστικής διαδικασίας και της πειραματικής μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε. Το τελευταίο κεφάλαιο γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων και επεξήγηση των πειραματικών παραμέτρων που υπεισέρχονται στα εν λόγω πειράματα. Επίσης, γίνεται συζήτηση για τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν οι συστοιχίες για τη χρήση του ως βιοαισθητήρες. Με την παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η ανίχνευση βιολογικού υλικού συγκεντρώσεων έως 1 μM .

Λέξεις Κλειδιά

Αισθητήρας, συστοιχία, βιοαισθητήρας, χρυσός, ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια, πλατίνα, νανοσωματίδια πλατίνας, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, ρυθμιστικός διαλύτης, υβριδοποίηση, ανίχνευση υβριδοποίησης, μετρήσεις πραγματικού χρόνου, μικροσυστήματα.

Abstract

In this dissertation the detection of the hybridization of oligomers with length of 15 nitrogenous bases by means of direct current electrical characterization is discussed. The hybridization was monitored by sensor arrays with gold interdigitated electrodes containing self – organized platinum nanoparticles. In the first two chapters of this dissertation the relevant bibliography is being presented and the experimental methods and results are criticized. In the third chapter are explained the constructed experimental apparatus, the experimental procedure and the statistical data manipulation. In the fourth chapter the experimental data are presented and a detailed discussion about the factors that appear during the experiments is produced. In this dissertation the detection of 1 μM concentration of oligomers was achieved.

Keywords

Sensor array, Biosensor, gold, interdigitated electrodes, platinum, platinum nanoparticles, Deoxyribonucleic acid, hybridization detection, phosphate buffer, real – time measurement, microsystems.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους που σε μόνιμη ή μη βάση συντέλεσαν στην περάτωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Η συμβολή τους στην εκπόνηση αυτής της μελέτης ήταν ύψιστης σημασίας.

Αρχικά οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντά μου Καθηγητή κ. Δημήτρη Τσουκαλά για την ευγένεια, την υπομονή του και την προσεκτική καθοδήγησή του, από την αρχή έως τώρα. Οι παρεμβάσεις του, όταν αυτές χρειάζονταν, εκτός από καίριες ήταν τουλάχιστον αγχολυτικές. Τον μεταδιδάκτορα κ. Ευάγγελο Σκοτάδη για τη μεταλαμπάδευση των όλων απαιτούμενων γνώσεων και την υποστήριξη. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ.κ. Λεωνίδα Μαδιανό και κ. Μαριάνθη Παναγοπούλου για το χαμόγελο, τη συνεργασία, τις δημιουργικές συζητήσεις και την ψυχολογική υποστήριξη στις δύσκολες ημέρες. Από καρδιάς ευχαριστώ τον υπ. Διδάκτορα Σπύρο Σταθόπουλο για τη συνεχή και πρόθυμη παρουσία του στα τεχνικά κωλύματα, στις ιδέες και την υπομονή του στις συνεχείς ερωτήσεις μου. Στα υπόλοιπα παιδιά της ομάδας: τον υποψ. διδάκτορα κ. Παναγιώτη Μπούσουλα, τον κ. Δημήτρη Τσιαλούκη, τη Σόνια και τον Παναγιώτη για τις ωραίες στιγμές εντός και εκτός του εργαστηρίου. Τους κ. Χρήστο Γεμενετζή, κ. Δημήτρη Γουστουρίδη, τον μεταδιδάκτορα κ. Μπρούτα Παναγιώτη, τον κ. Αθανάσιο Μποτσιαλά και τον κ. Σταμάτη Γκιώνη για τις χρήσιμες συμβουλές στην κατασκευή των διατάξεων. Ιδιαίτερα χωρίς τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε αλλά και την καθοδήγησή του τελευταίου, πολλά από τα τεχνικά προβλήματα που παρουσιάστηκαν κατά την κατασκευή των διατάξεων δεν θα επιλύονταν εύκολα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα κ. Γιώργο Τσέκενη και την υποψ. Διδάκτορα κ. Μαριαννέζα Χατζηπέτρου για τη στήριξη τους με υλικοτεχνική υποδομή και πάνω από όλα για την υπομονή τους στις επίμονες ερωτήσεις μου.

Ευχαριστώ την Εύα για τη χαρά που μου προσέφερε η παρουσία της, για τις πολύτιμες συζητήσεις πάνω στη μεθοδολογία καθώς και για την επιμονή της στην ανασκόπηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου που με στήριξαν χωρίς αντίλογο όλα αυτά τα χρόνια που υπήρξα προπτυχιακός φοιτητής. Αναμφίβολα όλη η προσπάθεια αφιερώνεται σε αυτούς...

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Λέξεις Κλειδιά.....	5
Abstract	5
Keywords.....	6
Ευχαριστίες	7
Πίνακας Εικόνων.....	11
Πίνακας Πινάκων	15
Κεφάλαιο 1.....	17
Εισαγωγή.....	17
1.1 Σκοπός της Εργασίας	17
1.2 Σμίκρυνση των Διαστάσεων, Μικροηλεκτρονική, Μικροσυστήματα, Νανοτεχνολογία	17
1.3 Μικροσυστήματα	18
1.4 Νανοεπιστήμη – Νανοτεχνολογία	19
1.5 Αισθητήρες	19
Κεφάλαιο 2.....	22
Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	22
2.1 Βασικές αρχές και φυσική πίσω από την αγωγιμότητα του DNA Προτεινόμενοι μηχανισμοί αγωγιμότητας του DNA.....	22
2.1.1 Υπερανταλλαγή	23
2.1.2 Φαινόμενο σήραγγας – Πολλαπλά Φράγματα Δυναμικού – Συντονισμός (Resonant Tunneling).....	24
2.1.3 Θερμικά ενεργοποιούμενα άλματα φορτίου	25
2.1.4 Διάδοση πολaronίων με την υποβοήθηση φωνονίων	27
2.2 Μεθοδολογία για την ανίχνευση της υβριδοποίησης μέσω ηλεκτρικών μεθόδων.....	28
2.2.1 Αισθητήρες τύπου Αντίστασης	30
2.2.2 Αισθητήρες Ηλεκτροχημικής Φασματοσκοπίας Εμπέδησης.....	39
2.2.3 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες	44
2.2.4 Συμπεράσματα	47
Κεφάλαιο 3.....	51
Μεθοδολογία	51
3.1 Κατασκευή αισθητήρων πυριτίου	51

3.1.1 Κατασκευή των αισθήρων ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων	52
3.2 Παραγωγή Νανοσωματιδίων Πλατίνας	54
3.2.1 Σύνθεση νανοσωματιδίων	55
3.2.2 Ρυθμός σύνθεσης	55
3.2.3 Καθορισμός μεγέθους νανοσωματιδίων	56
3.2.4 Πάχος υμενίου νανοσωματιδίων	56
3.2.5 Χαρακτηρισμός αισθητήρα - υμενίου νανοσωματιδίων	57
3.2.6 Σχόλια – Καταλληλότητα δειγμάτων	57
3.3 Ακινητοποίηση Βιολογικού υλικού – Πρωτόκολλο.....	58
3.3.1 Laser Induced Forward Transfer – LIFT	60
3.3.2 Εκτυπωτής Ψεκασμού Μελάνης - Ink Jet Printer.....	60
3.3.3 Εναπόθεση με πιπέτα.....	60
3.3.4 Σύγκριση μεταξύ των τεχνικών	61
3.3.5 Διαδικασία απομάκρυνσης μη συνδεδεμένων και χαλαρά συνδεδεμένων ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια.....	61
3.4 Πειραματική διάταξη	63
3.4.1 Keithley 2400 Multimeter	65
3.4.2 Λογισμικό.....	65
3.4.3 Σχόλια για την πειραματική διάταξη	66
3.5 Πειραματική διαδικασία	68
3.5.1 Εύρος επιθυμητών αντιστάσεων για την αποτελεσματικότητα των βιοαισθητήρων	69
3.5.2 Συγκεντρώσεις βιολογικού υλικού που χρησιμοποιήθηκαν	70
3.5.3 Επεξεργασία των μετρήσεων.....	70
3.6 Επίλογος	71
Κεφάλαιο 4 ^ο - Πειραματικά Αποτελέσματα	72
4.1 – Αποτελέσματα.....	72
4.2 Συζήτηση.....	77
4.2.1 Επίδραση της αγωγιμότητας του διαλύτη.....	77
4.2.2 Ευαισθησία των αισθητήρων ως συνάρτηση του διακένου τους	79
4.2.3 Ευαισθησία των αισθητήρων ως συνάρτηση της αντίστασής τους	79
4.2.4 Θέση της σταγόνας.....	80
4.2.5 Θερμοκρασία	80
4.2.6 Φωτισμός.....	80
4.3 Μελλοντικές προοπτικές	80

4.4 Επίλογος	81
Βιβλιογραφία.....	82

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1.1: Αποκλίσεις από το νόμο του Moore: (i) More than Moore, από υβριδικές ηλεκτρονικές διατάξεις, (ii) Beyond CMOS, με τη μετάβαση από τη φιλοσοφία των ημιαγωγών στο επίπεδο της κλίμακας του ατόμου (πχ. Μοριακά ηλεκτρονικά) [2].	18
Εικόνα 1.2: Μικροδοκός για χρήση σε οπτική μικροσκοπία σάρωσης κοντινού πεδίου [3].	19
Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου σήραγγας. Ενεργειακές στάθμες του δότη, του φράγματος και του αποδέκτη [8].	24
Εικόνα 2.2: Φαινόμενο σήραγγας σε συντονισμό [8].	24
Εικόνα 2.3: Ένα απλοποιημένο μοντέλο της διάδοσης φορτίου με άλματα όπου η ενέργεια των επιπέδων στις ενδιάμεσες καταστάσεις είναι ίδια και απέχει ΔE από την ενέργεια Fermi των ηλεκτροδίων. Επιπλέον υπάρχει μια μικρή μείωση της ενέργειας Fermi του αποδέκτη που έχει προκληθεί από πόλωση [8].	25
Εικόνα 2.4: Η μετάβαση από την υπερανταλλαγή στη μετάδοση φορτίου με θερμικά ενεργοποιούμενα άλματα. Οι γραμμές παριστάνουν τους κανονικοποιημένους ρυθμούς k_{super}/k , k_{TH}/k και πως γίνεται η μετάβαση στον κάθε μηχανισμό. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει το πλήθος των βάσεων που μεσολαβούν μεταξύ του δότη – αποδέκτη [9].	26
Εικόνα 2.5: Ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ μιας ακολουθίας GGG και μιας γουανίνης – κατιόντος, στις οποίες παρεμβάλλονται η A:T ζεύγη βάσεων. Ο οριζόντιος άξονας δείχνει τον αριθμό των βάσεων που μεσολαβούν ανάμεσα στη γουανίνη και στο σύμπλεγμα γουανίνων [6].	27
Εικόνα 2.6: (α) Ηλεκτρόδιο Au στην επιφάνεια του οποίου προσδέθηκαν τα μόρια – δείκτες. [13] (β) Το Διάκενο των ηλεκτροδίων είναι περίπου 20 nm. (Το τρίτο ηλεκτρόδιο – αναφοράς δεν χρησιμοποιείται). [14] (γ) Διάκενο ηλεκτροδίων στα 300 nm με νανοσωματίδια χρυσού διαμέτρου (a) 12nm, (b) 22nm, (c) 40 nm, (d) 60 nm. [15] (δ) Αισθητήρας με ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια χρυσού (IDEs) διακένου 5 μm σε ύαλο quartz και νανοσωματίδια χρυσού 50nm. [11] (ε) Αισθητήρας με ηλεκτρόδια πλατίνας πάνω σε ύαλο με διάκενο 5 μm και νανοσωματίδια χρυσού δύο διαμέτρων που χρησιμεύουν για στην αύξηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης των κλώνων του βιολογικού υλικού. Στις εικόνες (a) ως (d) φαίνεται βηματικά η διαδικασία κατασκευής της διάταξης. [12] (στ) Ηλεκτρόδια In που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα n – type InP. [16] (ζ) Ολοκληρωμένη διάταξη αισθητήρα χρησιμοποιώντας τεχνολογία CMOS 0.35 μm 2P4M με διάκενο 350 nm, θερμαντικό στοιχείο και αισθητήρα θερμοκρασία από πολυπυρίτιο. Τα ηλεκτρόδια καταλήγουν σε ενισχυτή ρεύματος 5 βαθμίδων με σκοπό τη δυνατότητα επεξεργασίας του σήματος από εμπορικά διαθέσιμα ηλεκτρονικά [17].	30
Εικόνα 2.7: (A) Πτώση στην αντίσταση με την υβριδοποίηση (a) 11 αστοχιών βάσεων, (b) 4 αστοχιών βάσεων, (c) αστοχίας μίας βάσης, (d) πλήρως συμπληρωματικού κλώνου. Αγωγιμότητα φορέων στην περίπτωση: (B) αστοχίας μίας βάσης, (Γ) πλήρως συμπληρωματικού κλώνου [20].	34
Εικόνα 2.8: Μετάβαση της διάταξης από κατάσταση “OFF” (κόκκινες κουκκίδες) σε κατάσταση “ON” γαλάζιες κουκκίδες [14].	34

Εικόνα 2.9: (a) Αγωγιμότητα των δειγμάτων μετά από κάθε στάδιο της μελέτης. (i) Μετά την κατασκευή των ηλεκτροδίων (ii) Μετά την επίστρωση του υμενίου APTMS (3-aminopropyl-trimethoxysilane)(iii)Μετά την ακινητοποίηση του μορίου δείκτη DNA (iv) Μετά την ακινητοποίηση του μορίου στόχου DNA (v)Μετά από Silver ion treatment Ένθετο: Εικόνα φθορισμού με την παρουσία των μορίων – δεικτών. (b): Αγωγιμότητα των δειγμάτων μετά από κάθε στάδιο της μελέτης. Στο στάδιο (v) φαίνεται η ενίσχυση. Ένθετο: Νανοσωματίδια Ag στο δείγμα. (c): (a)Αγωγιμότητα του διάκενου, (b) Δείγμα με ομοιόμορφα κατανεμημένα νανοσωματίδια Au 10nm, (c) Αγωγιμότητα με ακινητοποιημένο το μόριο – δείκτη στην επιφάνεια, (d) Αγωγιμότητα μετά την υβριδοποίηση των δύο κλώνων, (e) Δείγμα μετά από λουτρό νερού 60 °C για αποϋβριδοποίηση, (f) Δείγμα μετά από λουτρό νερού 70 °C. Τα γραμμοσκιασμένα χωρία παριστάνουν το πλήρως συμπληρωματικό μόριο ενώ τα λευκά παριστάνουν μόριο με μία αστοχία βάσης [22]......35

Εικόνα 2.10: Ρεύμα μόνιμης κατάστασης που διαρρέει τον αισθητήρα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του DNA – στόχου [17]......35

Εικόνα 2.11: Χαρακτηριστικές I – V των αυτοοργανωμένων πολυεπιπέδων χρυσού με συγκέντρωση tDNA 10 pM και διαφορετικές διαμέτρους νανοσωματιδίων a) 12 nm, b) 22 nm, 3) 40 nm, 4) 60 nm [15].36

Εικόνα 2.12: (α) I –V μέτρηση πριν και μετά την υβριδοποίηση. (β) Μετρήσεις της αγωγιμότητας σε κάθε στάδιο της μελέτης. 5a: Διάκενο, 5b: Με νανοσωματίδια Au, 5c: με δείκτη - DNA (ssDNA), 5d: Με το πλήρως συμπληρωματικό κλώνο, 5e: Σε λουτρό νερού θερμοκρασίας 60°C, 5f: Μετά από λουτρό θερμοκρασίας 70°C για την απομάκρυνση των μορίων - στόχων. Τα γραμμοσκιασμένα χωρία υποδεικνύουν το πλήρως συμπληρωματικό μόριο ενώ τα λευκά χωρία τον κλώνο με τη μία αστοχία. (γ) Η αγωγιμότητα ως συνάρτηση των συγκεντρώσεων των μορίων – στόχων για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις μορίων – δεικτών [23]......36

Εικόνα 2.13: Απόκριση του αισθητήρα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης με αύξηση της αντίστασης. Με μπλε κουκκίδες συμβολίζεται το συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο και με κόκκινες το μη συμπληρωματικό [16].37

Εικόνα 2.14: Φάσματα εμπέδησης από: (α) RC παράλληλο, (β) RC εν σειρά, (γ) κύκλωμα Randles, (δ) στοιχείο Warburg, (ε) στοιχείο σταθερής φάσης με τον εκθέτη μεταξύ των τιμών 0.70 έως 0.99, (στ) δύο RC παράλληλα συνδεδεμένα εν σειρά.....41

Εικόνα 2.15: Βαθμονόμηση του αισθητήρα για το υβριδοποιημένο DNA. Τα γραφήματα παριστάνουν την απόκριση μέσα σε: (a) διάλυμα χωρίς ολιγομερή, (b) 7 pM, (c) 53 pM, (d) 100 pM, (e) 500 pM, (f) 11,5 nM, (g) 0.2 μM. Η υβριδοποίηση έλαβε χώρα στους 40 ° C για 90 λεπτά σε pH 6,87 [28].42

Εικόνα 2.16: Στην εικόνα φαίνεται η απόκριση σε:1) πλήρως συμπληρωματικό κλώνο, 2) μη συμπληρωματικό κλώνο και στη συνέχεια οι αστοχίες σε κάθε μόριο καθώς και η θέση τους στην ακολουθία. Οσο πλησιέστερα είναι η αστοχία στο ηλεκτρόδιο τόσο αυξάνεται ο λόγος της R_{ct} [24].43

Εικόνα 2.17: (A) Διάγραμμα Bode στο οποίο φαίνεται η διαφορά στην εμπέδηση μεταξύ των δειγμάτων γίνεται αισθητή για συχνότητες κάτω των 30 Hz. (B) Διάγραμμα Nyquist και το ισοδύναμο κύκλωμα που μοντελοποιεί το φαινόμενο. (C) Η αντίσταση μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Το d αντιπροσωπεύει το μόριο που έχει αποδιαταχθεί (denatured molecule), ενώ το h αντιπροσωπεύει το υβριδοποιημένο μόριο (hybridized molecule) [24].44

Εικόνα 2.18: Απλουστευμένο κύκλωμα ποτενσιοστάτη [29].44

Εικόνα 2.19: Η κυκλική βολταμετρία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους $Fe(CN)_6^{4-/3-}$. Οι δύο κορυφές απέχουν μεταξύ τους 88 mV. (a) Ηλεκτρόδιο χρυσού με νανοσωματίδια χρυσού, (b) ηλεκτρόδια, νανοσωματίδια και κλώνος – ηχνιλιάτης, (c) ηλεκτρόδια, νανοσωματίδια χρυσού μετά την υβριδοποίηση με τον πλήρως συμπληρωματικό κλώνο, (d) μετά την υβριδοποίηση με κλώνο που περιέχει μία αστοχία. Ρυθμός σάρωσης 50 mV/s.	45
Εικόνα 2.20: (a) Μεταβατικές μετρήσεις του ρεύματος σε πλήρως συμπληρωματικό DNA σε συγκεντρώσεις: 1)117 nM, 2) 225 nM, 3) 326 nM, 4) 420 nM, 5) 510 nM. (b) Σε 15 - μερή μη συμπληρωματικό σε συγκεντρώσεις: 1) 30, 2) 117, 3) 226 nM.	46
Εικόνα 2.21: Πτώση της αντίστασης με το χρόνο. Τα φιλμ των δειγμάτων έχουν αρχικές αντιστάσεις 173, 702 και 1312 Ω.....	47
Εικόνα 2.22: Πάνω: Λανθασμένη σχεδίαση του DNA και κακή ευθυγράμμιση με δημιουργία δύο hairpins. Κάτω: Επιτυχής ευθυγράμμιση και υβριδοποίηση [31].	49
Εικόνα 2.23: (α) Πείραμα ελέγχου για την υβριδοποίηση των ολιγομερών που χρησιμοποιεί QCM με οδηγούμενη συχνότητα 1MHz [13]. (β) Πείραμα ελέγχου με φθορισμό των μορίων – δεικτών [22] (γ) Πείραμα ελέγχου με φθορισμό πριν και μετά την υβριδοποίηση [16].	50
Εικόνα 3.1: (α) Φαινόμενα σκίασης των νανοσωματιδίων από το ύψος των ηλεκτροδίων. (β) «Κακό» προφίλ ηλεκτροδίων, μη επαρκής επιφάνεια επαφής μεταξύ ηλεκτροδίων και νανοσωματιδίων, (γ) Καλό προφίλ ηλεκτροδίων, επαρκής επιφάνεια στη διεπαφή.	53
Εικόνα 3.2: Σημασία του προφίλ του ηλεκτροδίου. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) με κλίση 5°. Η μπάρα έχει μήκος 100nm [1].....	54
Εικόνα 3.3: Πειραματική διάταξη παραγωγής νανοσωματιδίων με ιοντοβολή [2].....	56
Εικόνα 3.4: In situ μέτρηση της αντίστασης σε αισθητήρα με ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια [32].	57
Εικόνα 3.5: Το μόριο GOPTS [3].....	58
Εικόνα 3.6: Αισθητήρας με GOPTS.....	59
Εικόνα 3.7: Πειραματική διάταξη εκτύπωσης LIFT [4].....	60
Εικόνα 3.8: Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας σάρωσης για νανοσωματίδια χρυσού διαμέτρου 100 nm που έχουν εκτυπωθεί με εκτυπωτή ink jet. Το αντίστοιχο συμβαίνει με τα ολιγονουκλεοτίδια [5].....	61
Εικόνα 3.9: Ο αισθητήρας με ακινητοποιημένα τα ολιγομερή – δείκτες.....	62
Εικόνα 3.10: Ο αισθητήρας μετά την υβριδοποίηση με τα ολιγομερή - στόχους.....	63
Εικόνα 3.11: Απλοποιημένο σχηματικό διάγραμμα του κυκλώματος μεταγωγής.....	64
Εικόνα 3.12: Τυπωμένη πλακέτα διασύνδεσης, BioBoard.....	65
Εικόνα 3.13: Ισοδύναμο κύκλωμα του Keithley 2400 για την απευθείας μέτρηση της αντίστασης.....	65

Εικόνα 3.14: (α) Πειραματική Διάταξη, (β) εμπρόσθια όψη πλακέτας μεταγωγής, (γ) οπίσθια όψη πλακέτας μεταγωγής.....	66
Εικόνα 4.1: (α) Μεταβατικό διάγραμμα αισθητήρα διακένου 2 μm με 10μM πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή. (β) Μεταβατικό διάγραμμα αισθητήρα διακένου 2 μm με 10μM μη συμπληρωματικά ολιγομερή. (γ)-(στ) Επεξεργασμένα διαγράμματα με την απόκριση ομοειδών αισθητήρων σε πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή (μαύρη συνεχής γραμμή) και μη συμπληρωματικά ολιγομερή (κόκκινη εστιγμένη γραμμή).....	73
Εικόνα 4.2: Επίδραση της αγωγιμότητας στην απόκριση των αισθητήρων.....	74
Εικόνα 4.3: Απόκριση αισθητήρων από 10μM ιχνηλάτες, 10uM στόχους.....	75
Εικόνα 4.4: Απόκριση των αισθητήρων για 1μM στόχων.....	75
Εικόνα 4.5: Απόκριση των αισθητήρων με 1μM ιχνηλατών και 1μM στόχων. Η απόκριση του αισθητήρα των 5μm είναι 0,056%.....	76
Εικόνα 4.6: Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα της απόκρισης για 10μM και 1μM μορίων ιχνηλατών.....	77
Εικόνα 4.7: Αποτελέσματα όλων των πειραμάτων.....	73
Εικόνα 4.8: Ροή διαλύτη προς τις επαφές της συστοιχίας.....	78
Εικόνα 4.9: Συμπεριφορά αισθητήρα μετά από 5 ρίψεις διαλύτη.....	79

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 2.1: Σύνοψη βιβλιογραφίας πειραμάτων με αισθητήρες τύπου αντίστασης.....	33
Πίνακας 3.1: Διάταξη ηλεκτροδίων.....	51
Πίνακας 3.2: Ακολουθίες βάσεων που χρησιμοποιήθηκαν.....	59

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Σκοπός της Εργασίας

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της λήψης του διπλώματος από τη Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών. Η εργασία αυτή έρχεται να προστεθεί στις προσπάθειες που στόχευαν στη χρήση των διατάξεων του εργαστηρίου μας για την ηλεκτρική ανίχνευση πρότυπων αλυσίδων DNA.

Η προσέγγισή αυτή εστίασε στις ταυτόχρονες ηλεκτρικές μετρήσεις συνεχούς ρεύματος σε συστοιχίες αισθητήρων που κατασκευάζονται στο εργαστήριο της ομάδας Νανοηλεκτρονικών Υλικών και Διατάξεων. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν με ειδική πειραματική διάταξη που επιτρέπει τη διαδοχική μέτρηση της αντίστασης των αισθητήρων.

Οι μετρήσεις αυτές, αν και είναι γενικά πολύ αξιόπιστες, αντιμετώπισαν ένα εμπόδιο. Το εμπόδιο αυτό τέθηκε από τη συνεισφορά των αγώγιμων ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την συντήρηση του DNA. Το εμπόδιο αυτό υπερκεράστηκε με τη χρήση κατάλληλης μεθοδολογίας.

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως είναι δυνατή η ανίχνευση του γεγονότος της υβριδοποίησης μέσω ηλεκτρικών μετρήσεων συνεχούς ρεύματος. Για περαιτέρω, όμως, συμπεράσματα είναι επιβεβλημένη η διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων στα οποία θα προσδιοριστεί και το κατώτατο όριο ανίχνευσης του αισθητήρα (Limit of Detection) καθώς και η επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος στο υμένιο των νανοσωματιδίων.

1.2 Σμίκρυνση των Διαστάσεων, Μικροηλεκτρονική, Μικροσυστήματα, Νανοτεχνολογία

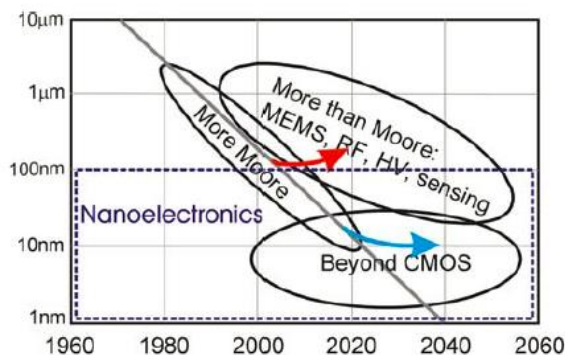
Η ανάπτυξη της γνώσης αλλά και της τεχνολογίας στις μέρες μας έχει προχωρήσει στη σμίκρυνση των διαστάσεων τόσο για τη μελέτη των φυσικών φαινομένων που υφίστανται στη νανοκλίμακα, όσο και για την αύξηση της πυκνότητας ολοκλήρωσης των διατάξεων που κατασκευάζονται με αυτές τις αρχές.

Η σμίκρυνση των διαστάσεων προέκυψε ως φυσικό επακόλουθο της ανάγκης για τη δημιουργία μικρότερων σε όγκο και παράλληλα μεγαλύτερης αποδοτικότητας διατάξεων. Προπομπός αυτής της τάσης είναι η ηλεκτρονική. Το όφελος της ηλεκτρονικής από τη σμίκρυνση

των διαστάσεων γίνεται εμφανές όταν κανείς αναλογιστεί την αύξηση των δυνατοτήτων των επεξεργαστών των ηλεκτρονικών υπολογιστών στο πέρασμα του χρόνου.

Συγκεκριμένα ο πρώτος εμπορικά διαθέσιμος επεξεργαστής (Intel 4004) κυκλοφόρησε το 1971. Η λειτουργία του βασιζόταν σε ένα τρανζίστορ p-MOSFET με μήκος πύλης 10 μm . Οι ραγδαίες εξελίξεις τόσο στη φυσική όσο και στους διάφορους κλάδους της μηχανικής που ασχολούνται με τη σμίκρυνση των διαστάσεων και την αύξηση της πυκνότητας ολοκλήρωσης έχουν συμβάλει στην μείωση των διαστάσεων της πύλης των τρανζίστορ στα 14 nm για τον επεξεργαστή Intel® Core™ M. [6]

Στόχος της ηλεκτρονικής είναι να ξεπεραστούν οι προβλέψεις του νόμου του Moore. Η στροφή, αυτή, της τεχνολογίας φανερώνεται στην κατασκευή σύνθετων συστημάτων που ενσωματώνουν ετερογενείς τεχνικές ολοκλήρωσης (System on a Chip κτλ)ή, όπως φαίνεται στην εικόνα 1, στο πεδίο “Beyond CMOS” (ξεπερνώντας την τεχνολογία CMOS). Η προσέγγιση στρέφεται στην τεχνολογία ατομικής κλίμακας με νέες φιλοσοφίες αρχιτεκτονικής σε μνήμες, με μετάβαση από τους ημιαγωγούς στην μοριακή τεχνολογία και σε νέες τάσεις στο σχεδιασμό και στην ολοκλήρωση κυκλωμάτων. Στην εικόνα 1 φαίνεται η πορεία που αναμένεται να έχει η τεχνολογία τα επόμενα χρόνια. [7]

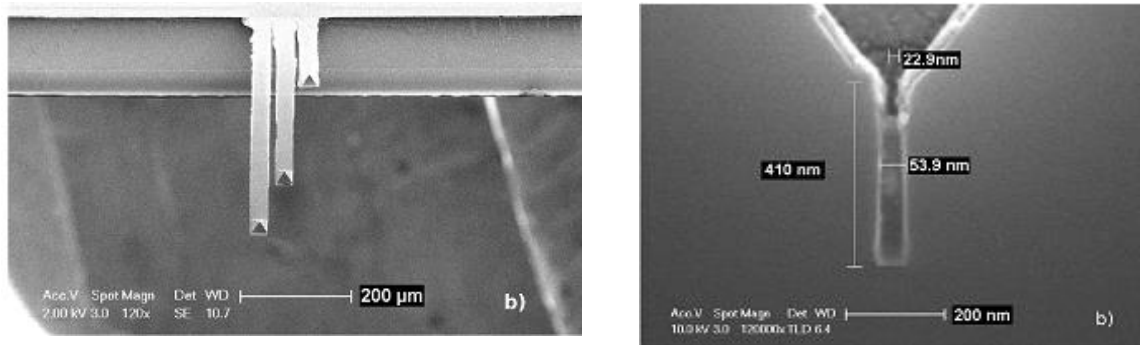


Εικόνα 1.1: Αποκλίσεις από το νόμο του Moore: (i) More than Moore, από υβριδικές ηλεκτρονικές διατάξεις, (ii) Beyond CMOS, με τη μετάβαση από τη φιλοσοφία των ημιαγωγών στο επίπεδο της κλίμακας του ατόμου (πχ. Μοριακά ηλεκτρονικά) [7].

1.3 Μικροσυστήματα

Ο κλάδος των μικροσυστημάτων – MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) ακολουθεί την πορεία της ηλεκτρονικής στη σμίκρυνση των διαστάσεων. Για την κατασκευή τους γίνεται χρήση πρότυπων διαδικασιών παραγωγής ώστε να είναι γενικά συμβατές με τις πρότυπες διαδικασίες κατασκευής των μικροηλεκτρονικών διατάξεων π.χ. οπτική ή ηλεκτρονική λιθογραφία, εγχάραξη με πλάσμα, υγρή εγχάραξη, LIGA και μικρομηχανική στην επιφάνεια ή στον όγκο ενός υλικού (surface

and bulk micromachining). Με αυτές τις τεχνικές γίνεται εφικτή η κατασκευή δομών με διαστάσεις έως και μερικών δεκάδων νανομέτρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της εικόνας 1.2.



Εικόνα 1.2: Μικροδοκός για χρήση σε οπτική μικροσκοπία σάρωσης κοντινού πεδίου. [8]

1.4 Νανοεπιστήμη – Νανοτεχνολογία

Το 1959 Ο R. Feynman προέβλεψε ότι υπάρχει πολύς χώρος «εκεί κάτω» στη γνωστή ομιλία του με τίτλο “There’s plenty room at the bottom”. Από το 1990 και έπειτα η πρόοδος που συντελέστηκε στη νανοκλίμακα έγινε με ρυθμούς γεωμετρικής προόδου. Οι πολλά υποσχόμενες ιδιότητες των υλικών στη νανοκλίμακα έδωσαν στους επιστήμονες και στους μηχανικούς την ώθηση να αναπτύξουν νέες μεθόδους και διατάξεις για τη μελέτη και τη χρήση των νανοϋλικών. Θα μπορούσαμε συνοπτικά να αναφέρουμε μερικούς από τους στόχους της νανοεπιστήμης [5]:

- Ο απόλυτος έλεγχος των διαδικασιών κατασκευής απομονωμένων νανοδομών καθώς και των συνόλων τους ή της συνδεσμολογίας τους.
- Ο έλεγχος και η κατανόηση των βασικών φυσικών/χημικών ιδιοτήτων τους.
- Η διερεύνηση και ανάπτυξη νέων σχεδίων και νέων αρχιτεκτονικών σχεδίασης που θα παράγουν νέα νανοδιάστατα υλικά υψηλής απόδοσης (high performance materials).
- Η άντληση ιδεών και η έμπνευση από το πεδίο των βιολογικών διαδικασιών (bio-inspired systems).
- Η σύνδεση της νανοεπιστήμης με την βιολογία και την μοριακή ηλεκτρονική.
- Η βελτίωση των ήδη υπαρχόντων τεχνικών χαρακτηρισμού και διερεύνησης των νανοϋλικών ενώ παράλληλα αναπτύσσονται νέες τεχνικές χαρακτηρισμού.

1.5 Αισθητήρες

Οι αισθητήρες αποτελούν διατάξεις που μετατρέπουν ένα ερέθισμα (θερμικό, οπτικό, μηχανικό, μαγνητικό, χημικό, βιολογικό γεγονός κτλ) σε ηλεκτρικό (αντίσταση, χωρητικότητα,

επαγωγή κτλ) ώστε αυτό να μπορεί να αναλυθεί από διατάξεις που λαμβάνουν και επεξεργάζονται δεδομένα πχ μικροελεγκτές, ηλεκτρονικοί υπολογιστές κτλ.

Το σκεπτικό που κυριαρχεί τους αισθητήρες αυτούς είναι η μέτρηση της κατά περίπτωση διαταραχής (ερεθίσματος) σε σχέση με την πρότυπη απόκριση του αισθητήρα σε κατάσταση «ηρεμίας» δηλαδή στην κατάσταση που δεν δέχεται κάποιο ερέθισμα.

Στη απλούστερη θεώρηση υπάρχουν δύο τύποι αισθητήρων. Αφενός μεν οι αισθητήρες που διεγείρονται μόνοι τους (αυτοδιεγειρόμενοι αισθητήρες) δίνοντας ένα σήμα εξόδου $Y(t) = F(x(t))$ έπειτα από ένα σήμα εισόδου $x(t)$. Αφετέρου δε αισθητήρες στους οποίους απαιτείται εξωτερική οδήγηση – διαμόρφωση (διαμορφωμένοι αισθητήρες). Στη δεύτερη περίπτωση ως σήμα εξόδου λαμβάνεται ένα σήμα της μορφής $y(t) = F(x(t) + x_d)$ όπου x_d ένα σήμα διέγερσης (πχ μία ημιτονοειδής τάση).

Για την αξιόπιστη χρήση όμως των αισθητήρων είναι απαραίτητη η γνώση κάποιων τεχνικών χαρακτηριστικών τους τα οποία πρέπει κατά περίπτωση να συμπίπτουν με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες καλούνται να λειτουργήσουν. Τα σημαντικότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι [9]:

- Ευαισθησία (sensitivity)
- Μη γραμμικότητα (non – linearity)
- Υστέρηση (hysteresis)
- Ολίσθηση (drift)

Από τα παραπάνω κρίνεται αναγκαία η βαθμονόμηση του αισθητήρα υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες.

Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε σε βιολογικούς αισθητήρες. Οι βιολογικοί αισθητήρες μπορούν να κάνουν αίσθηση βιολογικών γεγονότων με ποικίλους τρόπους. Οι αισθητήρες αυτοί μπορεί να είναι τύπου χωρητικότητας είτε τύπου αντίστασης. Επειδή η ανίχνευση των βιολογικών γεγονότων είναι σχετικά περίπλοκη διαδικασία απαιτείται οι αισθητήρες να εμφανίζουν επιλεκτικότητα σε κάποια ορισμένη ουσία. Η εμφάνιση της επιλεκτικότητας συνήθως επιτυγχάνεται με την χημική τροποποίηση της επιφάνειας του αισθητήρα έτσι ώστε να μπορεί να σχηματιστεί χημικός δεσμός με συγκεκριμένα είδη.

Με τη σειρά τους, όταν τα είδη αυτά εισέλθουν στο περιβάλλον του αισθητήρα (μπορεί να είναι υπό μορφή αερίου ή υγρού διαλύματος) τότε μπορεί να σχηματιστεί δεσμός μεταξύ των μορίων – υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του αισθητήρα και των προς ανίχνευση

ουσιών. Κατά συνέπεια, με τη δημιουργία δεσμού μεταβάλλεται η τιμή του μετρούμενου μεγέθους (αντίσταση, χωρητικότητα, επαγωγή) κατά ποσό ανάλογο με την ένταση του ερεθίσματος. [9]

Για να γίνει αποτελεσματικά η αίσθηση των βιολογικών υλικών απαιτείται να γίνεται παράλληλα μια διαδικασία ελέγχου (control test ή reference test) κατά την οποία να τοποθετείται στον αισθητήρα ένα πρότυπο βιολογικό υλικό (ρυθμιστικό διάλυμα ή ουσία στην οποία δεν είναι επιλεκτικός ο αισθητήρας) και μετράται η απόκριση του αισθητήρα. Από τη σύγκριση των δύο καταστάσεων θα προκύψει η απόκριση του αισθητήρα η οποία οφείλεται στην ουσία προς ανίχνευση.

Κεφάλαιο 2

Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

2.1 Προτεινόμενοι μηχανισμοί αγωγιμότητας στο DNA

Τα τελευταία χρόνια, με την άνοδο της νανοτεχνολογίας, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ενσωμάτωση βιοϋλικών σε κλασικές εφαρμογές. Η προσπάθεια για τη χρήση του δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) ως νανοκαλώδιο έχει στρέψει την έρευνα στην κατανόηση της συμπεριφοράς της αγωγιμότητάς του. Η επιστημονική κοινότητα, μετά από χρόνια μελετών ωστόσο, δεν καταλήγει σε ένα συμπέρασμα όσον αφορά τις ιδιότητες του DNA. Στην μελέτη της αγωγιμότητας έχουν δημοσιευθεί πολλές εργασίες που προσεγγίζουν θεωρητικά και άλλες που προσεγγίζουν πειραματικά την αγωγιμότητα. Βάση αυτών των μελετών έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα που φαίνεται να προσεγγίζουν τις αρχές της διάδοσης φορτίου διαμέσου της έλικας. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι στην αγωγιμότητα συνεισφέρει ο μηχανισμός των θερμικά ενεργοποιούμενων αλάτων φορτίου, ο μηχανισμός της υποβοήθησης των πολαρονίων με φωνόνια και κυρίως το φαινόμενο σήραγγας.

Τα χαρακτηριστικά του κάθε μηχανισμού διαφέρουν. Το φαινόμενο σήραγγας και ο μηχανισμός της υπερανταλλαγής άγει το φορτίο σε μικρές αποστάσεις ενώ ο μηχανισμός με θερμικά ενεργοποιούμενα άλματα σε μεγαλύτερες. Ο μηχανισμός της υποβοήθησης με πολαρόνια εμφανίζει ασθενέστερη εξάρτηση από την απόσταση. Καθοριστικό ρόλο παίζει και η θερμοκρασία αφού σε χαμηλές θερμοκρασίες το DNA φαίνεται να αποκτά υπεραγώγιμη συμπεριφορά (υπό αμφισβήτηση). Σε θερμοκρασίες από την υπεραγώγιμη μετάβαση έως και τους 80 K φαίνεται να υπερισχύει ο μηχανισμός της μετάδοσης πολαρονίων με την υποβοήθηση των φωνονίων καθώς και ο μηχανισμός της υπερανταλλαγής. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 80 K, η διάδοση φορτίου κυριαρχείται από τον θερμικά ενεργοποιούμενο μηχανισμό αλάτων φορτίου. [10]

Για τη διάδοση του φορτίου πρέπει να δημιουργηθεί ένα αγώγιμο μονοπάτι διαμέσου της διπλής έλικας. Το ρόλο αυτό αναλαμβάνει κατά κύριο λόγο η γουανίνη (guanine, G) λόγω του ότι αποτελεί τη βάση με το χαμηλότερο δυναμικό ιονισμού, μόλις περίπου 7.6 eV. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η διάδοση του φορτίου γίνεται από γουανίνη σε γουανίνη, διαπερνώντας τις ενδιάμεσες βάσεις Αδενίνων – Θυμίνων ή και από γουανίνη σε συμπλέγματα γουανίνων. Ακόμη, από θεωρητικές μελέτες έχει υπολογιστεί πως η υπερανταλλαγή λαμβάνει χώρα όταν το φορτίο

διαδίδεται σε απόσταση μικρότερη των τεσσάρων βάσεων, ενώ σε απόσταση μεγαλύτερη από αυτή υπερσχύει ο μηχανισμός των αλμάτων που έχει ασθενέστερη εξάρτηση από την απόσταση. [11]

Έχει προταθεί και ότι οι αδενίνες και θυμίνες συμμετέχουν στη διάδοση φορτίου αλλά και ότι επίσης το φορτίο μπορεί να άγεται και μέσω της «ραχοκοκκαλιάς» από πεντόζες και φωσφορικές ομάδες. Στο σύνολο των δημοσιεύσεων υπάρχει δυσπιστία για το μηχανισμό που επικρατεί, αφού γίνεται λόγος και για τη μονωτική συμπεριφορά του DNA και τη μεταφορά του φορτίου από τα κατιόντα που περιβάλλουν τις φωσφορικές ομάδες, παρότι κάτι τέτοιο δεν έχει διαπιστωθεί πειραματικά.

Η έγχυση του φορτίου γίνεται με την οξείδωση ενός δότη, δηλαδή με την αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου. Το ρόλο του δότη αναλαμβάνουν συνήθως μόρια τα οποία παρεμβάλλονται (intercalators) σε συγκεκριμένες θέσεις στη διπλή έλικα. Το φορτίο μετά από διαδοχικά άλματα στην έλικα, δεσμεύεται με την αναγωγή ενός αποδέκτη που επίσης παρεμβάλλεται και έτσι γίνεται η ανίχνευση. [12]

Στην περίπτωση της συστοιχίας αισθητήρων ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία το ρόλο του δότη αναλαμβάνουν τα νανοσωματίδια πλατίνας. Όταν η ενέργεια του νανοσωματιδίου, λόγω της εφαρμογής εξωτερικού δυναμικού, ξεπεράσει την ενέργεια φόρτισής του, τότε αυτό αποκτά ένα ηλεκτρόνιο και φορτίζεται αρνητικά. Στη συνέχεια, το πλεονάζον ηλεκτρόνιο θα διοχετευτεί στη γουανίνη (αποδέκτης) μίας ενεργειακά προτιμητέας διπλής έλικας από αυτές που βρίσκονται συνδεδεμένες με το νανοσωματίδιο. Η μετάδοση του φορτίου μετά από την διέγερση (ή αναγωγή) της πρώτης γουανίνης μπορεί να γίνει στην επόμενη γουανίνη ή σύμπλεγμα γουανίνων ή στο επόμενο νανοσωματίδιο. Η «επιλογή» της πορείας καθώς και του μηχανισμού θα εξαρτηθεί από την ύπαρξη προτιμητέων ενεργειακών καταστάσεων. Όταν το φορτίο διασχίσει τη διπλή έλικα του DNA θα βρεθεί στο επόμενο νανοσωματίδιο (αποδέκτης) που θα χρησιμοποιήσει ως γέφυρα για την επόμενη έλικα. Θεωρούμε πως η μετάδοση φορτίου δεν μπορεί να λάβει χώρα στην περίπτωση του μη υβριδοποιημένου κλώνου.

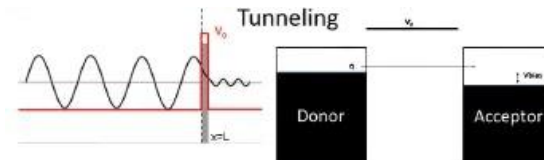
2.1.1 Υπερανταλλαγή

Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί ουσιαστικά μία έκφραση του κβαντομηχανικού φαινομένου σήραγγας. Υποθέτουμε, λοιπόν, μια κυματοσυνάρτηση ενός φορτίου που προσπίπτει σε ένα φράγμα το οποίο θα αποσβέσει εκθετικά την κυματοσυνάρτηση. Ο ρυθμός της μεταφοράς φορτίου θα είναι ανάλογος του $k_{ET} \propto \exp(-\beta X)$, όπου β είναι ο παράγοντας με τον οποίο εξασθενεί η πιθανότητα και είναι ανάλογος του μέσου που παρεμβάλλεται μεταξύ δότη και αποδέκτη, X είναι η απόσταση μεταξύ δότη και αποδέκτη.

Η ανάλογη έκφραση που συνδέει το φαινόμενο σήραγγας με μακροσκοπικά μετρούμενα μεγέθη είναι η:

$$G = \frac{I}{V_{bias}} = G_0 \exp(-\beta d), \text{ όπου:} \quad (1)$$

- I είναι το μακροσκοπικά μετρούμενο ρεύμα από ένα μόριο
- V_{bias} είναι η τάση μεταξύ των ηλεκτροδίων
- G_0 είναι το κβάντο της αγωγιμότητας ($2e^2/h \approx 77.5\mu S$)
- d είναι η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων δηλαδή το μήκος του μορίου. [13]



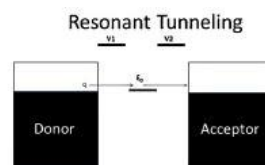
Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου σήραγγας. Ενεργειακές στάθμες του δότη, του φράγματος και του αποδέκτη. [13]

2.1.2 Φαινόμενο σήραγγας – Πολλαπλά Φράγματα Δυναμικού – Συντονισμός (Resonant Tunneling)

Σε συστήματα που υπάρχουν ενδιάμεσες ενεργειακές καταστάσεις, το φαινόμενο σήραγγας σε συντονισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό κατάλληλες συνθήκες. Αν για παράδειγμα υπάρχουν δύο φράγματα δυναμικού και ανάμεσά τους μία ενεργειακή κατάσταση με ενέργεια E_0 και ένα ηλεκτρόνιο με ίδια ενέργεια όπως η εντοπισμένη ενεργειακή κατάσταση ανάμεσα στο φράγμα δυναμικού ($E - E_0$) τότε η αγωγιμότητα σε συνθήκες μηδενικής πόλωσης (και χωρίς να λάβουμε υπόψη μας το σπιν του ηλεκτρονίου) θα είναι:

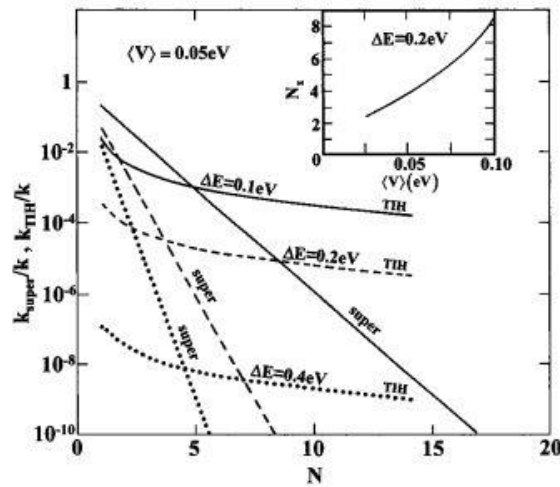
$$G = \frac{4e^2}{h} \frac{k_L k_R}{(k_L + k_R)^2} \quad (2)$$

Όπου k_L και k_R είναι οι ρυθμοί του αρχικού και του τελικού φράγματος αντίστοιχα. Αυτή η έκφραση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη των μορίων με εντοπισμένες ενεργειακές καταστάσεις. Επίσης, είναι χρήσιμη γιατί πολλά φαινόμενα μπορούν να αναχθούν σε αυτό το μοντέλο με αποτέλεσμα η επίλυσή τους να απλοποιείται σημαντικά.



Εικόνα 2.2: Φαινόμενο σήραγγας σε συντονισμό [13].

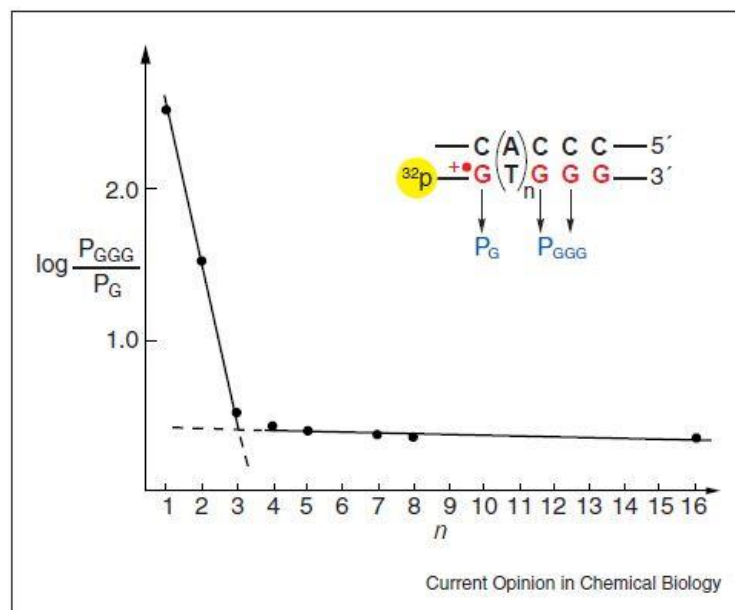
Σε αυτή την περίπτωση η αγωγιμότητα φθίνει γραμμικά με την απόσταση και εξαρτάται εκθετικά από τη θερμοκρασία, όπως φαίνεται και από τη σχέση (5).



Εικόνα 2.4: Η μετάβαση από την υπερανταλλαγή στη μετάδοση φορτίου με θερμικά ενεργοποιούμενα άλματα. Οι γραμμές παριστάνουν τους κανονικοποιημένους ρυθμούς k_{super}/k , k_{TH}/k και πως γίνεται η μετάβαση στον κάθε μηχανισμό. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει το πλήθος των βάσεων που μεσολαβούν μεταξύ του δότη – αποδέκτη [14].

Η παραπάνω θεωρία επιβεβαιώνεται και από τη δημοσίευση [10] όπου έγινε θεωρητική μελέτη για την μεταφορά φορτίων από μεμονομένες γουανίνες σε συμπλέγματα τριών γουανίνων.

Αν κάποιος αθροίσει τα μικροσκοπικά μεγέθη ώστε να πάρει μια μακροσκοπική εικόνα, θα παρατηρήσει ότι η αγωγιμότητα μειώνεται γραμμικά σε συνάρτηση με την απόσταση. [13]



Εικόνα 2.5: Ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ μιας ακολουθίας GGG και μιας γουανίνης – κατιόντος, στις οποίες παρεμβάλλονται η A:T ζεύγη βάσεων. Ο οριζόντιος άξονας δείχνει τον αριθμό των βάσεων που μεσολαβούν ανάμεσα στη γουανίνη και στο σύμπλεγμα γουανίνων [10].

2.1.4 Διάδοση πολaronίων με την υποβοήθηση φωνονίων

Όταν στο DNA εγχυθεί ένα πλεονάζον φορτίο (ηλεκτρόνιο ή σπή) στις βάσεις του μπορούν να δημιουργηθούν δύο ειδών πολaronία. Τα πολaronία είναι τα οιονεί σωματίδια (quasi particles) που εξηγούν τη διαταραχή που προέρχεται από την κίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου που περιβάλλεται από ιόντα ή δίπολα. Το πρώτο είδος αναφέρεται στην δομική παραμόρφωση που αυτό δημιουργεί. Επειδή οι αζωτούχες βάσεις παραμένουν ενωμένες λόγω της αλληλοεπικάλυψης των π – τροχιακών τους, όταν εγχυθεί ένα φορτίο τότε δημιουργείται πόλωση γύρω από αυτό με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολaronικής συμπεριφοράς. Το μέγεθος του πολaronίου κυμαίνεται από τέσσερις έως έξι βάσεις, κάτι που εξαρτάται από τις βάσεις που συμμετέχουν. Η ενέργεια δεσμού που αναπτύσσει κυμαίνεται από 0.3 έως 0.03 eV.

Ο δεύτερος τύπος πολaronίων οφείλεται στην πόλωση λόγω του φορτίου που εμφανίζει το περιβάλλον μέσω του DNA (μόρια νερού, ιόντα). Το μέγεθος του πολaronίου δεν είναι ξεκάθαρο αφού εξαρτάται τόσο από τις αζωτούχες βάσεις που παρίστανται όσο και από τα μόρια του περιβάλλοντος μέσου. Διάφοροι υπολογισμοί όμως δείχνουν ότι το μέγεθος μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 3 βάσεις για έναν μονό κλώνο αποτελούμενο από τρεις γουανίνες που περιβάλλονται από τρεις αδενίνες. Σε κάθε περίπτωση όμως οι ιδιότητες αυτού του τύπου πολaronίων είναι οι ίδιες για όλες τις βάσεις.

Σε γενικές γραμμές η διάδοση του φορτίου μεταξύ των γουανίνων και των αδενίνων μπορεί να γίνει μέσω πολaronίων. Τα πολaronία μπορούν να «ολισθήσουν» αν υπάρχει μία ακολουθία ίδιων βάσεων ή να μεταπηδήσουν αν παρεμβάλλονται διαφορετικές βάσεις. Αυτό προφανώς συμβαίνει λόγω των ενεργειακών καταστάσεων των διαφορετικών βάσεων. Στη συγκεκριμένη δημοσίευση οι Cornwell et al αναφέρουν ότι στη μεταφορά του φορτίου σε ξηρά περιβάλλοντα όπου οι έλικες είναι εκτεθειμένες στον αέρα ή βρίσκονται υπό κενό μάλλον δεν συμμετέχουν πολaronία αφού το περιβάλλον μέσο δεν δύναται να πολωθεί εύκολα. Σε κάθε περίπτωση, όμως, δεν είναι ξεκάθαρο σε πιο βαθμό μπορούν να συμμετάσχουν τα μόρια νερού και τα ιόντα που είναι δέσμια ανάμεσα στις βάσεις ή στις φωσφορικές ομάδες. [15]

Το μοντέλο αυτό προτάθηκε για να εξηγήσει τη μεταφορά φορτίου μεγάλου βεληνεκού που εμφανίζει όμως πολύ μικρή εξάρτηση από την αντίσταση. Η βασική ιδέα πίσω από αυτό το μοντέλο είναι ότι το φορτίο και το νέφος της πόλωσης που δημιουργεί είναι μη εντοπισμένα σε πολλές ενεργειακές καταστάσεις στο μόριο, οπότε αυτό βοηθάει τη μεταφορά του φορτίου σε

μεγάλες αποστάσεις. Τα μοντέλα που έχουν προταθεί φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την αγωγή του φορτίου στα βιομόρια. Πρόσφατες μελέτες και προσομοιώσεις δείχνουν ότι και άλλοι παράγοντες όπως διακυμάνσεις στην κατασκευή των βιομορίων θα μπορούσαν να επηρεάζουν τους μηχανισμούς μεταφοράς του φορτίου. [13]

2.2 Μεθοδολογία για την ανίχνευση της υβριδοποίησης μέσω ηλεκτρικών μεθόδων

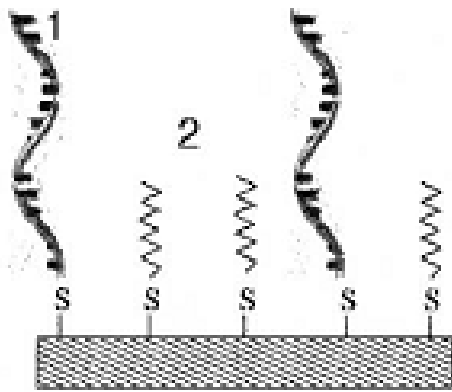
Οι ηλεκτρικές μέθοδοι αποτελούν ένα από τα πιο αξιόπιστα εργαλεία της έρευνας σήμερα. Αν και η ακρίβειά τους δεν είναι συγκρίσιμη με άλλες μεθόδους (π.χ. οπτικές) εντούτοις τείνουν να προτιμώνται λόγω μιας πληθώρας χαρακτηριστικών. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι οι διατάξεις που χρησιμοποιούνται είναι μικρού μεγέθους. Επίσης, οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ολοκληρωμένων ηλεκτρονικών διατάξεων είναι συνήθως συμβατές με τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στους αισθητήρες που χρησιμοποιούν ηλεκτρικές μεθόδους, ως εκ τούτου η τεχνολογία αυτή μπορεί να ολοκληρωθεί άμεσα σε μεγαλύτερα κυκλώματα. Η απευθείας χρήση ηλεκτρικών αισθητήρων, δε, μειώνει την πολυπλοκότητα των διατάξεων αφού δεν ενσωματώνονται βαθμίδες μετατροπής του σήματος σε ηλεκτρικό.

Παρακάτω θα παρουσιαστούν οι σημαντικότεροι τύποι αισθητήρων που χρησιμοποιούνται τόσο σε ερευνητικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο αγοράς. Λόγω της δυνατότητας ενός αισθητήρα να λειτουργεί με παραπάνω από έναν τρόπους πχ ένας αισθητήρας τύπου αντίστασης θα μπορούσε να λειτουργεί ως τύπου χωρητικότητας κατ' επέκταση και ως τύπου εμπέδησης.

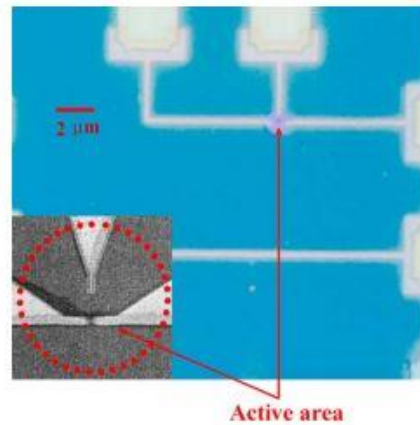
Στη συνέχεια θα γίνει διάκριση στη μέθοδο με την οποία μετρήθηκε το φαινόμενο της υβριδοποίησης. Τέλος, θα αναφερθούν συγκεντρωτικά τα συμπεράσματα από όλες τις διατάξεις και τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λύση αυτού του προβλήματος.

Στις περισσότερες δημοσιεύσεις κατασκευάστηκαν μεταλλικά ηλεκτρόδια από χρυσό, πλατίνα, ίνδιο κτλ, με διάκενα εκατοντάδων νανομέτρων. Στα διάκενα τοποθετούνταν αγωγίμα μεταλλικά νανοσωματίδια και πάνω στα νανοσωματίδια γινόταν η ακινητοποίηση των μορίων του βιολογικού υλικού. Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνταν αφ' ενός για να παίξουν το ρόλο γέφυρας στη μετάδοση του φορτίου αλλά επίσης για την αύξηση της επιφάνειας ακινητοποίησης των κλώνων. Σε κάθε διάταξη χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια μίας διαμέτρου εκτός αυτής των Tokonami et al [16] που χρησιμοποίησαν νανοσωματίδια δύο διαμέτρων με σκοπό να αυξήσουν την ευαισθησία των διατάξεών τους.

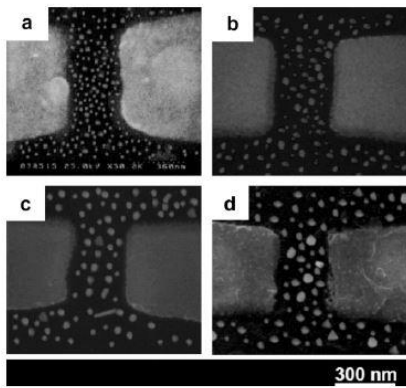
Η μελέτη που πλησιάζει περισσότερο στην δική μας προσέγγιση ήταν αυτή των Tokonami et al [17]. Σε αυτή τη δημοσίευση παρασκεύασαν νανοσωματίδια Au με χημικό τρόπο με μέση διάμετρο 50 nm και τα οποία εναπόθεσαν πάνω σε ύαλο quartz. Κατ' αναλογία με την [16], τα νανοσωματίδια είχαν μοριακούς συνδετήρες οι οποίοι απέτρεπαν τη συσσωμάτωση τους σε νησίδες και δημιουργούσαν αποστάσεις περίπου 1.3 nm.



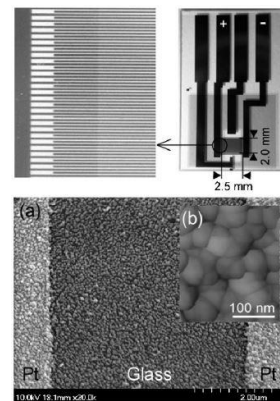
(α)



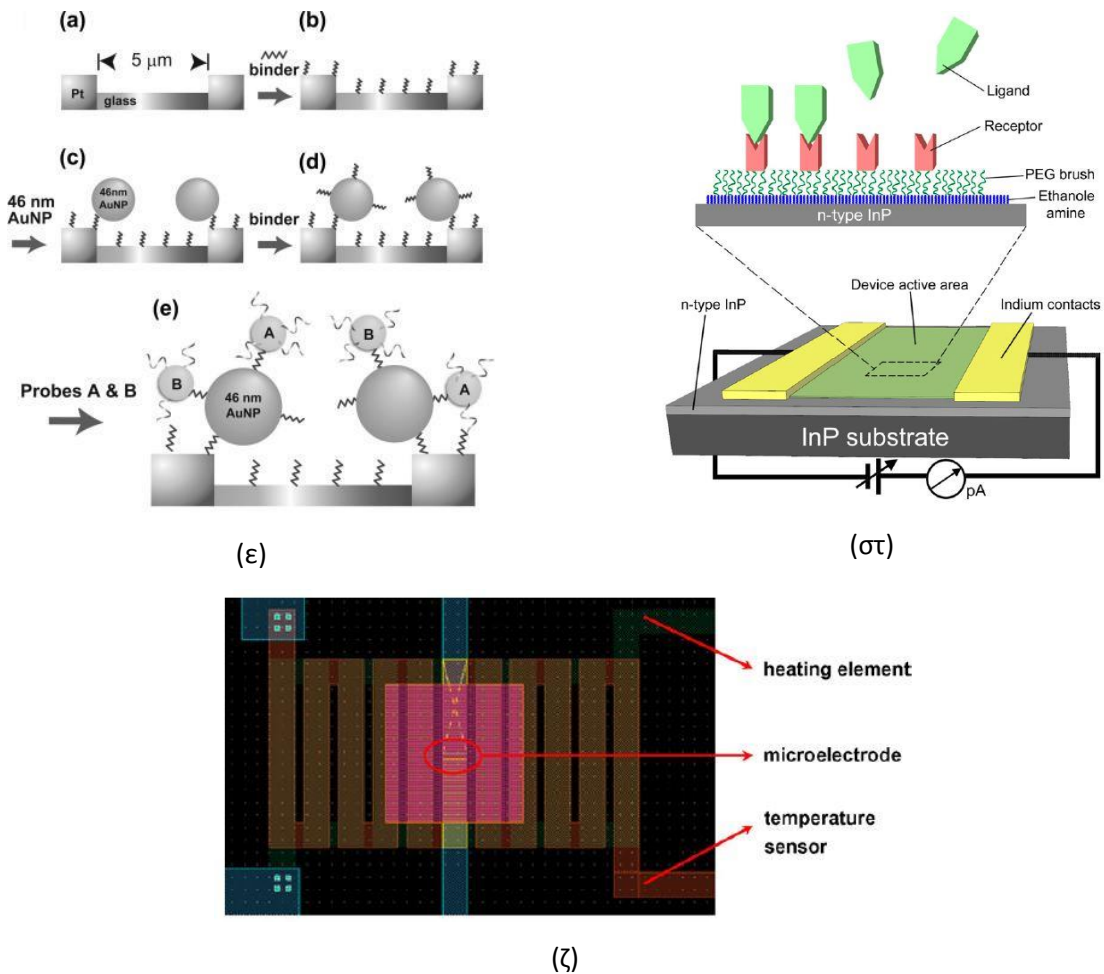
(β)



(γ)



(δ)



Εικόνα 2.6: (α) Ηλεκτρόδιο Au στην επιφάνεια του οποίου προσδέθηκαν τα μόρια – δείκτες. [18] (β) Το Διάκενο των ηλεκτροδίων είναι περίπου 20 nm. (Το τρίτο ηλεκτρόδιο – αναφοράς δεν χρησιμοποιείται). [19] (γ) Διάκενο ηλεκτροδίων στα 300 nm με νανοσωματίδια χρυσού διαμέτρου (a) 12nm, (b) 22nm, (c) 40 nm, (d) 60 nm. [20] (δ) Αισθητήρας με ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια χρυσού (IDEs) διακένου 5 μm σε ύαλο quartz και νανοσωματίδια χρυσού 50nm. [16] (ε) Αισθητήρας με ηλεκτρόδια πλατίνης πάνω σε ύαλο με διάκενο 5 μm και νανοσωματίδια χρυσού δύο διαμέτρων που χρησιμεύουν για στην αύξηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης των κλώνων του βιολογικού υλικού. Στις εικόνες (a) ως (d) φαίνεται βηματικά η διαδικασία κατασκευής της διάταξης. [17] (στ) Ηλεκτρόδια In που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα n-type InP. [21] (ζ) Ολοκληρωμένη διάταξη αισθητήρα χρησιμοποιώντας τεχνολογία CMOS 0.35μm 2P4M με διάκενο 350 nm, θερμαντικό στοιχείο και αισθητήρα θερμοκρασία από πολυπυρίτιο. Τα ηλεκτρόδια καταλήγουν σε ενισχυτή ρεύματος 5 βαθμίδων με σκοπό τη δυνατότητα επεξεργασίας του σήματος από εμπορικά διαθέσιμα ηλεκτρονικά [22].

2.2.1 Αισθητήρες τύπου Αντίστασης

Οι αισθητήρες τύπου αντίστασης αξιοποιούν το γεγονός της ικανότητας του DNA να μεταφέρει φορτίο κατά μήκος της αλυσίδας του. Γενικά στη χημεία αυτή η τεχνική αναφέρεται ως αγωγιμομετρία (conductometry) και χρησιμοποιείται κυρίως σε διαλύματα τα οποία παρουσιάζουν ιοντική αγωγιμότητα. Η μέτρηση της αγωγιμότητας είναι μία τεχνική γρήγορη και ευαίσθητη, μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας σχετικά απλό και εμπορικά διαθέσιμο εξοπλισμό. Οι αισθητήρες που χρησιμοποιούν αυτή την αρχή έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και της βιομηχανίας. Η αρχή λειτουργίας τους προσφέρεται ιδιαίτερα σε σχέση με άλλους τύπους αισθητήρων (πχ ηλεκτροχημικοί) δεδομένου ότι δεν απαιτείται η κατασκευή ηλεκτροδίων

αναφοράς. Αυτό, προφανώς σημαίνει την άμεση μείωση των απαιτούμενων βημάτων, καθώς και των υλικών των ηλεκτροδίων που απαιτούνται, για την κατασκευή διατάξεων αισθητήρων. [23]

Ο λόγος που δεν χρησιμοποιούνται τρία ηλεκτρόδια σε αυτή την τεχνική είναι πως τα ρεύματα που διαρρέουν τους αισθητήρες έχουν μικρές τιμές, της τάξης των nA, με αποτέλεσμα οι φαρανταϊκές διαδικασίες – αντιδράσεις, αν υπάρξουν, να είναι αμελητέες. Αυτές οι διεργασίες εμφανίζονται κυρίως σε πειράματα στα οποία υπεισέρχονται μεγαλύτερα ρεύματα, της τάξης δηλαδή των μερικών mA. [24]

2.2.1.1 Διεξαγωγή των Μετρήσεων

Οι μετρήσεις των αισθητήρων έγιναν χρησιμοποιώντας την τυπική τεχνική δύο ακροδεκτών πηγής – απαγωγού (source, drain). Οι [20] [21] [22] [25] [26] [27] [28] διεξήγαγαν I – V μετρήσεις σε ατμόσφαιρα αζώτου καθώς και σε κανονική ατμόσφαιρα σχετικής υγρασίας 50 – 60 %.

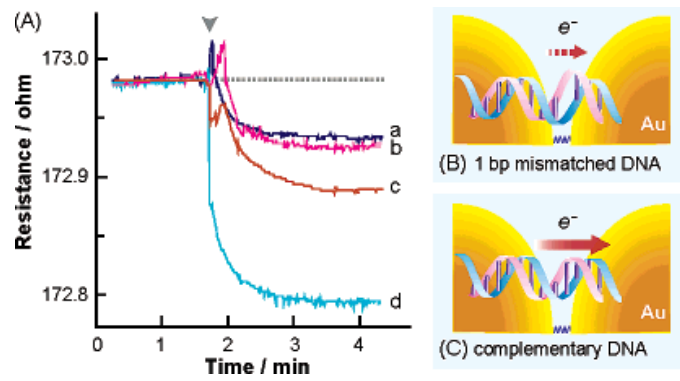
Τα αποτελέσματά τους συμπυκνώνονται στον παρακάτω πίνακα:

	Τεχνικά χαρακτηριστικά αισθητήρων, μεθοδολογία	Αποτελέσματα	Ακολουθίες DNA που χρησιμοποιήθηκαν	Παρατηρήσεις
Shiigi et al [25]	Χρησιμοποίησαν: 1) πλήρως συμπληρωματικό 2) 1 αστοχία βάσης 3) 4 αστοχίες βάσεων 4) 11 αστοχίες βάσεων	Γραμμική απόκριση σε συγκεντρώσεις 5-100μΜ. Ανάλογα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας 5 διαφορετικές ακολουθίες στα μόρια.	Πλήρως συμπληρωματικό: 3'-AGA GTT GAG CAT-5' 1 αστοχία βάσης: 3'-AGA GTT GAG CCT-5' 4 αστοχίες βάσεων: 3'-AGA GTT AAC TCT-5' 11 αστοχίες βάσεων: 3'-CCC CCC CCC CCC-5'	Συνυπολογισμός και της συνεισφοράς σε αντίσταση του ρυθμιστικού διαλύματος θεωρώντας ένα ισοδύναμο κύκλωμα τριών αντιστάσεων. Ευδιάκριτη η διαφορά στην απόκριση του αισθητήρα.
Ah et al [19]	Σχηματισμός αγώνιμης γέφυρας με τροποποιημένα μεDNA νανοσωματίδια εντός διαλύματος πάνω από τα ηλεκτρόδια.	Η διάταξη λειτουργήσε ως διακόπτης. Αποδίδουν την επιτυχή ανίχνευση της υβριδοποίησης με τη μετάβαση της διάταξης σε κατάσταση «ON» με αντίσταση $4 \cdot 10^8 \Omega$. Βλέπε εικόνα 9	Μόριο στόχος: 3'-C ₆ ATG CTC AAC CTC TAG GAC TTA CGC C ₆ -5' Μόρια δείκτες: 3'-C ₃ ATG CTC AAC TCT και TAG GAC TTA CGC C ₆ -5'	Παθητικοποίηση ηλεκτροδίων και ακινητοποίηση μορίων – δεικτών μόνο στην εκτεθειμένη επιφάνειά τους.
Chen et	I – V μετρήσεις μετά από	Στην πρώτη	Μόριο δείκτης:	Στη δεύτερη

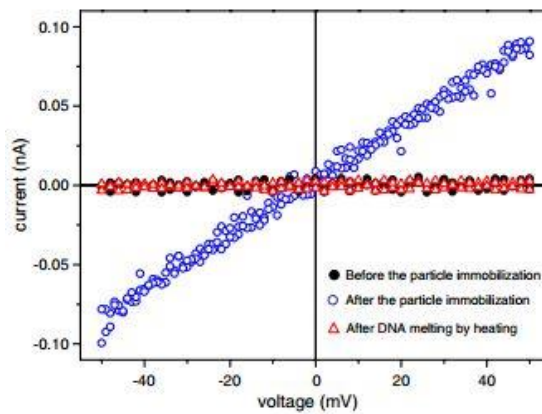
al [28]	<p>κάθε στάδιο κατασκευής. Ανάπτυξη νανοσωματιδίων Ag εντός των 27 – μερών μορίων DNA προς αύξηση της αγωγιμότητας. Ακινητοποίηση των κλώνων DNA πάνω σε ομοιόμορφο φιλμ νανοσωματιδίων Au. Βλέπε εικόνα 10.</p>	<p>προσέγγιση αύξηση της αγωγιμότητας της τάξης του 10^6 λόγω της μικρότερης απόστασης μεταξύ των νανοσωματιδίων. Στη δεύτερη προσέγγιση ενίσχυση της τάξης του 10^3.</p>	<p>3'- CCT AAT AAC AAT TTA TAA CTA TTC CTA - 5' Πλήρως συμπληρωματικό μόριο – στόχος: 5' – GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT- 3' Μόριο – στόχος με μία αστοχία: 5'- GGA TTA TTG TTA AAT ATT TAT AAG GAT- 3'</p>	<p>προσέγγιση έγιναν μετρήσεις σε DNA ακινητοποιημένα στην επιφάνεια με και χωρίς νανοσωματίδια. Η πρώτη περίπτωση δεν έδωσε αγωγιμότητα ($10^{13} \Omega - SNR 0.43$) . Η δεύτερη περίπτωση έδωσε ξεκάθαρο σήμα ($10^{11} \Omega$, SNR 50)</p>
Cheng et al [22]	<p>Αισθητήρας με τεχνολογία CMOS. Διάκενο 350 nm. Ενσωμάτωση θερμαντικών στοιχείων – αισθητήρων – αισθητήρων – θερμοκρασίας από πολυπυρίτιο για θραύση των δεσμών, ενισχυτή (κασκοδικό καθαρές ρεύματος) 5 βαθμίδων ($\sim 10^5$) για την ανίχνευση των σημάτων με κοινά πολύμετρα. Σύγκριση μεταξύ διατάξεων με ένα και πολλαπλά στρώματα νανοσωματιδίων Au. Για τον αισθητήρα βλέπε εικόνα 7(ζ).</p>	<p>Όριο ανίχνευσης 0.1 nM. Θράυση των δεσμών του πλήρως συμπληρωματικού κλώνου στους 48°C, του κλώνου με μία αστοχία στους 46°C.</p>	<p>cDNA: 3' – HS- AAA AAA ACC TAA TAA CAA T-5' μόριο – δείκτης: 3' – TTA TAA CTA TTC CTA AAA AAA AAA A-SH- 5' Μόριο – στόχος: 5' – GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT – 3' Μόριο – στόχος με μία αστοχία: 5' – GGA TTA TCG TTA AAT ATT GAT AAG GAT – 3'</p>	<p>Η μελέτη τους δείχνει μόνο το ρεύμα σταθερής κατάστασης, χωρίς να εξετάζει καθόλου την κινητική του προβλήματος. Οι δύο μελέτες δίνουν διαφορά στο ρεύμα της τάξης του 1000.</p>
Chang et al [20]	<p>Διάκενο 300 nm Νανοσωματίδια Au 12, 22, 40, 60 nm. Χρησιμοποιήθηκε βιολογικό υλικό συγκέντρωσης 10 pM μόνο.</p>		<p>cDNA: 3' – SH-A10CCT AAT AAC AAT-5' Μόριο – δείκτης: 3'-TTA TAA CTA TTC CTA A10 – SH – 5' Μόριο – στόχος: 5' – GGA TTA TTG TTA</p>	<p>Νανοσωματίδια 12 nm έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα. Δεν αναφέρουν σε που οφείλεται το βέλτιστο της λειτουργίας για τα νανοσωματίδια 12nm.</p>

	I- V μετρήσεις από -1 V ως +1V, 1mV/s. Για τον αισθητήρα βλέπε εικόνα 7(γ).		AAT ATT GAT AAG GAT-3'	
Chen et al [28]	Ηλεκτρόδια με διάκενο 72 nm probe DNA σε συγκεντρώσεις 1 nM, 1pM και 1fM σε ribperazineethanesulfonic acid (HEPES) I – V μετρήσεις σε τάσεις από -1 έως +2 V, 1mV/s. Οι μετρήσεις αγωγιμότητας έγιναν στα 2V. Λουτρό νερού 60 °C για θραύση δεσμών, 70 °C για απομάκρυνση του μορίου – στόχου.	Επιτυχής ανίχνευση της υβριδοποίησης. Κορεσμός αγωγιμότητας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1pM με συγκέντρωση 1nM στην επιφάνεια του δείγματος. Γενικά κορεσμός αγωγιμότητας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1 nM. Κατώτατο όριο ανίχνευσης: ~ fM.	Μόριο δείκτης: 3'- CCT AAT AAC AAT TTA TAA CTA TTC CTA - 5' Πλήρως συμπληρωματικό μόριο – στόχος: 5' – GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT- 3' Μόριο – στόχος με μία αστοχία: 5'- GGA TTA TTG TTA AAT ATT TAT AAG GAT- 3' (όμοια με [12])	Μετρήσεις αγωγιμότητας σε κάθε στάδιο της μελέτης.
Moreau et al [21]	Αισθητήρας που σε υποστρώμα InP, με ηλεκτρόδια In. Δεν αναφέρονται περισσότερα τεχνικά χαρακτηριστικά. Μετρήσεις τάσης στο διάστημα -0.1 έως 0.1 V, 100mV/s. Μετά από κάθε προσθήκη βιολογικού υλικού: 5 διαδοχικές μετρήσεις κάθε 10 λεπτά μέχρι τη σταθεροποίηση του συστήματος.	Επιτυχής ανίχνευση της υβριδοποίησης. Κατώτατο όριο ανίχνευσης : ~ 1pM	Μόριο δείκτης : 5'- NH2- CCA CTC GTG ACG CAT TCA CCT CAG CAG- CAC TCC TCC TCG G-3' Πλήρως συμπ/κό μόριο στόχος: 3'- tto647n-AGG TGA GCA CTG CGT AAG TGG AGT CGT CGT GAG GAG GAG CC-5' Μη συμπληρωματικό μόριο στόχος: 3'-tto647n-ACC ACT CGT GAC GCA TTC ACC TCA GCA GCA CTC CTC CTC GG-5'	Αύξηση της αγωγιμότητας κατά την υβριδοποίηση κατά το μέγιστο έως 60%

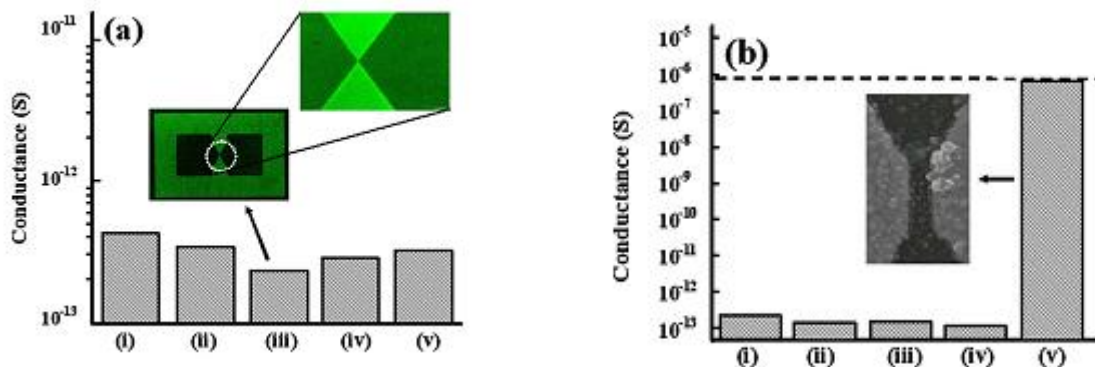
Πίνακας 2.1: Σύνοψη βιβλιογραφίας πειραμάτων με αισθητήρες τύπου αντίστασης.

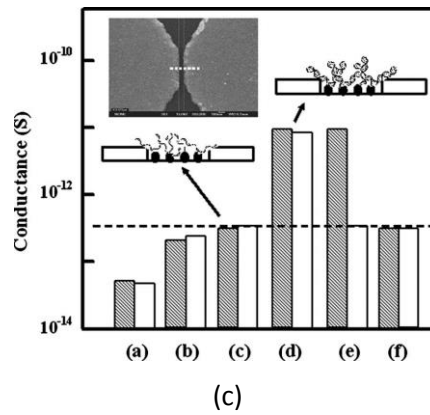


Εικόνα 2.7: (Α) Πτώση στην αντίσταση με την υβριδοποίηση (α) 11 αστοχών βάσεων, (β) 4 αστοχών βάσεων, (γ) αστοχίας μίας βάσης, (δ) πλήρως συμπληρωματικού κλώνου. Αγωγιμότητα φορέων στην περίπτωση: (Β) αστοχίας μίας βάσης, (Γ) πλήρως συμπληρωματικού κλώνου [25].

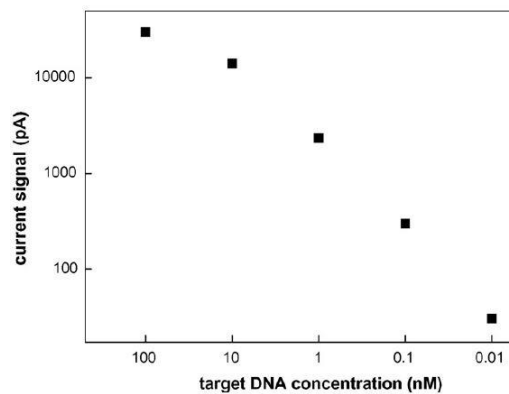


Εικόνα 2.8: Μετάβαση της διάταξης από κατάσταση “OFF” (κόκκινες κουκκίδες) σε κατάσταση “ON” γαλάζιες κουκκίδες [19].

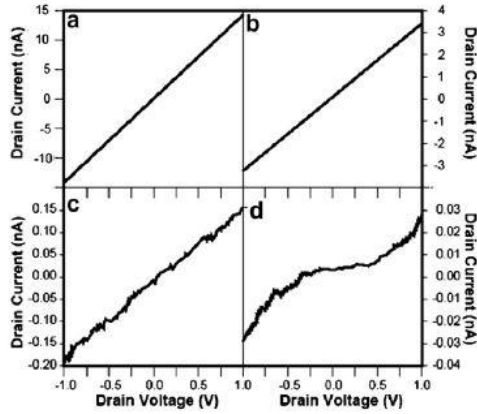




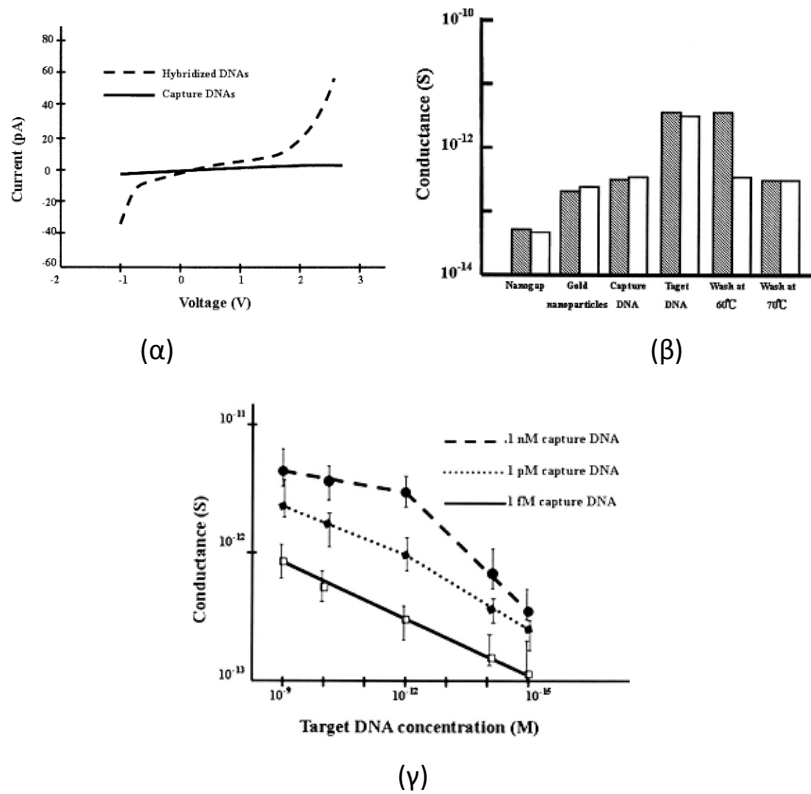
Εικόνα 2.9: (a) Αγωγιμότητα των δειγμάτων μετά από κάθε στάδιο της μελέτης. (i) Μετά την κατασκευή των ηλεκτροδίων (ii) Μετά την επίστρωση του υμενίου APTMS (3-aminopropyl-trimethoxysilane)(iii)Μετά την ακινητοποίηση του μορίου δείκτη DNA (iv) Μετά την ακινητοποίηση του μορίου στόχου DNA (v)Μετά από Silver ion treatment Ένθετο: Εικόνα φθορισμού με την παρουσία των μορίων – δεικτών. (b) Αγωγιμότητα των δειγμάτων μετά από κάθε στάδιο της μελέτης. Στο στάδιο (v) φαίνεται η ενίσχυση. Ένθετο: Νανοσωματίδια Ag στο δείγμα. (c): (a)Αγωγιμότητα του διάκενου, (b) Δείγμα με ομοιόμορφα κατανεμημένα νανοσωματίδια Au 10nm, (c) Αγωγιμότητα με ακινητοποιημένο το μόριο – δείκτη στην επιφάνεια, (d) Αγωγιμότητα μετά την υβριδοποίηση των δύο κλώνων, (e) Δείγμα μετά από λουτρό νερού 60 °C για απούβριδοποίηση (denaturation), (f) Δείγμα μετά από λουτρό νερού 70 °C. Τα γραμμοσκιασμένα χωρία παριστάνουν το πλήρως συμπληρωματικό μόριο ενώ τα λευκά παριστάνουν μόριο με μία αστοχία βάσης [27].



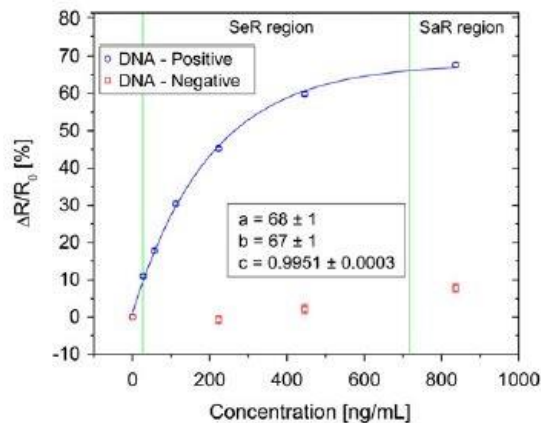
Εικόνα 2.10: Ρεύμα μόνιμης κατάστασης που διαρρέει τον αισθητήρα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του DNA – στόχου [22].



Εικόνα 2.11: Χαρακτηριστικές $I - V$ των αυτοοργανωμένων πολυεπιπέδων χρυσού με συγκέντρωση tDNA 10 pM και διαφορετικές διαμέτρους νανοσωματιδίων α) 12 nm, β) 22 nm, γ) 40 nm, δ) 60 nm [20].



Εικόνα 2.12: (α) $I - V$ μέτρηση πριν και μετά την υβριδοποίηση. (β) Μετρήσεις της αγωγιμότητας σε κάθε στάδιο της μελέτης. 5a: Διάκενο, 5b: Με νανοσωματίδια Au, 5c: με δείκτη - DNA (ssDNA), 5d: Με το πλήρως συμπληρωματικό κλώνο, 5e: Σε λουτρό νερού θερμοκρασίας 60°C, 5f: Μετά από λουτρό θερμοκρασίας 70°C για την απομάκρυνση των μορίων - στόχων. Τα γραμμοσκιασμένα χωρία υποδεικνύουν το πλήρως συμπληρωματικό μόριο ενώ τα λευκά χωρία τον κλώνο με τη μία ασοχία. (γ) Η αγωγιμότητα ως συνάρτηση των συγκεντρώσεων των μορίων - στόχων για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις μορίων - δεικτών [28].



Εικόνα 2.13: Απόκριση του αισθητήρα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης με αύξηση της αντίστασης. Με μπλε κουκκίδες συμβολίζεται το συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο και με κόκκινες το μη συμπληρωματικό [21].

Αξίζει να σταθούμε στη μελέτη των [25] γιατί υπολογίζουν συστηματικά τη συνεισφορά του ρυθμιστικού διαλύματος. Αρχικά κάνουν σύγκριση της αντίστασης του ζεύγους γυμνών ηλεκτροδίων σε ατμόσφαιρα αζώτου (120MΩ) και μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα (390 kΩ). Θεωρούν ένα ισοδύναμο κύκλωμα τριών αντιστάσεων εν παραλλήλω που είναι συνυπεύθυνες για τη διαρροή του ρεύματος. Η μετρούμενη αντίσταση λοιπόν θα είναι αποτέλεσμα:

- Της αντίστασης (ηλεκτρόνια) μεταξύ των νανοσωματιδίων Au.
- Της αντίστασης (ιοντική συνεισφορά) του ρυθμιστικού διαλύματος.
- Της αντίστασης των ηλεκτροδίων σε συνθήκες κενού 120 MΩ.

Θεωρώντας ότι το συνολικό ρεύμα από το διαλύτη δε μεταβάλλεται με τη μορφή και την πυκνότητα του φιλμ των νανοσωματιδίων, εκτίμησαν ότι οι αντιστάσεις του φιλμ και του διαλύτη είναι 172.96 Ω και 391 kΩ αντίστοιχα. Συμπεραίνουν λοιπόν ότι η συνεισφορά των διαλυτών είναι σχετικά μικρή για να επισκιάσει την πτώση της αντίστασης λόγω της υβριδοποίησης.

Η θεώρηση που κάνουν με τα ισοδύναμα κυκλώματα είναι πολύ συστηματική και θα μπορούσε να δοκιμαστεί και στη δική μας περίπτωση. Το συμπέρασμα των Shiigi και συνεργατών [25] για την ελάχιστη συνεισφορά των διαλυτών πρέπει να εξακριβωθεί. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας δεν είναι ξεκάθαρο αν επηρεάζει και σε ποιο βαθμό. Αν αντίστοιχα με τη θεώρηση των [25] απλοποιήσουμε το σύστημά και θεωρήσουμε τις αντιστάσεις του υμενίου των νανοσωματιδίων και των επαφών (contact resistance) ως το άθροισμά τους, δηλαδή:

$$R_{FILM} + R_{CONTACT} = R_{FC} \text{ (προφανώς η αντίσταση των διεπαφών θα είναι πολύ μικρή αλλά συμπεριλαμβάνεται για λόγους πληρότητας)}$$

και προσθέσουμε εν παραλλήλω την αντίσταση του διαλύτη R_{BUFFER} και αθροίσουμε τις συνεισφορές τους θα προκύψουν τα ακόλουθα:

Σημείωση: Τα $R_{CONTACT}$, $R_{ELECTRODES}$ εξαρτώνται από την κατασκευή του αισθητήρα (πάχος ηλεκτροδίων, προφίλ, υλικό μετάλλου κτλ) οπότε μπορούμε να θεωρήσουμε πως η αντίστασή τους μεταβάλλεται σε μικρό βαθμό οπότε τα θεωρούμε πάντα σταθερά.

Ας εφαρμόσουμε τον κανόνα της άθροισης παράλληλων αντιστάσεων:

$$R_{SENSOR} = R_{FC} R_{BUFFER} / (R_{FC} + R_{BUFFER})$$

Αν ισχύει ότι $R_{FC} \gg R_{BUFFER}$ τότε προκύπτει ότι $R_{SENSOR} \cong R_{BUFFER}$. Αντίστροφα, αν:

$$R_{FC} \ll R_{BUFFER}, \text{ τότε προκύπτει ότι } R_{SENSOR} \cong R_{FC}.$$

Η απλή αυτή άθροιση δείχνει πως για να εξασφαλίσουμε πως το ρυθμιστικό διάλυμα δεν επηρεάζει την αντίσταση του αισθητήρα σε μεγάλο βαθμό, θα πρέπει τα δείγματα να εμφανίζουν αρχικές αντιστάσεις μικρότερες του διαλύτη. Για την επιλογή των δειγμάτων δεν μπορούμε να κινηθούμε αυθαίρετα με βάση τον παραπάνω συλλογισμό αλλά θα πρέπει να συμπεριλάβουμε το γεγονός ότι σε μετρούμενες αντιστάσεις από μία τιμή και κάτω, τα υμένια είναι πλέον συνεχή και τα δείγματα πλέον βρίσκονται στη μεταλλική περιοχή και η διάδοση φορτίου μέσω του υμενίου θα κυριαρχήσει ισχυρά έναντι του μηχανισμού της διάδοσης μέσω του βιολογικού υλικού. Επομένως η προσθήκη των ολιγομερών δεν αναμένεται να επηρεάσει την αντίσταση του αισθητήρα, αναμένεται δηλαδή η διακριτική ικανότητα να είναι μάλλον μειωμένη. Αντιθέτως, για τα πειράματά μας απαιτούνται αισθητήρες που η αντίστασή τους βρίσκεται στη γειτονιά του κατωφλίου αγωγιμότητας (percolation threshold). Συστοιχίες αισθητήρων που εμφανίζουν ανάλογες αντιστάσεις της τάξης των 10 MΩ (στον αισθητήρα με διάκενο 30 μm) είναι οι ιδανικότεροι, αφού η μέση πυκνότητα των νανοσωματιδίων και η μέση απόσταση μεταξύ τους δείχνουν να ταιριάζουν με αυτές που απαιτούνται.

Η θεώρηση, ωστόσο, του μοντέλου των παραλλήλων αντιστάσεων από τους Shiigi et al υποκρύπτει μια παραδοχή που δεν είναι ευδιάκριτη με την πρώτη ανάγνωση. Οι Shiigi και συνεργάτες υπέθεσαν σιωπηρά ότι το υμένιο των νανοσωματιδίων αποτελεί ένα συνεχές μέσο, ότι δεν αλληλεπιδρά σε μικροσκοπικό επίπεδο με το ρυθμιστικό διάλυμα και ότι απλά ανταγωνίζονται στη μετάδοση του φορτίου με διαφορετικές μακροσκοπικά μετρούμενες αντιστάσεις. Στην πραγματικότητα, όμως, η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη αφού τα ιόντα και τα δίπολα του ρυθμιστικού διαλύτη διαβρέχουν την επιφάνεια των νανοσωματιδίων με αποτέλεσμα γίνεται φυσική προσρόφηση (physical adsorption) αυτών στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων.

Η μελέτη που έγινε από τους Moreau et al [21] δε συνάδει με τη γενικότερη τάση της επιστημονικής κοινότητας όσον αφορά την αγωγιμότητα. Στη συγκεκριμένη δημοσίευση, βέβαια, δεν αναφέρουν καθόλου αν οι τιμές που παρατηρούνται στα γραφήματα αναφέρονται σε απόλυτες τιμές ή όχι. Επίσης, δημιουργεί αίσθηση το γεγονός του ότι η μεθοδολογία που χρησιμοποιούν είναι παρόμοια με τις υπόλοιπες δημοσιεύσεις αλλά αυτοί λαμβάνουν αντίθετα αποτελέσματα. Είναι απορίας άξιο το ότι δεν σχολιάζουν καθόλου την προέλευση αυτής της συμπεριφοράς.

2.2.2 Αισθητήρες Ηλεκτροχημικής Φασματοσκοπίας Εμπέδησης

Η ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης αποτελεί ένα πολύ αξιόπιστο και ευαίσθητο εργαλείο για την ανίχνευση αλλαγών κοντά στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων λόγω της συνεισφοράς τόσο της ωμικής αντίστασης αλλά και της χωρητικότητας.

Θα γίνει μια σύντομη αναφορά της λογικής της ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδηση και θα παρουσιαστούν οι βασικότεροι φυσικοί μηχανισμοί που μοντελοποιούνται με τα βασικότερα διακριτά στοιχεία. Στη συνέχεια, θα αναφερθούν τα συνηθέστερα ισοδύναμα κυκλώματα που απαρτίζονται από τα ως άνω στοιχεία. Στο τέλος του εδαφίου αυτού θα γίνουν αναφορές σε συγκεκριμένες μελέτες και τα αποτελέσματά τους στην ανίχνευση της υβριδοποίησης του βιολογικού υλικού.

Γενικά οι μη φαρανταϊκές μετρήσεις εμπέδησης αποτελούν ένα πολύ δυνατό εργαλείο για την ανάλυση των ιδιοτήτων των διεπιφανειών των τροποποιημένων ηλεκτροδίων αφού δεν απαιτούνται αισθητήρες τριών ηλεκτροδίων ή DNA με ηλεκτροενεργές απολήξεις [29].

2.2.2.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Στη φασματοσκοπία εμπέδησης συναντώνται φαινόμενα τα οποία αποκλίνουν κάπως από αυτά που περιγράφονται από ιδανικά κυκλώματα με τη χρήση αντιστατών, ιδανικών χωρητικοτήτων και ιδανικών αυτεπαγωγών. Συνήθως, επειδή τα φαινόμενα που εξετάζονται οφείλονται στη χωρητικότητα, θα ορίσουμε την ποσότητα Phasance η οποία θα ισούται με $1/(\omega C)^{\alpha}$ όπου ο εκθέτης α μπορεί να λαμβάνει τιμές στο διάστημα $[-1, 1]$. Όταν ο α λάβει την τιμή -1 αντιστοιχεί σε ιδανική αυτεπαγωγή. Όταν αυτός λάβει την τιμή 0 τότε η ποσότητα αντιστοιχεί σε ωμική αντίσταση και όταν λάβει την τιμή 1 σε ιδανική χωρητικότητα. Συνήθως, όμως, ο εκθέτης α θα λαμβάνει τιμές στο διάστημα $[0,1]$. Η ποσότητα αυτή οφείλεται στην ανομοιόμορφη κατανομή μιας φυσικής ποσότητας (όπως η χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας, η διηλεκτρική συνάρτηση κτλ) πάνω στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων [24] , [30].

Όταν ο α λάβει την τιμή 0.5 τότε η ποσότητα $1/\sqrt{\omega C}$ καλείται στοιχείο Warburg και είναι υπεύθυνο για τη μοντελοποίηση της διάχυσης σε συστήματα με ηλεκτρολύτες. Όταν ο α δεν

λαμβάνει κάποιες από τις παραπάνω τιμές τότε αναφερόμαστε στην έκφραση ως «στοιχείο σταθερής φάσης». Στην εικόνα 2.14 φαίνονται μερικά βασικά κυκλώματα που μοντελοποιούν τους συνηθέστερους φυσικούς μηχανισμούς:

(α) Ένα απλό μοντέλο που περιγράφει για παράδειγμα ένα μη – ιδανικό διηλεκτρικό το οποίο διαρρέουν ρεύματα αγωγιμότητας.

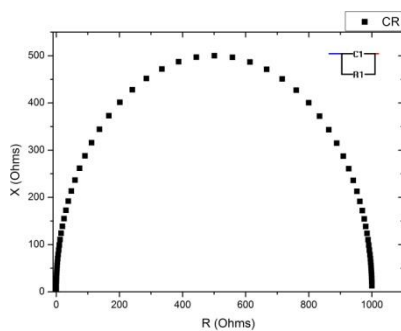
(β) Σύστημα που επιδεικνύει ιδανικά χωρητική συμπεριφορά.

(γ) Μοντέλο του Randles σύμφωνα με το οποίο τα ρεύματα που διαρρέουν την ηλεκτροχημική κυψελίδα οφείλονται αφενός στην ηλεκτροχημική διπλοστοιβάδα αλλά και στη συνολική χωρητικότητα της ηλεκτροχημικής κυψελίδας.

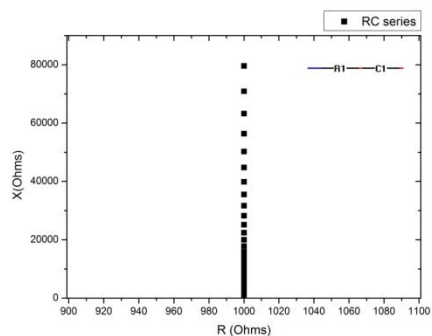
(δ) Το κύκλωμα αυτό μοντελοποιεί ένα σύστημα που υπάρχει διάχυση, όπως για παράδειγμα διάχυση μάζας σε πορώδη ηλεκτρόδια, ακόμη χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη συμπεριφορά των οξειδοαναγωγικών ζευγών κοντά στην επιφάνεια ηλεκτροδίων Ensafi et al [14]

(ε) Το στοιχείο σταθερής φάσης με ολοένα αυξανόμενους συντελεστές. Όταν $\alpha = 0.99$ τότε το γράφημα τείνει να γίνει όπως αυτό της (α).

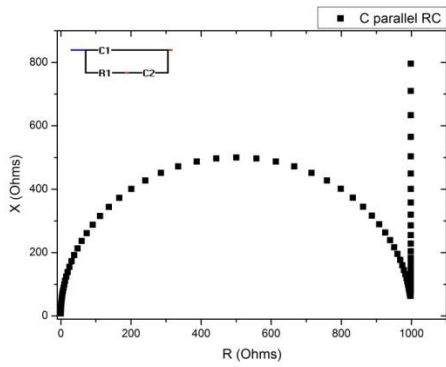
(στ) Δύο κυκλώματα της εικόνας (α) που υπερτίθενται. Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται σε κάποια ατέλεια των ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα να συνεισφέρουν και τα ηλεκτρόδια στα φαινόμενα που συμβαίνουν στην επιφάνειά τους [24], [31].



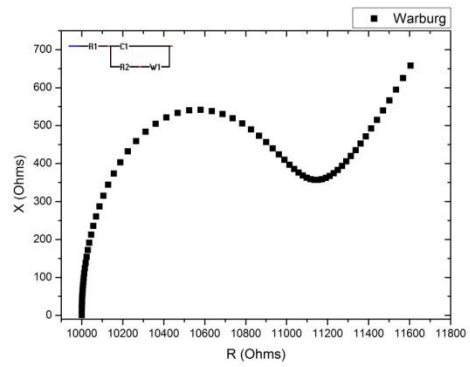
(α)



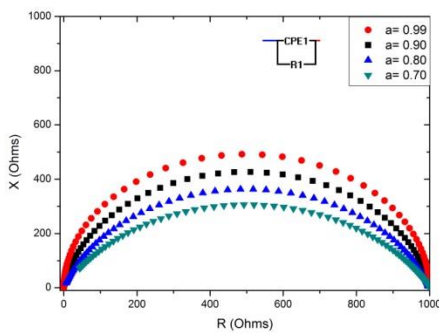
(β)



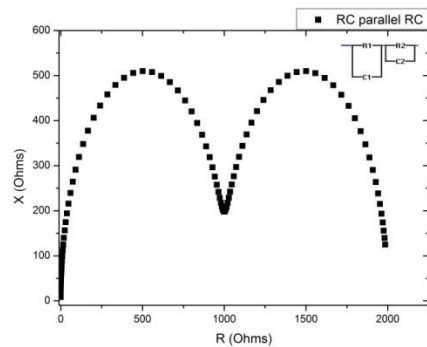
(γ)



(δ)



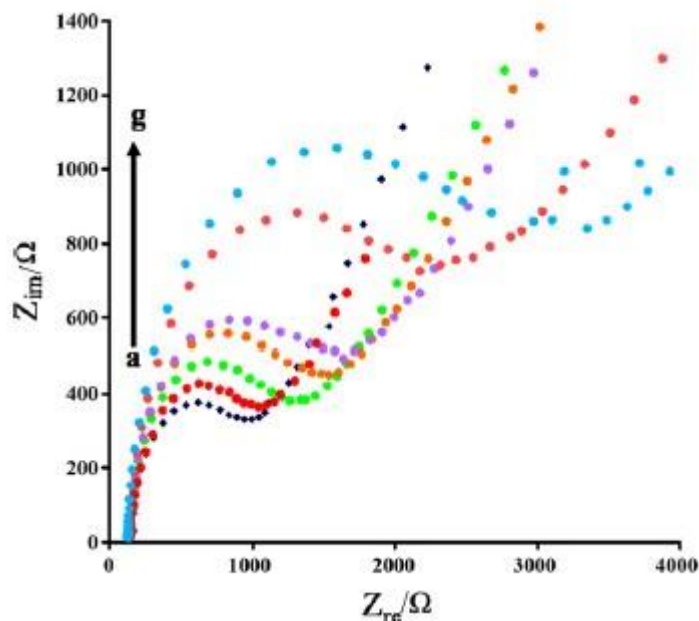
(ε)



(στ)

Εικόνα 2.14: Φάσματα εμπέδησης από: **(α)** RC παράλληλο, **(β)** RC εν σειρά, **(γ)** κυκλωμα Randles, **(δ)** στοιχείο Warburg, **(ε)** στοιχείο σταθερής φάσης με τον εκθέτη μεταξύ των τιμών 0.70 έως 0.99, **(στ)** δύο RC παράλληλα συνδεδεμένα εν σειρά.

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε και για την ανίχνευση της υβριδοποίησης του DNA με αρκετά ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Οι μετρήσεις έγιναν [32] για να εξακριβωθεί τόσο η ακινητοποίηση όσο και η υβριδοποίηση του συμπληρωματικού κλώνου. Το φάσμα εμπέδησης εμφάνισε ένα ημικύκλιο στις υψηλές συχνότητες και ένα γραμμικό μέρος στις χαμηλές συχνότητες (βλέπε εικόνα 2.15) που σχετίζεται με τη διάχυση των ηλεκτροχημικών διεργασιών. Η ακτίνα του κάθε ημικυκλίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σημείο αναφοράς για να χαρακτηρίσει την τροποποίηση του αισθητήρα σε κάθε στάδιο. Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική μπόρεσαν να μετρήσουν αξιόπιστα συγκεντρώσεις με κατώτατο όριο ανίχνευσης 1pM.



Εικόνα 2.15: Βαθμονόμηση του αισθητήρα για το υβριδοποιημένο DNA. Τα γραφήματα παριστάνουν την απόκριση μέσα σε: (a) διάλυμα χωρίς ολιγομερή, (b) 7 pM, (c) 53 pM, (d) 100 pM, (e) 500 pM, (f) 11,5 nM, (g) 0.2 μM. Η υβριδοποίηση έλαβε χώρα στους 40 ° C για 90 λεπτά σε pH 6,87 [28].

Οι [33] αναφέρουν πως έγιναν μελέτες τόσο σε συμπληρωματικούς και μη συμπληρωματικούς κλώνους όσο και σε αστοχίες σε διαφορετικές θέσεις. Προσδιορίστηκε και το κατώφλι ανίχνευσης του αισθητήρα. Χρησιμοποιήθηκαν, ακόμη, διαφορετικές αλυσίδες DNA με μήκος 18, 25 και 37 βάσεων. Επίσης, οι αισθητήρες επαναχρησιμοποιούνταν έως και 12 φορές μετά από μία διαδικασία θραύσης των δεσμών του DNA. Για την «θωράκιση» των ηλεκτροδίων από τη δημιουργία μη στοχευμένων δεσμών (non specific binding) χρησιμοποίησαν διάλυμα MCB. Αναφέρει πως οι μετρήσεις εμπέδησης έγιναν στα ίδια ηλεκτροχημικά κελιά που είχαν χρησιμοποιηθεί σε μετρήσεις βολταμετρίας. Αυτό δείχνει τη συμβατότητα μεταξύ των τεχνικών αυτών.

2.2.2.2 Συζήτηση

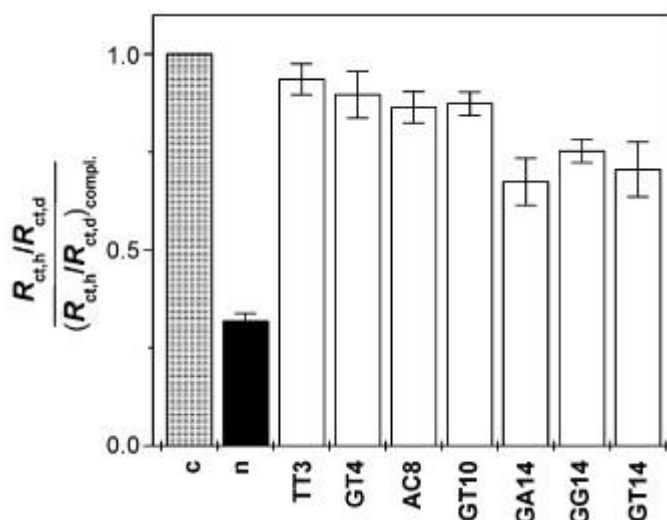
Οι [29] αναφέρουν πως έχουν γίνει μελέτες για αισθητήρες τύπου αντίστασης που μετρούν την αντίσταση της επιφάνειας του αισθητήρα και αντίστοιχα για χωρητικούς αισθητήρες για να καταλήξει πως και οι δύο ιδιότητες ενσωματώνονται στην ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης.

Ενδιαφέρον είναι πως η εμπέδηση αυξάνεται μετά την υβριδοποίηση. Το χωρητικό μέρος της εμπέδησης Z'' είναι λογικό να αυξάνεται μετά την υβριδοποίηση αφού κατά την υβριδοποίηση ο κλώνος – στόχος «παραμερίζει» τα μόρια που είναι υπεύθυνα για τη χωρητικότητα διπλοστοιβάδας. Δεν είναι, όμως, ξεκάθαρο ποια πορεία ακολουθεί το πραγματικό μέρος της εμπέδησης, Z' . Αν αυτό

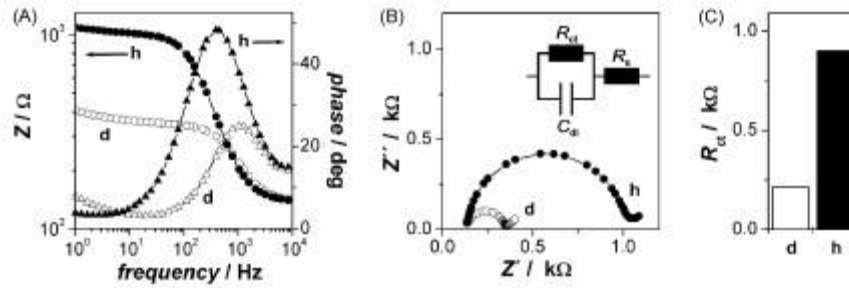
μειώνεται αλλά η μείωσή του εξουδετερώνεται από την αύξηση του Z'' τότε υπάρχει συμβατότητα μεταξύ των δύο προσεγγίσεων. Αν όμως η ωμική αντίσταση αυξάνεται, τότε μάλλον θα πρέπει να στραφεί κανείς στους μηχανισμούς αγωγιμότητας εναλλασόμενου ρεύματος.

Αναφέρουν, ακόμη, πως δεν χρειάστηκε να συμπεριλάβουν στοιχείο Warburg στην ανάλυση των δεδομένων τους αφού στο διάστημα των συχνοτήτων που επέλεξαν δεν παρατηρείται διάχυση και η εμπέδηση της διεπιφάνειας ήταν το φαινόμενο που κυριαρχεί. Τέλος Προσδιόρισαν ότι το κατώτατο όριο ανίχνευσης του αισθητήρα ήταν στα 100nM καθώς και ότι μάλλον υπάρχει εξάρτηση της αντίστασης σε σχέση με τη θέση μίας αστοχίας στο DNA.

Τέλος, διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύτη έχει επίδραση στην ευαισθησία του αισθητήρα λόγω του αρνητικού φορτίου του ακινητοποιημένου DNA. Για το λόγο αυτό δοκίμασαν διάφορες συγκεντρώσεις διαλύτη ώστε να προσδιορίσουν αυτή που επηρέαζε λιγότερο τον αισθητήρα.



Εικόνα 2.16: Στην εικόνα φαίνεται η απόκριση σε:1) πλήρως συμπληρωματικό κλώνο, 2) μη συμπληρωματικό κλώνο και στη συνέχεια οι αστοχίες σε κάθε μόριο καθώς και η θέση τους στην ακολουθία. Οσο πλησιέστερα είναι η αστοχία στο ηλεκτρόδιο τόσο αυξάνεται ο λόγος της R_{ct} [29].

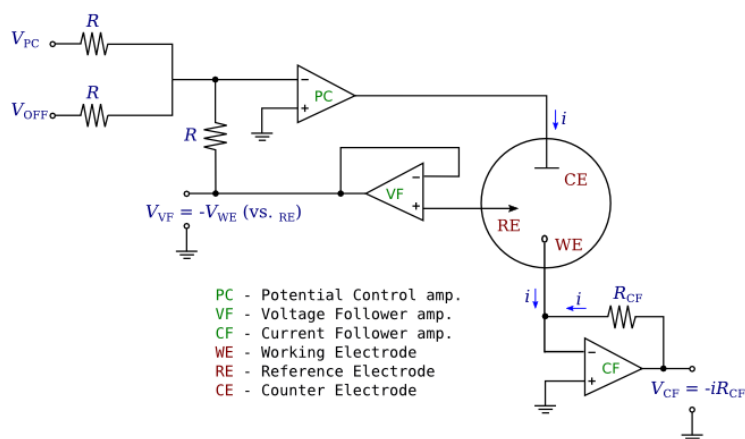


Εικόνα 2.17: (A) Διάγραμμα Bode στο οποίο φαίνεται η διαφορά στην εμπέδηση μεταξύ των δειγμάτων γίνεται αισθητή για συχνότητες κάτω των 30 Hz. (B) Διάγραμμα Nyquist και το ισοδύναμο κύκλωμα που μοντελοποιεί το φαινόμενο. (C) Η αντίσταση μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Το d αντιπροσωπεύει το μόριο που έχει αποδιαταχθεί (denatured molecule), ενώ το h αντιπροσωπεύει το υβριδοποιημένο μόριο (hybridized molecule) [29].

2.2.3 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες

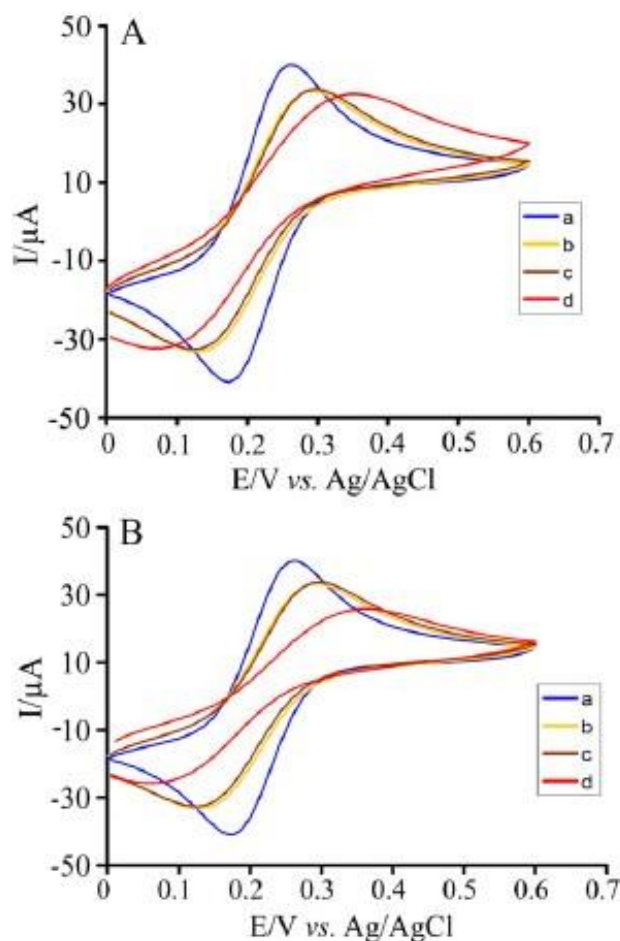
Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι (κυκλική βολταμετρία, αμπερομετρία) αποτελούν μία πολύ αξιόπιστη και ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση βιολογικών συμβάντων, όπως στην περίπτωση μας, η ανίχνευση της υβριδοποίησης. Ο λόγος που αναφέρονται ενδεικτικά, χωρίς να γίνει εκτεταμένη ανάλυση των χαρακτηριστικών τους είναι γιατί η διεξαγωγή τέτοιων ηλεκτροχημικών μετρήσεων απαιτεί, εν γένει, διαφορετική προσέγγιση τόσο σε επίπεδο διατάξεων όσο και σε επίπεδο των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα (εμφανίζονται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις). Οι τυπικές διατάξεις που χρησιμοποιούνται είναι τριών ηλεκτροδίων (ηλεκτρόδιο εργασίας, ηλεκτρόδιο αναφοράς και βοηθητικό ηλεκτρόδιο). Το ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι μικρής επιφάνειας σε σχέση με τα άλλα δύο και αποτελείται από αδρανές υλικό (C, Ag/AgCl, Pt, Au κτλ), ώστε να μην επηρεάζει τις αντιδράσεις που συμβαίνουν στο διάλυμα.

Η διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς και του ηλεκτροδίου εργασίας διατηρείται σταθερή μέσω ενός ποτενσιοστάτη (εικόνα 2.18) ο οποίος μεταβάλλει το ρεύμα του βοηθητικού ηλεκτροδίου (counter electrode) που διαρρέει την ηλεκτροχημική κυψελίδα.



Εικόνα 2.18: Απλουστευμένο κύκλωμα ποτενσιοστάτη [34].

Ενδεικτικά αναφέρεται μία μελέτη που χρησιμοποίησε κυκλική βολταμετρία για να ανιχνεύσει έμμεσα την υβριδοποίηση μέσω της οξειδοαναγωγής του $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$. Οι [32] ανίχνευσαν την υβριδοποίηση 25-μερών γονιδίων που ευθύνονται για την εμφάνιση καρκίνου, λευχαιμίας και άλλων ασθενειών.



Εικόνα 2.19: Η κυκλική βολταμετρία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους $Fe(CN)_6^{4-/3-}$. Οι δύο κορυφές απέχουν μεταξύ τους 88 mV. **(a)** Ηλεκτρόδιο χρυσού με νανοσωματίδια χρυσού, **(b)** ηλεκτρόδια, νανοσωματίδια και κλώνος – ιχνηλάτης, **(c)** ηλεκτρόδια, νανοσωματίδια χρυσού μετά την υβριδοποίηση με τον πλήρως συμπληρωματικό κλώνο, **(d)** μετά την υβριδοποίηση με κλώνο που περιέχει μία αστοχία. Ρυθμός σάρωσης 50 mV/s.

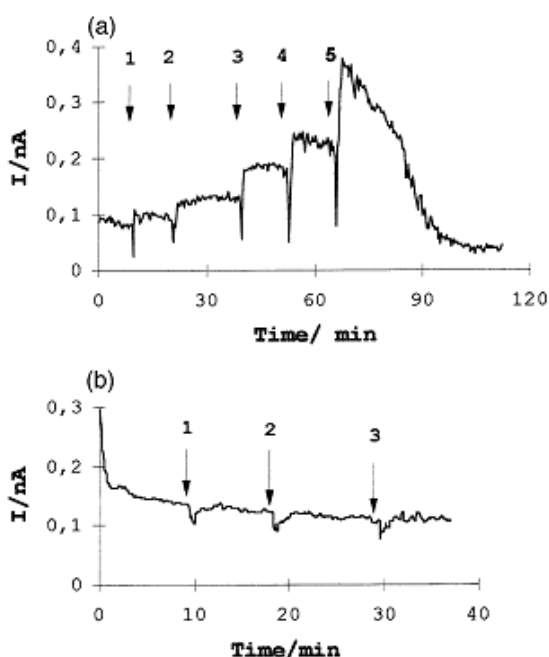
Η αντίσταση της μεταφοράς ηλεκτρονίων (συναντάται όταν υπάρχουν φαινόμενα οξειδοαναγωγής) παρουσίασε γραμμικότητα ως συνάρτηση με το λογάριθμο των συγκεντρώσεων των συμπληρωματικών κλώνων. Η προσέγγισή τους εμφάνισε δηλαδή αξιόπιστα αποτελέσματα και ο αισθητήρας είχε καλή διακριτική ικανότητα μεταξύ πλήρως συμπληρωματικού κλώνου και κλώνου με μία αστοχία.

Στη δική μας όμως περίπτωση τα μετρούμενα μεγέθη (τάση, αντίσταση) είναι μη – φαρανταϊκά (non faradaic) αφού οφείλονται κυρίως στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δύο

κλώνων του DNA (ιχνηλάτης – στόχος) και πιθανόν σε ρεύματα χωρητικότητας από τη χωρητικότητα διπλού στρώματος (double layer) από τα ιόντα που βρίσκονται πάνω από τα ηλεκτρόδια και όχι σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.

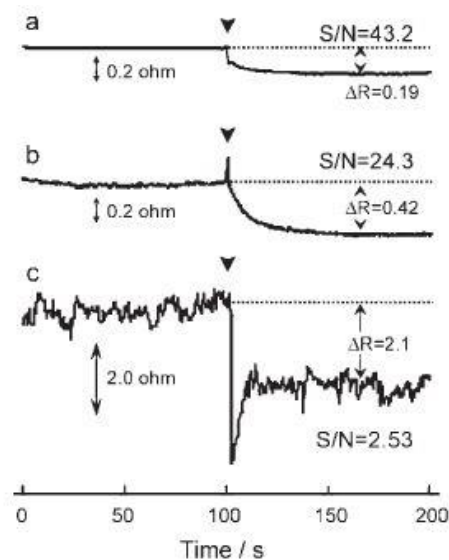
Υπάρχουν, παρ' όλα αυτά, κάποιες μελέτες με αρκετές ομοιότητες με αυτή που επιχειρήθηκε στην παρούσα εργασία. Οι δημοσιεύσεις των Tokonami et al [17] και των Hianik et al [18] έγιναν χρησιμοποιώντας διατάξεις δύο ηλεκτροδίων (ηλεκτρόδιο εργασίας και βοηθητικό ηλεκτρόδιο ή ηλεκτρόδιο εργασίας και ηλεκτρόδιο αναφοράς). Στα φαινόμενα που μελέτησαν δεν συμμετείχαν φαρανταϊκές διεργασίες. Μπορούμε, λοιπόν, με σχετική ασφάλεια να χρησιμοποιήσουμε τα συμπεράσματά τους για τη δική μας μελέτη.

Οι Hianik et al [18] χρησιμοποίησαν ένα ηλεκτρόδιο χρυσού διαμέτρου 500 μm πάνω στο οποίο έγινε η εναπόθεση των μορίων – δεικτών. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποίησαν ένα ηλεκτρόδιο Ag/ AgCl το οποίο τοποθέτησαν σε ένα πλαστικό δοχείο με 1.5 w/w Άγαρ – Άγαρ και 1M KCl για να κρατηθεί σταθερό το δυναμικό και να μην υπάρχει αλληλεπίδραση των ηλεκτροδίων. Η τεχνική τους χρησιμοποιεί αμπερομετρία, που ενώ δεν χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, η απόκριση του συστήματος τους εμφανίζει αρκετές ομοιότητες.



Εικόνα 2.20: (a) Μεταβατικές μετρήσεις του ρεύματος σε πλήρως συμπληρωματικό DNA σε συγκεντρώσεις: 1)117 nM, 2) 225 nM, 3) 326 nM, 4) 420 nM, 5) 510 nM. (b) Σε 15 - μερή μη συμπληρωματικό σε συγκεντρώσεις: 1) 30, 2) 117, 3) 226 nM.

Οι Tokonami et al [20] κατασκεύασαν μια πολυεπίπεδη διάταξη νανοηλεκτροδίων με νανοσωματίδια χρυσού 12 nm τα οποία στηρίζονταν πάνω σε νανοσωματίδια χρυσού διαμέτρου 46 nm, όπως φαίνεται και από την εικόνα 2.28δ. Τα νανοσωματίδια κατασκευάστηκαν εντός κολλοειδών διαλυμάτων. Η ακινητοποίηση των μοριακών συνδετήρων (groove binders) από dithiol καθώς και των κλώνων του DNA στα νανοσωματίδια έγινε στα ίδια διαλύματα. Στη συνέχεια ακινητοποίησαν τα νανοσωματίδια με διάμετρο 46 nm πάνω στις διατάξεις με τα ηλεκτρόδια. Στα νανοσωματίδια αυτά είχαν προστεθεί οι μοριακές απολήξεις για την επιτυχή πρόσδεση των μικρότερων νανοσωματιδίων (12nm) στα οποία ήταν προσδεδεμένα τα μόρια – δείκτες. Τέλος, η υβριδοποίηση γινόταν με ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) πάνω στον αισθητήρα που περιείχε τα μόρια – στόχους. Οι μετρήσεις έγιναν με πολύμετρο χρησιμοποιώντας συνδεσμολογία δύο ακροδεκτών και διαπίστωσαν πως το συνολικό ρεύμα που διαρρέει τον αισθητήρα οφείλεται αφενός στη διάχυση των ιόντων του διαλύτη και αφετέρου στη μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου του φιλμ των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 2.21: Πτώση της αντίστασης με το χρόνο. Τα φιλμ των δειγμάτων έχουν αρχικές αντιστάσεις 173, 702 και 1312 Ω.

2.2.4 Συμπεράσματα

Εξάρτηση της απόκρισης του αισθητήρα από την ιοντική αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος

Στους αισθητήρες τύπου αντίστασης αξιοποιείται αφ' ενός η ιδιότητα του DNA να άγει φορτίο διαμέσου της αλυσίδας του. Υπάρχει περίπτωση όμως, σε μακροσκοπική κλίμακα, να συνεισφέρουν και άλλα φαινόμενα στην απόκριση ενός αισθητήρα. Τέτοια είναι αφ' ενός η ιοντική

αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και αφ' ετέρου η αλλαγή της χωρητικότητας του ενδιάμεσου χώρου των νανοσωματιδίων ίσως λόγω του σχηματισμού διπλής στοιβάδας.

Οι μελέτες πάνω στις οποίες βασίστηκε η παρούσα εργασία ([17], [18] , [20], [21] , [22], [25], [27], [28]) αναφέρουν πως η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος επηρεάζει ελάχιστα τον αισθητήρα (συνεισφορά μικρότερη του 10%). Αντίθετα οι Kafka et al [33] αναφέρουν ότι το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) έχει μια μη αμελητέα συνεισφορά στην ευαισθησία λόγω της αλληλεπίδρασης των ιόντων και των πολικών μορίων με τους αρνητικά φορτισμένους κλώνους του DNA. Για αυτό το λόγο προσάρμοσαν την συγκέντρωση του διαλύτη στα επιθυμητά επίπεδα.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως υπάρχει η δυνατότητα ελαχιστοποίησης της οποιαδήποτε συνεισφοράς που μπορεί να αλλοιώσει την ευαισθησία του αισθητήρα με την αραίωση του διαλύματος με διπλά αποσταγμένο νερό.

Μέγεθος αλυσίδων DNA που χρησιμοποιήθηκαν – Εξάρτηση της αγωγιμότητας από την ακολουθία των βάσεων

Το πλεονεκτήματα του μήκους των αλυσίδων που χρησιμοποιήθηκαν είναι αρκετά σε σχέση με τα αντίστοιχα στη βιβλιογραφία. Για τη μέτρηση της απόκρισης ενός αισθητήρα σε περιβάλλον που υπάρχει βιολογικό υλικό μέσα σε ένα διάλυμα έχουν χρησιμοποιηθεί μόρια DNA των οποίων το μήκος κυμαίνεται από 18 έως 40 βάσεις. Στην προσέγγιση που επιχειρήθηκε σε αυτή τη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ολιγομερή μήκους 15 βάσεων.

Το μήκος του DNA διαδραματίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην ανίχνευση της υβριδοποίησης. Για να ευνοείται η υβριδοποίηση μεταξύ των κλώνων απαιτείται αυτοί να είναι ευθείς και να σχηματίζουν μία μικρή γωνία με την κατακόρυφο. Όταν τα μόρια έχουν μικρά μήκη, προσανατολίζονται σχεδόν κατακόρυφα, κυρίως λόγω απώσεων Coulomb στο εσωτερικό τους. Αυτό αυξάνει την απόσταση των κλώνων μεταξύ τους και διευκολύνει τη διάχυση των μορίων – στόχων. Όταν, από την άλλη, το μήκος τους αυξάνεται δεν είναι πάντα σίγουρο ότι θα τηρούν τον ίδιο προσανατολισμό. Υπάρχει πολύ μεγάλη πιθανότητα να απλωθούν στην επιφάνεια του αισθητήρα σχηματίζοντας ένα συνεχές φιλμ, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα να υβριδοποιηθούν άλλα μόρια εκτός αυτών που βρίσκονται στην επιφάνεια του φιλμ.

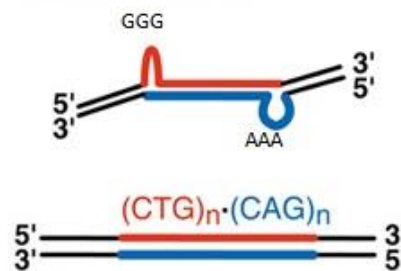
Σημαντικό επίσης είναι να υπάρχει αρκετός ενδιάμεσος χώρος για να μπορέσει το μόριο – στόχος να φτάσει και να προσανατολιστεί με το μόριο – δείκτη. Ο επαρκής χώρος ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση μορίων – δεικτών στην επιφάνεια του δείγματος. Γενικότερα προτείνεται η, κατά το δυνατό, χρήση μικρών συγκεντρώσεων για να μην δυσχεραίνεται η υβριδοποίηση.

Ένα ολιγομερές 15 βάσεων έχει μήκος περίπου 6 nm. Η απόσταση αυτή είναι πολύ μικρή για να γεφυρωθεί με ηλεκτρόδια που χωρίζονται από νανοδιάκενο, αλλά από την άλλη, δεν είναι δύσκολο να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τα νανοσωματίδια μικρής διαμέτρου.

Η ακολουθία διαδραματίζει, όπως είδαμε, κείριο ρόλο στην αγωγιμότητα των κλώνων. Επομένως, θεωρητικά, η κατασκευή ενός μορίου DNA που αποτελείται μόνο από ζεύγη γουανίνων – κυτοσίνων φαντάζει η βέλτιστη λύση. Πρακτικά όμως, η εικόνα είναι πολύ διαφορετική. Είναι ύψιστης σημασίας ο σχεδιασμός του DNA να μη δημιουργήσει ανεπιθύμητες καταστάσεις όπως η αυτό - υβριδοποίηση (self-hybridization) καθώς και η αναδίπλωση (hairpin) κατά την υβριδοποίηση. Οι [22], [25] χρησιμοποίησαν μόρια με αλληλουχίες που περιείχαν πολλές διαδοχικές αδενίνες και πολλές διαδοχικές γουανίνες αντίστοιχα. Αυτό θα μπορούσε να δημιουργήσει λανθασμένες ευθυγραμμίσεις ή δομές “hairpin” στους κλώνους συμπαρασέρνοντας έτσι και τα γειτονικά μόρια. Στην [21] ακόμη περισσότερο, επειδή όλος ο κλώνος αποτελείτο από γουανίνες (και ο συμπληρωματικός του από κυτοσίνες). Ο κακός σχεδιασμός των μορίων ευνοεί τέτοιες επιπλοκές που είναι πολύ πιθανό να συνέβησαν αν επιπλέον αναλογιστεί κανείς πως το μήκος του κλώνου ήταν 24 βάσεις (βλέπε εικόνα 2.22).

Στη δική μας προσέγγιση, τα μόρια που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να μην είναι δυνατός ο σχηματισμός καμίας τέτοιας αστοχίας. Έτσι είναι σίγουρο πως η υβριδοποίηση θα ακολουθήσει την πορεία που αναμένεται χωρίς το κάθε μόριο να δυσχεράνει την υβριδοποίηση των γειτονικών του.

Λανθασμένη ευθυγράμμιση DNA (hairpin)

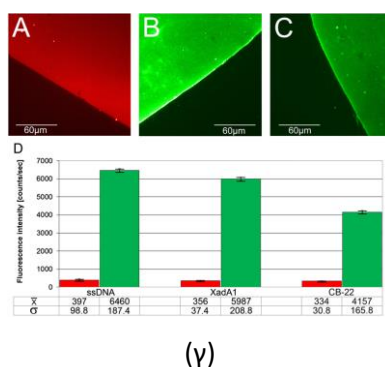
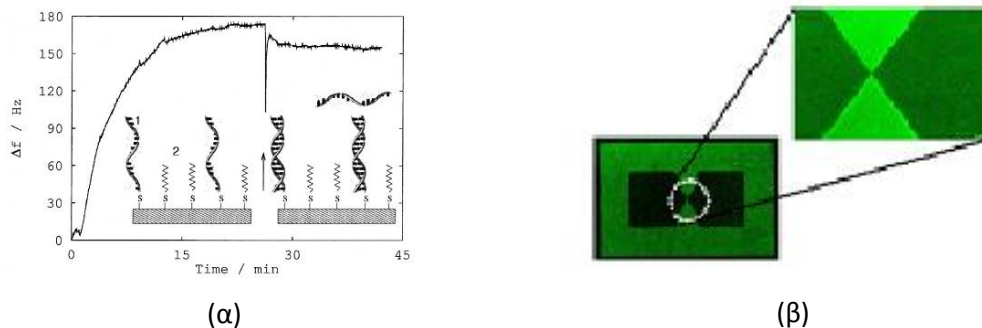


Εικόνα 2.22: Πάνω: Λανθασμένη σχεδίαση του DNA και κακή ευθυγράμμιση με δημιουργία δύο hairpins. Κάτω: Επιτυχής ευθυγράμμιση και υβριδοποίηση [35].

Πειράματα ελέγχου

Οι Hianik et al [18] για να επαληθεύσουν την επιτυχή πρόσδεση των ολιγομερών – στόχων στην επιφάνεια του δείγματός τους χρησιμοποίησαν την τεχνική QCM και διαπίστωσαν πως τα

ολιγομερή προσδένονται επιτυχώς στην επιφάνεια του αισθητήρα. Η καμπύλη που έλαβαν από το QCM ταιριάζει πολύ με τις συνήθεις καμπύλες που δείχνουν την κινητική της υβριδοποίησης.



Εικόνα 2.23: (α) Πείραμα ελέγχου για την υβριδοποίηση των ολιγομερών που χρησιμοποιεί QCM με οδηγούμενη συχνότητα 1MHz [18]. (β) Πείραμα ελέγχου με φθορισμό των μορίων – δεικτών [27] (γ) Πείραμα ελέγχου με φθορισμό πριν και μετά την υβριδοποίηση [21].

Οι Shiigi et al [25], Chen et al [27] και Moreau et al [21] αναφέρουν πειράματα φθορισμού για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ακινητοποίησης και υβριδοποίησης των ολιγομερών. Στα αρχικά στάδια της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν ολιγομερή με φθορίζουσες ομάδες για να επαληθευτεί η επιτυχής ακινητοποίηση των μορίων – δεικτών στην επιφάνεια των δειγμάτων καθώς και για την επαλήθευση της επιτυχούς υβριδοποίησης των μορίων – στόχων με τα μόρια δείκτες.

Κεφάλαιο 3

Μεθοδολογία

3.1 Κατασκευή αισθητήρων πυριτίου

Στο εργαστήριό μας κατασκευάζεται μια συστοιχία αισθητήρων γενικής χρήσεως. Οι αισθητήρες αυτοί κατασκευάζονται με τις τυπικές διαδικασίες της τεχνολογίας των μικροσυστημάτων ώστε να εξασφαλίζεται η συμβατότητα με τα υπόλοιπα συστήματα. Κάθε συστοιχία αποτελείται από οκτώ αισθητήρες με ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια. Τα ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια πλεονεκτούν έναντι των τυπικών ηλεκτροδίων με διάκενο διότι η περιοχή της επιφάνειας που γίνεται η αίσθηση είναι πολλαπλάσια σε σχέση με αυτή των διατάξεων της 2.6. Πρακτικά, αυτό μεταφράζεται σε μεγαλύτερο σήμα και τις περισσότερες φορές σε συνολική αξιοπιστία της διάταξης. Αρχική επιδίωξη στο σχεδιασμό ενός αισθητήρα είναι η κατασκευή ίσων επιφανειών. Αυτό συνεπάγεται πως οι αισθητήρες που χρησιμοποιήθηκαν για την εν λόγω μελέτη είχαν μεταβλητό αριθμό δακτύλων ανάλογα με το διάκενό τους.

Συγκεκριμένα τα κατασκευαστικά χαρακτηριστικά αυτών συγκεντρώνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Διάκενο	Αριθμός Δακτύλων ανά πλευρά
30 μm	8
10 μm	15
5 μm	20
2 μm	25

Πίνακας 3.1: Διάταξη ηλεκτροδίων

Κάθε συστοιχία αποτελείται από δύο τετράδες αισθητήρων με διάκενα 30 μm , 10 μm , 5 μm , 2 μm . Η ενσωμάτωση διαφορετικών διακένων έγινε για να συγκριθεί η απόκριση που έχει ο κάθε αισθητήρας στα διάφορα ερεθίσματα (κάμψη, υγρασία κτλ). Παρατηρήθηκε πως ο αισθητήρας των 30 μm ήταν ο σταθερότερος κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Φάνηκε, δηλαδή, να μην επηρεάζεται από αστάθμητους παράγοντες όπως υγρασία, φωτισμό κτλ και εμφάνισε τη μικρότερη ολίσθηση. Οι αισθητήρες των 10 μm και 5 μm ήταν επίσης αξιόπιστοι αλλά ήταν αυξανόμενα ευαίσθητοι στα διάφορα ερεθίσματα λόγω του μικρότερου διακένου τους. Ο αισθητήρας των 5 μm είχε, δηλαδή, μεγαλύτερη σχετικά απόκριση από τον αισθητήρα των 10 μm και κατά συνέπεια των 30 μm . Τέλος ο αισθητήρας των 2 μm ήταν ο πιο ευαίσθητος από όλους με αποτέλεσμα στα

περισσότερα πειράματα να μην μπορεί να ληφθεί υπόψη η συμπεριφορά του. Εν αντιθέσει με τους παραπάνω, ο αισθητήρας των 2 μm ήταν ο πιο ευαίσθητος και ταυτόχρονα εμφάνισε τη μεγαλύτερη ολίσθηση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Δεν προέκυψαν, επομένως, αξιόπιστα αποτελέσματα στα περισσότερα πειράματα από αισθητήρες διακένου 2 μm.

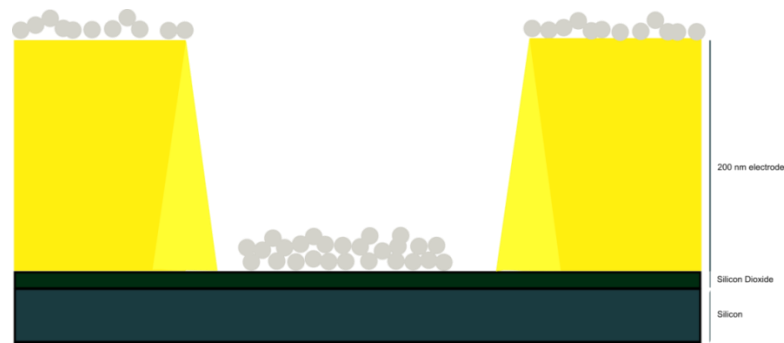
3.1.1 Κατασκευή των αισθητήρων ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων

Η λιθογραφία της ρητίνης έγινε στις εγκαταστάσεις του τομέα μικροηλεκτρονικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Κατόπιν έγινε απομάκρυνση της ρητίνης που είχε φωτιστεί και έγινε η πρώτη επιμετάλλωση σύμφωνα με τη μεθοδολογία της αρνητικής λιθογραφίας. Εξαχνώθηκε τιτάνιο πάχους 4 -5 nm για να ενισχυθεί η συνάφεια μεταξύ χρυσού και οξειδίου του πυριτίου (adhesion layer). Στη συνέχεια εξαχνώθηκαν 30 nm χρυσού. Το πάχος των ηλεκτροδίων χαρακτηρίστηκε με προφιλόμετρο.

Τα ηλεκτρόδια συνδέονται μέσω απολήξεων (traces) σε μεταλλικές επαφές (pads) επιφάνειας περίπου 1.69 mm² οι οποίες επιτρέπουν αφενός τη διασύνδεση των αισθητήρων μέσω probe station για ηλεκτρικό χαρακτηρισμό, αφετέρου τη σύνδεσή τους σε ειδική πειραματική διάταξη που επιτρέπει το χαρακτηρισμό της συστοιχίας σε πραγματικό χρόνο. Η διάταξη αυτή κατασκευάστηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας και θα συζητηθεί παρακάτω .

Η λειτουργία των αισθητήρων βασίζεται στα δίκτυα νανοσωματιδίων που αναπτύσσονται στον ενδιάμεσο χώρο των ηλεκτροδίων. Η επιτυχής επαφή των ηλεκτροδίων με το υμένιο των νανοσωματιδίων εξαρτάται άμεσα από την επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Είναι επιβεβλημένο τα ηλεκτρόδια να μην έχουν μεγάλο πάχος για να μην προκαλούν φαινόμενα σκίασης¹ (shadowing effects) στα νανοσωματίδια. Επίσης είναι μείζονος σημασίας η ύπαρξη θετικής κλίσης στην πλευρά του ηλεκτροδίου ώστε να αυξάνεται η επιφάνεια επαφής μεταξύ ηλεκτροδίου και νανοσωματιδίων.

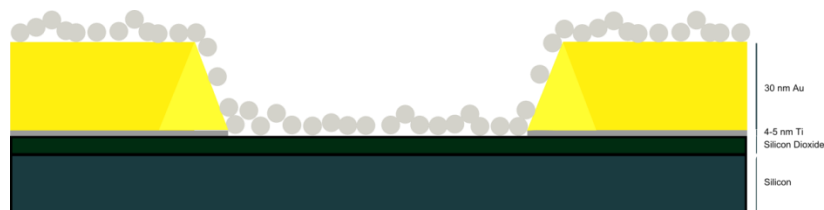
¹ Κατά την εναπόθεση των νανοσωματιδίων αν ένα ηλεκτρόδιο έχει μεγάλο πάχος τότε τα νανοσωματίδια που διαχέονται στην επιφάνεια θα έχουν μικρή επιφανειακή πυκνότητα κοντά στη διεπιφάνεια υποστρώματος – ηλεκτροδίου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κακής ηλεκτρικής επαφής μεταξύ τους.



(α)



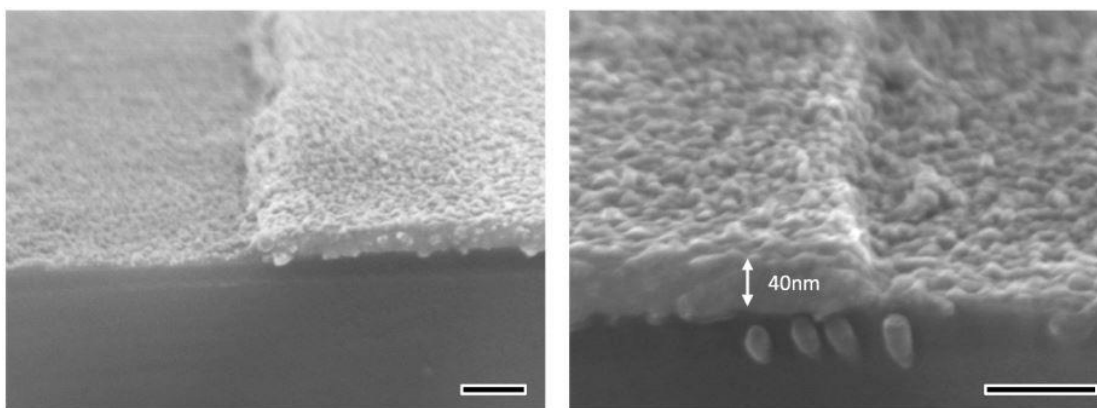
(β)



(γ)

Εικόνα 3.1: (α) Φαινόμενα σκίασης των νανοσωματιδίων από το ύψος των ηλεκτροδίων. (β) «Κακό» προφίλ ηλεκτροδίων, μη επαρκής επιφάνεια επαφής μεταξύ ηλεκτροδίων και νανοσωματιδίων, (γ) Καλό προφίλ ηλεκτροδίων, επαρκής επιφάνεια στη διεπαφή.

Η δημιουργία ενός «κατάλληλου προφίλ» στα ηλεκτρόδια επιτεύχθηκε με μια εναλλακτική προσέγγιση στην απομάκρυνση (lift off) της ρητίνης. Το δείγμα εμβαπτίστηκε για περίπου τρεις ώρες σε λουτρό ακετόνης σε θερμοκρασία δωματίου και η ρητίνη απομακρύνθηκε μόνη της ή με τη βοήθεια μιας πιπέττας με την οποία δημιουργήθηκε ροή της ακετόνης πάνω από τον αισθητήρα [5]. Τα ηλεκτρόδια που προέκυψαν μετά την απομάκρυνση της ρητίνης είχαν συνεχή, στιλπνή επιφάνεια, χωρίς κόκκους ή πόρους. Η μη ύπαρξη πόρων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων είναι μείζονος σημασίας αφού σε αντίθετη περίπτωση υπάρχει πιθανότητα ρόφησης διαλυμάτων και κατ' επέκταση την εμφάνιση ανεπιθύμητων ιδιοτήτων.



Εικόνα 3.2: Σημασία του προφίλ του ηλεκτροδίου. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) με κλίση 5°. Η μπάρα έχει μήκος 100nm [1].

Ο τελικός έλεγχος της καταλληλότητας των ηλεκτροδίων έγινε με ηλεκτρικό χαρακτηρισμό. Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με πικοαμπερόμετρο που είναι διαθέσιμο στο εργαστήριο ηλεκτρικών μετρήσεων του τομέα φυσικής. Η διακριτική ικανότητα (resolution) του οργάνου είναι 1 pA. Αν τα ηλεκτρόδια δώσουν τιμές κάτω του 1 pA τότε η κατασκευή τους θεωρείται επιτυχημένη. Αν τα ρεύματα που διαρρέουν είναι μεγαλύτερα (>1 nA) τότε υπάρχει πρόβλημα με την απομάκρυνση του μετάλλου με το lift off, οπότε ο αισθητήρας που θα κατασκευαστεί επί αυτών των ηλεκτροδίων δεν θα χρησιμοποιηθεί στην πειραματική διαδικασία.

3.2 Παραγωγή Νανოსωματιδίων Πλατίνας

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την παραγωγή νανოსωματιδίων οι οποίες μπορούν να διαχωριστούν σε χημικές και φυσικές. Στις χημικές μεθόδους τα υλικά (αντιδρώντα) που χρησιμοποιούνται ως πηγή της εναπόθεσης είναι διαφορετικά από το τελικό προϊόν που εναποτίθεται στην επιφάνεια. Οι συνηθέστερες χημικές μέθοδοι είναι οι Χημική Εναπόθεση με Ατμό (Chemical Vapor Deposition), η πυρόλυση οργανομεταλλικών παραγόντων σε υψηλές θερμοκρασίες (συνήθως στην παραγωγή ημιαγώγιμων νανοςωματιδίων), παραγωγή νανοςωματιδίων σε κolloειδή διαλύματα με την αναγωγή μεταλλικών αλάτων συνήθως HAuCl_4 , AgNO_3 κτλ. Το σχήμα και το μέγεθός τους ρυθμίζεται κυριότερα τις εξωτερικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία) και τους σταθεροποιητικούς παράγοντες που υπάρχουν στα διαλύματα. [5], [16], [36].

Στον αντίποδα, οι φυσικές μέθοδοι παραγωγής νανοςωματιδίων συνίστανται στις μεθόδους στις οποίες το υλικό της πηγής της εναπόθεσης είναι το ίδιο με το υλικό που εναποτίθεται στην επιφάνεια. Η αρχή λειτουργίας τους είναι η μεταφορά ικανής ενέργειας σε άτομα ή μόρια μέσω ενός βραχέος παλμού ώστε αυτά να αποσπαστούν από τον κύριο όγκο του υλικού και στη συνέχεια να συσσωματωθούν επιλεκτικά προς σχηματισμό νανοςωματιδίων. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η αποδόμηση με laser (Laser Ablation Method), η φυσική εναπόθεση

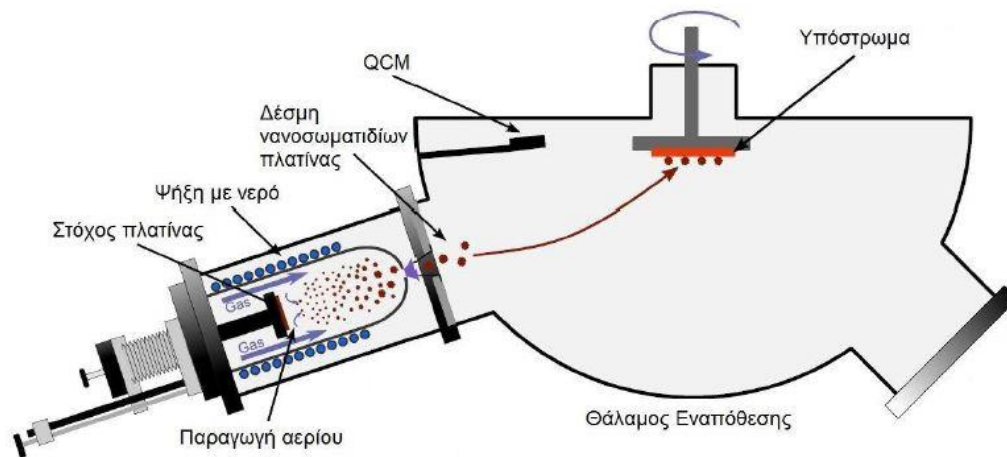
ατμών (Physical Vapor Deposition) και η ιοντοβολή (sputtering) η οποία χρησιμοποιείται με τρεις διαφορετικές τεχνικές α) ιοντοβολή συνεχούς ρεύματος (DC Sputtering) που προϋποθέτει την ύπαρξη μεταλλικού στόχου για τη χρήση της, β) ιοντοβολή εναλλασσόμενου ρεύματος (RF Sputtering) στο οποίο μπορεί να τοποθετηθεί οποιοσδήποτε στόχος και γ) η ιοντοβολή με δέσμη (ion beam sputtering) που παρέχει καλύτερο έλεγχο των επιφανειακών μορφολογικών χαρακτηριστικών του δείγματος [5], [2].

3.2.1 Σύνθεση νανοσωματιδίων

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω εργασία είναι η ιοντοβολή και συγκεκριμένα η DC Magnetron Sputtering. Στην ιοντοβολή η επιφάνεια του στόχου βομβαρδίζεται με πλάσμα αργού το οποίο είναι χωρικά περιορισμένο με μαγνητικό πεδίο κοντά στο στόχο και η θερμοκρασία του είναι παραπλήσια με τη θερμοκρασία δωματίου. Το πλάσμα αποκολλά (exfoliate) τα άτομα της επιφάνειας του στόχου. Τα άτομα που αποκολλώνται από το στόχο, απομακρύνονται από αυτόν μέσω της ροής του αργού. Κατά την απομάκρυνσή τους αυτά αρχίζουν να συσσωματώνονται σε νανοσωματίδια. Η πίεση θαλάμου γένεσης των νανοσωματιδίων είναι περίπου 10^{-3} mbar και η πίεση στον κυρίως θάλαμο (θάλαμο εναπόθεσης) είναι της τάξης του $5 \cdot 10^{-5}$ mbar. Λόγω της διαφοράς πίεσης τα νανοσωματίδια διέρχονται στον κυρίως θάλαμο μέσω μιας οπής. Τα νανοσωματίδια που παράγονται τείνουν να έχουν αρνητικό φορτίο λόγω ενός περίσσιου ηλεκτρονίου. Αυτό δημιουργεί τη δυνατότητα να παραχθούν επιθυμητές δομές (αυτοοργάνωση) εκμεταλλευόμενοι τις απώσεις Coulomb.

3.2.2 Ρυθμός σύνθεσης

Ο ρυθμός σύνθεσης των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το ρεύμα που διαρρέει το κύκλωμα άνοδος – πλάσμα – στόχος. Όταν αυξάνεται το ρεύμα τότε ο ρυθμός (rate) αυξάνεται και η διαδικασία ολοκληρώνεται γρηγορότερα. Η ρύθμισή του κατά τη διάρκεια της παραγωγής νανοσωματιδίων είναι απαραίτητη ώστε να διατηρηθεί σταθερός ο ρυθμός της εναπόθεσης.



Εικόνα 3.3: Πειραματική διάταξη παραγωγής νανοσωματιδίων με ιοντοβολή [2].

3.2.3 Καθορισμός μεγέθους νανοσωματιδίων

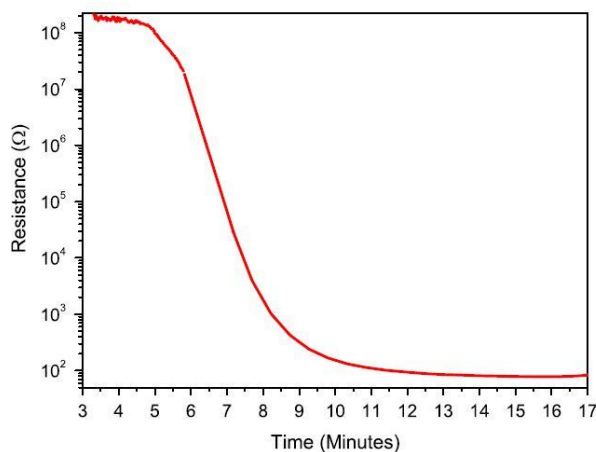
Η διάταξη δίνει τη δυνατότητα του ελέγχου του μεγέθους των νανοσωματιδίων κατά τη σύνθεσή τους με δύο τρόπους. Αφενός επιλέγοντας τη θέση του στόχου μέσα στο θάλαμο, όπου μειώνοντας την απόσταση της κεφαλής που περιέχει το στόχο από τη θύρα εκτόνωσης υπάρχει λιγότερος χώρος για τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων, αφετέρου, αυξάνοντας τη ροή του αργού μειώνοντας το χρόνο παραμονής των νανοσωματιδίων στο θάλαμο παραγωγής. Μεταβάλλοντας κατάλληλα τις δύο αυτές παραμέτρους κανείς πετυχαίνει τη βέλτιστη κατανομή μεγεθών ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή.

Για το χαρακτηρισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων αλλά και της στατιστικής κατανομής αυτών, πριν την εναπόθεση τοποθετείται ένα λεπτό φύλλο άνθρακα στο υπόστρωμα (TEM grid). Αυτό το φύλλο θα χρησιμοποιηθεί μετά το πέρας της εναπόθεσης για το χαρακτηρισμό της με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM). Το πλεονέκτημα της μικροσκοπίας TEM είναι ότι παράγει εικόνες με μεγάλη ευκρίνεια οπότε αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση της στατιστικής κατανομής του μεγέθους των νανοσωματιδίων με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών όπως το ImageJ.

3.2.4 Πάχος υμενίου νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια διαχέονται στο θάλαμο εναπόθεσης και ένα μικρό μέρος αυτών επικάθεται στο δείγμα. Ο έλεγχος του πάχους των υμενίων μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Για τον άμεσο χαρακτηρισμό του πάχους χρησιμοποιείται ένας κρύσταλλος (Quartz Crystal Microbalance) που ταλαντώνεται (οδηγείται) σε συγκεκριμένη συχνότητα και λόγω της μάζας που επικάθεται στην επιφάνεια, αλλάζει η ιδιοσυχνότητά του. Έτσι μπορεί να εκτιμηθεί ο ρυθμός εναπόθεσης σε $\text{\AA}/\text{sec}$ και κατ' επέκταση το πάχος του υμενίου σε \AA . Ο έμμεσος χαρακτηρισμός του πάχους του υμενίου γίνεται συνδέοντας ένα ζεύγος ηλεκτροδίων σε μία από τις συστοιχίες που βρίσκονται στο θάλαμο

με ένα ωμόμετρο και μετρώντας in situ την αντίστασή του. Λίγο πριν η αντίσταση φτάσει τα επιθυμητά όρια το υπόστρωμα απομονώνονται από τον υπόλοιπο θάλαμο κλείνοντας ένα διάφραγμα (shutter). Η αντίσταση θα συνεχίσει να πέφτει για λίγο λόγω της παρουσίας νανοσωματιδίων στο χώρο πίσω από το διάφραγμα.



Εικόνα 3.4: In situ μέτρηση της αντίστασης σε αισθητήρα με ενδοδιαπλεκόμενα ηλεκτρόδια [1].

3.2.5 Χαρακτηρισμός αισθητήρα - υμενίου νανοσωματιδίων

Μετά το πέρας της διαδικασίας εναπόθεσης, όλα τα δείγματα χαρακτηρίζονται ηλεκτρικά με μετρήσεις $I - V$ συνεχούς ρεύματος. Αν η χαρακτηριστική που θα προκύψει είναι γραμμική τότε η εναπόθεση θεωρείται επιτυχημένη. Διαφορετικά, θα υπάρχει, πιθανότατα, πρόβλημα στα ηλεκτρόδια κατά τη διαδικασία κατασκευής τους ή η εναπόθεση θα πρέπει να επαναληφθεί. Στη συνέχεια, τα δείγματα μπορούν να χαρακτηριστούν δειγματοληπτικά με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) για να διαπιστωθεί η ομοιομορφία του υμενίου και η ποιότητα της επαφής τους με τα ηλεκτρόδια.

3.2.6 Σχόλια - Καταλληλότητα δειγμάτων

Η καταλληλότητα ενός δείγματος για τη χρήση του ως βιοαισθητήρα έγκειται αρχικά στην κλίση και τη μορφή της χαρακτηριστικής $I - V$. Η χαρακτηριστική πρέπει να είναι γραμμική (ή με μικρή μη- γραμμικότητα) και η προκύπτουσα αντίσταση στον αισθητήρα των 30 μm θα πρέπει να μην υπερβαίνει την τάξη των $\sim 10 \text{ M}\Omega$.

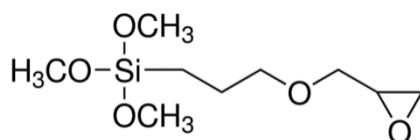
Σε μία συστοιχία αισθητήρων θεωρούμε πως η επιφανειακή πυκνότητα των νανοσωματιδίων είναι σταθερή. Λόγω της ύπαρξης των διαφορετικών διακένων είναι αναμενόμενο πως κάθε αισθητήρας θα εμφανίζει διαφορετική αντίσταση (σε κάθε περίπτωση αναμένεται η αντίσταση ομοειδών αισθητήρων να είναι παρόμοια). Ένα επιτυχημένο δείγμα εμφανίζει αντιστάσεις της τάξης των $\sim 10 \text{ M}\Omega$ στον αισθητήρα των 30 μm και αντιστάσεις της τάξης των 10 $\text{k}\Omega$

στον αισθητήρα των 2 μm. Η προσπάθεια είναι να κρατηθούν οι αισθητήρες εντός της ζώνης μετάβασης μετάλλου – ημιαγωγού και κατά το δυνατό κοντά στο κατώφλι αγωγιμότητας (percolation threshold).

Επιπροσθέτως, αν υπάρχει η δυνατότητα της μικροσκοπίας, προτιμώνται τα δείγματα των οποίων το υμένιο είναι πιο ομοιογενές και τείνει να εμφανίζει λιγότερα συσσωματώματα. Έτσι, είναι ευκολότερη η διασύνδεση των γειτονικών νανοσωματιδίων με τα ολιγομερή που θα ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων.

3.3 Ακινητοποίηση Βιολογικού υλικού – Πρωτόκολλο

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε ολιγομερή μήκους 15 βάσεων τα οποία είχαν μία τερματική ομάδα θειόλης (-SH) που δημιουργεί δεσμό με τα ηλεκτρόδια χρυσού. Το οξείδιο του πυριτίου δεν δημιουργεί δεσμό με την τερματική ομάδα του DNA οπότε είναι επιβεβλημένη η τροποποίηση της επιφάνειας του αισθητήρα για να μπορεί να δημιουργήσει τέτοιους δεσμούς. Η τροποποίηση της επιφάνειας έγινε με την ουσία 3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane - (GOPTS).



Εικόνα 3.5: Το μόριο GOPTS [3]

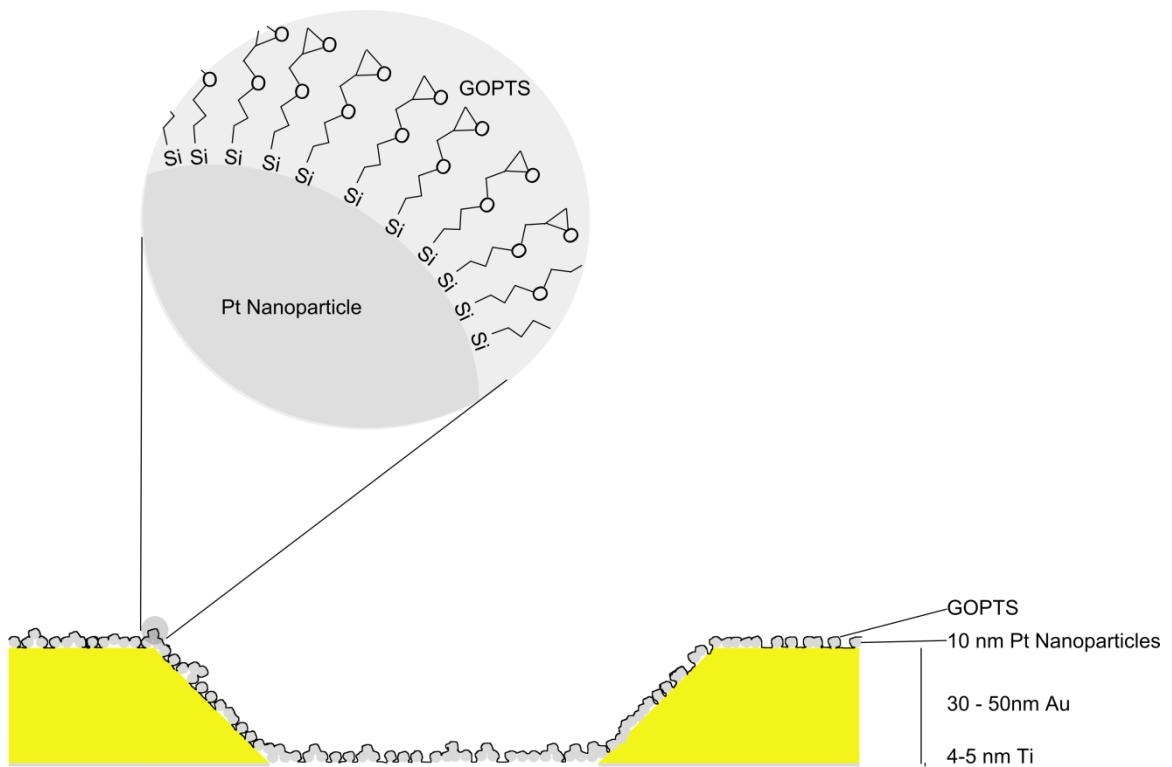
Η τερματική ομάδα που εμπεριέχει το μόριο του πυριτίου δημιουργεί δεσμό με το υπόστρωμα του διοξειδίου του πυριτίου και με τα νανοσωματίδια πλατίνας. Η άλλη τερματική ομάδα θα δεχθεί την τερματική ομάδα θειόλης του κλώνου – ιχνηλάτη. [37]

Για την επίστρωση του GOPTS χρησιμοποιείται ένα επίσημο πρωτόκολλο που περιλαμβάνει τον καθαρισμό της συστοιχίας αισθητήρων, την εμβάπτιση σε διάλυμα GOPTS και το ψήσιμο του αισθητήρα.

Η ακριβής διαδικασία μπορεί να περιγραφεί με τα παρακάτω βήματα:

- Καθαρισμός του δείγματος με αιθανόλη 95% για 10 min με φυγοκέντρηση.
- 2% v/v GOPTS και αραιώση με 98% v/v αιθανόλη – εμβάπτιση του δείγματος.
- Φυγοκέντρηση για 5 min.
- Ψήσιμο στους 37 °C για 6 h.
- Ξέβγαλμα του δείγματος με υπερκάρθο νερό.
- Στέγνωμα με άζωτο.

- 135 °C για 1h.



Εικόνα 3.6: Αισθητήρας με GOPTS.

Μετά το πέρας της διαδικασίας, το κάθε δείγμα είναι έτοιμο για την ακινητοποίηση του βιολογικού υλικού. Το διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος – μορίων δεικτών αραιώνεται στην επιθυμητή ποσότητα με ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer). Για την ακινητοποίηση των μορίων – δεικτών στην επιφάνεια του δείγματος υπάρχει η δυνατότητα επιλογής μεταξύ τριών διαθέσιμων τεχνικών.

- Τεχνική ακινητοποίησης με laser (Laser Forward Induced Transfer – LIFT).
- Εκτυπωτής ψεκασμού μελάνης (ink jet).
- Ακινητοποίηση με πιπέττα.

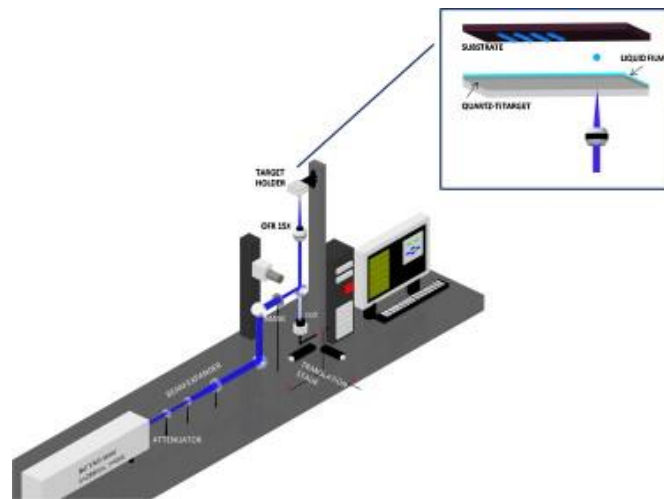
Οι ακολουθίες των μορίων του DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Ακολουθίες βάσεων που χρησιμοποιήθηκαν	
Μόριο – στόχος	5'- GAC GAC CAG GTC AAC-3'
Μόριο – δείκτης Πλήρως Συμπληρωματικό	[ThiC6]-5'- GTT GAC CTG GTC GTC-3'
Μόριο – δείκτης Μη Συμπληρωματικό	[ThiC6]-5'- TAG CCG ATA TGC GCA-3'

Πίνακας 3.2: Ακολουθίες βάσεων που χρησιμοποιήθηκαν.

3.3.1 Laser Induced Forward Transfer – LIFT

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην παλμική λειτουργία ενός laser Nd: YAG. Η δέσμη του laser κατευθύνεται σε στόχο που έχει κατασκευαστεί από γυαλί που στην επιφάνειά του έχει μια λεπτή επίστρωση Τι περίπου 50 nm. Πάνω στο στόχο εναποτίθεται το βιολογικό υλικό γνωστής συγκέντρωσης. Ο στόχος τοποθετείται κοντά στο δείγμα και οι παλμοί προκαλούν την κίνηση μιας ποσότητας βιολογικού υλικού ανάλογη με τη διάμετρο τη δέσμης (spot size). Λόγω της κινητικής ενέργειας που αποκτούν, είναι αποδοτικότερη η δημιουργία δεσμών των ολιγονουκλεοτιδίων με την επιφάνεια του αισθητήρα. Το δείγμα τοποθετείται σε μια τηλεχειριζόμενη τράπεζα, εφοδιασμένη με δύο σερβοκινητήρες που κινούν την τράπεζα στο επίπεδο $x - y$. Έτσι σαρώνεται μόνο η επιφάνεια του κάθε αισθητήρα και όχι οι ενδιάμεσες περιοχές.



Εικόνα 3.7: Πειραματική διάταξη εκτύπωσης LIFT [4]

3.3.2 Εκτυπωτής Ψεκασμού Μελάνης - Ink Jet Printer

Ο εκτυπωτής ink jet χρησιμοποιεί έναν πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο επί του οποίου δημιουργείται μια σταγόνα από το προς ψεκάσμο διάλυμα. Ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία, τη συχνότητα και το πλάτος ταλάντωσης του κρυστάλλου δημιουργούνται σταγόνες καθορισμένης ποσότητας που κατευθύνονται με ακρίβεια σε μια ορισμένη περιοχή. Αν, λοιπόν, στην είσοδο του συστήματος τοποθετηθεί μία σταγόνα βιολογικού υλικού επιθυμητής συγκέντρωσης αυτή θα εκτυπωθεί στην επιλεγμένη περιοχή.

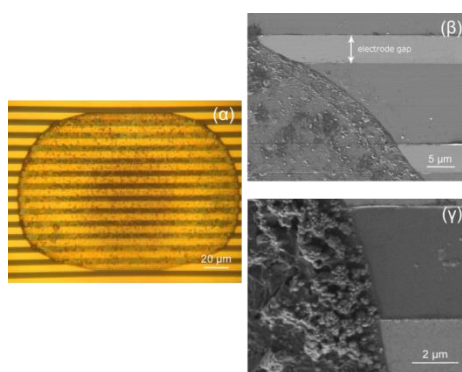
3.3.3 Εναπόθεση με πιπέττα

Στην περιοχή των αισθητήρων εναποτίθεται μια σταγόνα 2 μL , της οποίας η θέση μπορεί να διορθωθεί με το χέρι, παρασύροντας προσεκτικά τη σταγόνα με ένα πιπεττάκι, αν χρειαστεί.

3.3.4 Σύγκριση μεταξύ των τεχνικών

Οι δύο τελευταίες τεχνικές είναι γρήγορες και εύχρηστες αλλά μοιράζονται ένα σημαντικό μειονέκτημα. Κατά τη διάρκεια εξάτμισης του διαλύτη, τα μόρια – δείκτες συσσωρεύονται στην περιφέρεια της επιφάνειας λόγω διάχυσης. Λόγω αυτής της ιδιότητας εμφανίζεται το γνωστό «φαινόμενο δαχτυλιδιού του καφέ» ή “coffee ring effect”. Αυτό έχει ως άμεσο επακόλουθο την ανομοιομορφία στην επιφανειακή πυκνότητα ακινητοποιημένων μορίων – δεικτών. Αυτό συνεπάγεται την ανομοιόμορφη συνεισφορά της επιφάνειας του αισθητήρα σε ηλεκτρικό σήμα, μειώνοντας κατ’ αρχάς την ισχύ του λαμβανόμενου σήματος αλλά και πιθανότατα την ευαισθησία του αισθητήρα.

Η τεχνική εναπόθεσης με πιπέττα αποτελεί μια εύκολη και γρήγορη λύση στην περίπτωση που οι άλλες δύο δεν είναι διαθέσιμες.



Εικόνα 3.8: Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας σάρωσης για νανοσωματίδια χρυσού διαμέτρου 100 nm που έχουν εκτυπωθεί με εκτυπωτή ink jet. Το αντίστοιχο συμβαίνει με τα ολιγονουκλεοτίδια [5].

Η πρώτη τεχνική (LIFT), αντίθετα, εξασφαλίζει την ομοιογενή ακινητοποίηση των μορίων στην επιφάνεια του κάθε αισθητήρα και μόνο. Λόγω της κινητικής ενέργειας που αποκτά η κάθε σταγόνα, το διάλυμα του βιολογικού υλικού εισχωρεί σε περισσότερες ανωμαλίες της εμε αποτέλεσμα να αυξάνεται η συνολική διαβροχή. Επίσης, χρησιμοποιείται πολύ μικρότερη ποσότητα διαλύτη, η οποία κατανέμεται ομοιόμορφα στην επιφάνεια του αισθητήρα χωρίς να σχηματίζει μια ημισφαιρική σταγόνα. Εξασφαλίζεται δηλαδή, ομοιόμορφη συγκέντρωση βιολογικού υλικού στην επιφάνεια, κατ επέκταση, ισχυρότερο σήμα. Τέλος, αν και η τεχνική αυτή είναι χρονοβόρα και απαιτεί ειδική πειραματική διάταξη, ήταν αυτή που κατά κόρον επιλέχθηκε στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

3.3.5 Διαδικασία απομάκρυνσης μη συνδεδεμένων και χαλαρά συνδεδεμένων ολιγονουκλεοτιδίων στην επιφάνεια

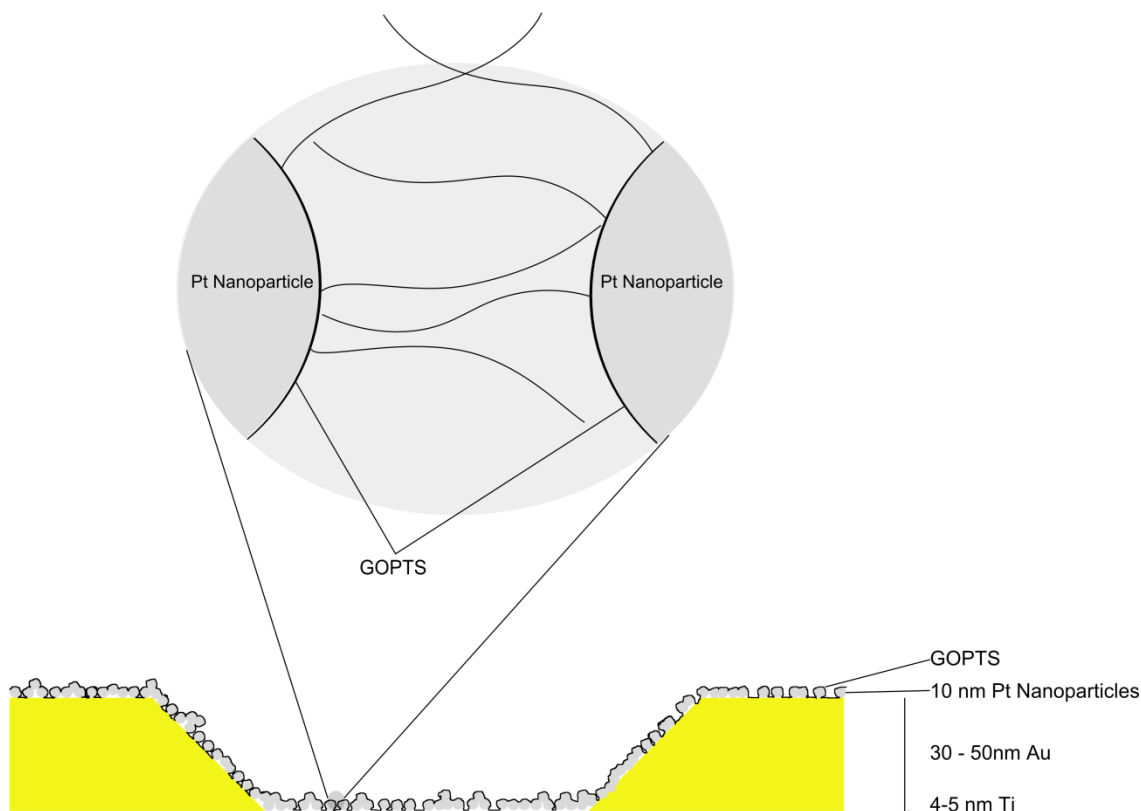
Όταν η διαδικασία ακινητοποίησης περατωθεί με την πάροδο της αναμονής 24 ωρών, τότε τα δείγματα ξεπλένονται αρχικά με υδατικό διάλυμα που περιέχει NaCl (Wash buffer). Με αυτό τον

τρόπο απομακρύνονται τα μη συνδεδεμένα ολιγονουκλεοτίδια από την επιφάνεια του αισθητήρα. Κατόπιν το δείγμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα MCH 1mM για 1 ώρα (ακόμα και 45' είναι αρκετά). Η τερματική ομάδα θειόλης που έχει το MCH δρα ανταγωνιστικά προς τα ολιγονουκλεοτίδια, δημιουργεί και αυτό ομοιοπολικούς δεσμούς με το GOPTS. Έτσι αν ένα ολιγομερές έχει συνδεθεί με δεσμό υδρογόνου, Van der Waals ή αντίστοιχο με το υπόστρωμα το MCH θα θραύσει αυτό το δεσμό απομακρύνοντας το ολιγομερές από την επιφάνεια. Επίσης, η χρησιμότητα του MCH είναι ότι με την απομάκρυνση των χαλαρά συνδεδεμένων ολιγομερών – δεικτών δημιουργείται επιπλέον χώρος που διευκολύνει την υβριδοποίηση με το ολιγομερές – στόχο.

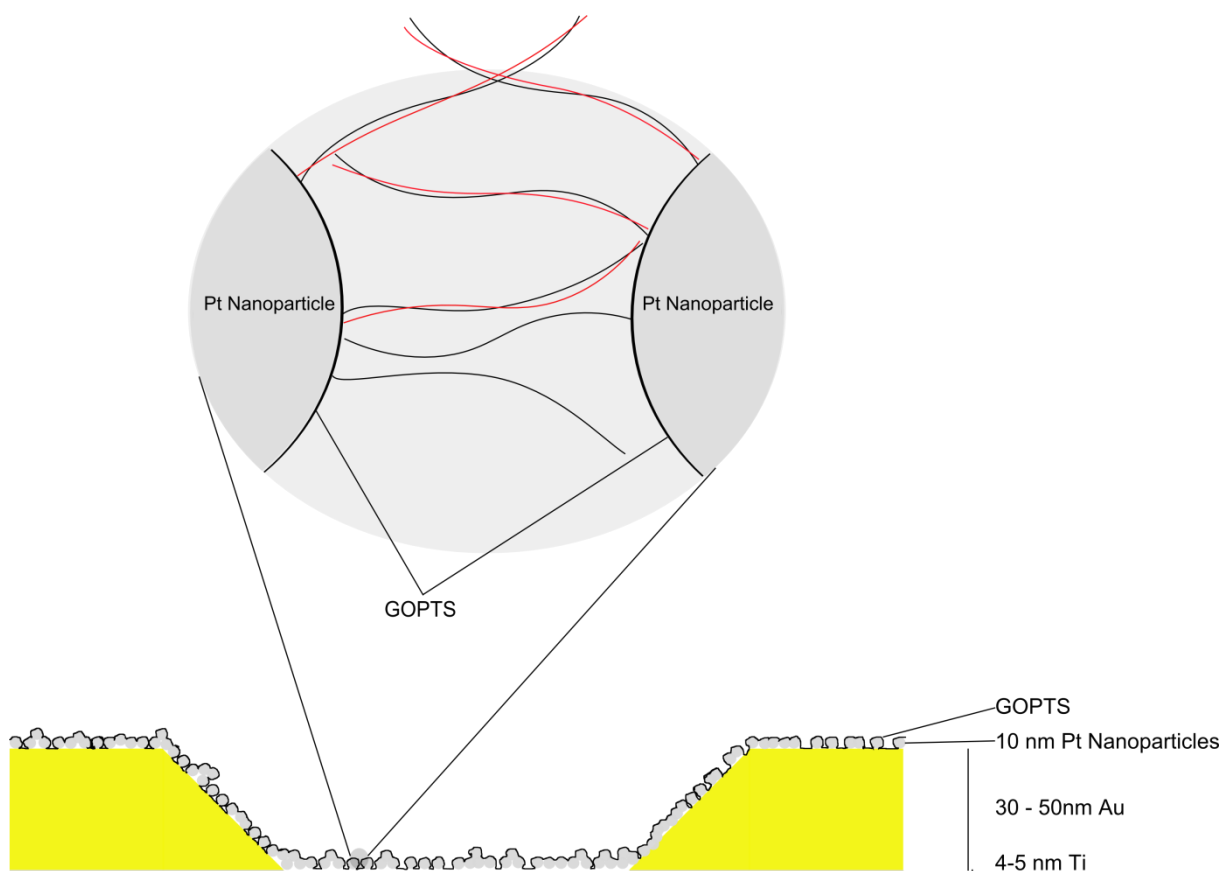
Τέλος, το δείγμα ξεπλένεται εκ νέου με wash buffer 2 ή 3 φορές ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση του MCH. Στη συνέχεια το δείγμα ξεπλένεται με υπερκάρθαρο νερό και στεγνώνεται με άζωτο.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι:

- 24 h μετά την ακινητοποίηση των μορίων –δεικτών, το δείγμα ξεπλένεται με wash buffer.
- 1 h MCH 1mM.
- Ξέπλυμα 2 φορές με wash buffer.
- Ξέπλυμα με υπερκάρθαρο νερό, στέγνωμα με άζωτο.



Εικόνα 3.9: Ο αισθητήρας με ακινητοποιημένα τα ολιγομερή – δείκτες.



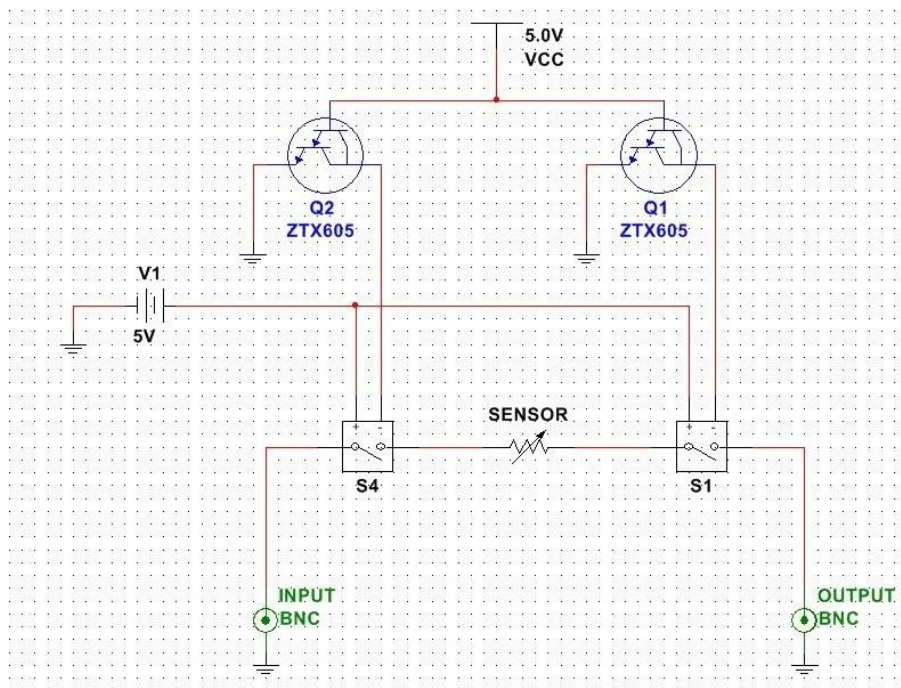
Εικόνα 3.10: Ο αισθητήρας μετά την υβριδοποίηση με τα oligομερή – στόχους.

3.4 Πειραματική διάταξη

Η πειραματική διάταξη αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας και έχει το ρόλο της μεταγωγής κυκλωμάτων για τη διαδοχική μέτρηση όλων των αισθητήρων της συστοιχίας. Η διάταξη αποτελείται από οκτώ αυτόνομα κυκλώματα τα οποία έχουν κοινή είσοδο και κοινή έξοδο. Η είσοδος και έξοδος, αντίστοιχα, συνδέονται με το μετρητικό όργανο (Keithley 2400 Multimeter). Η πειραματική διάταξη συνδέεται με Η/Υ μέσω συστήματος LabJack και η ο χειρισμός της μεταγωγής γίνεται μέσω του ειδικού λογισμικού που αναπτύχθηκε για τη διαχείριση της πλακέτας και του οργάνου.

Αρχικά είναι επιβεβλημένο να γίνει μια σύντομη αναφορά στην αρχή λειτουργίας μηχανικού ηλεκτρονόμου ή ρελέ. Το ρελέ είναι μία διάταξη που ανοίγει ή κλείνει ένα ηλεκτρικό κύκλωμα κάτω από την επίδραση ενός άλλου ηλεκτρικού κυκλώματος. Τα ρελέ έχουν επαφές που υπό συνθήκες μηδενικής πόλωσης είναι κλειστές (περνάει ρεύμα – normally closed/NC) και επαφές που υπό συνθήκες μηδενικής πόλωσης είναι ανοικτές (δεν περνάει ρεύμα – normally open/ NO). Στη διάταξη χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι NO επαφές ώστε το σήμα να διέρχεται μόνο κατά το διάστημα που το

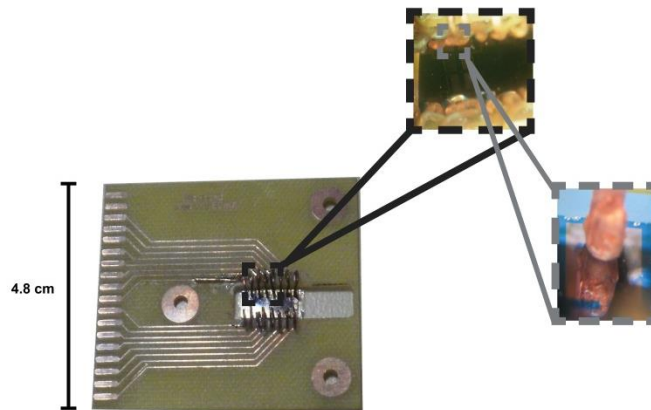
ρελέ οπλίζει και όχι άλλοτε. Όταν τα ρελέ οπλίζουν μετακινώντας ένα μηχανικό μέρος το οποίο βραχυκυκλώνει – γεφυρώνει το ανοικτό, μέχρι πρότινος, κύκλωμα με την είσοδο και την έξοδο της πλακέτας. Επομένως το συνεχές ρεύμα από το μετρητικό όργανο εισέρχεται στον αισθητήρα (είσοδος του κυκλώματος) και δημιουργεί μία διαφορά δυναμικού η οποία ανιχνεύεται στην έξοδο του κυκλώματος (είσοδο του μετρητικού οργάνου). Στην είσοδο και στην έξοδο του αισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν δύο ρελέ για να απομονώνουν τελείως τον αισθητήρα από το υπόλοιπο κύκλωμα και τους υπόλοιπους αισθητήρες. Μόνο έτσι εξασφαλίζεται ότι ο κάθε αισθητήρας δεν επηρεάζεται από δυναμικά ή χωρητικότητες που αναπτύσσονται στο κύκλωμα λόγω των υπόλοιπων αισθητήρων.



Εικόνα 3.11: Απλοποιημένο σχηματικό διάγραμμα του κυκλώματος μεταγωγής.

Η πειραματική διάταξη υλοποιήθηκε σε μια εποξειδική πλακέτα τυπωμένων κυκλωμάτων διπλής όψεως. Ο σχηματισμός των απολήξεων έγινε με μεθόδους υγρής εγχάραξης χαλκού. Το κύκλωμα μεταγωγής τροφοδοτείται με πηγή συνεχούς τάσης +5V η τάση αυτή διανέμεται (παράλληλη σύνδεση) στην είσοδο των ηλεκτρονόμων (ρελέ – Relays). Τα ρελέ παραμένουν ανοικτά –δεν περνάει ρεύμα– μέχρις ότου δοθεί η κατάλληλη εντολή από το σύστημα χειρισμού. Όταν δοθεί η εντολή τότε η συστοιχία Darlington (Q_1 , Q_2 στην εικόνα 3.9) κλείνει, επιτρέπει στο ρεύμα να διαρρεύσει και η έξοδος του ρελέ «γειώνεται» (0 V) οπότε δημιουργείται η απαιτούμενη διαφορά δυναμικού για να «οπλίζει το ρελέ» και να κλείσει το κύκλωμα αίσθησης. Το ρεύμα εισέρχεται στον αισθητήρα και μετράται η τάση που αναπτύσσεται στην έξοδο.

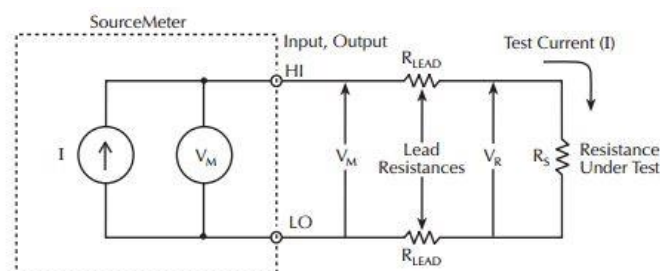
Για τη διασύνδεση του κυκλώματος αίσθησης με τη συστοιχία των αισθητήρων χρησιμοποιήθηκε μία μικρή πλακέτα (BioBoard) που σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Η πλακέτα αυτή συνδέεται με τις επαφές (φίσα) του κυκλώματος αίσθησης και μέσω ειδικών απολήξεων καταλήγει σε ευθυγραμμισμένα ηλεκτρόδια χαλκού που βρίσκονται στον κενό χώρο, υπό των οποίων ευθυγραμμίζεται και συνδέεται η συστοιχία των αισθητήρων.



Εικόνα 3.12: Τυπωμένη πλακέτα διασύνδεσης, BioBoard

3.4.1 Keithley 2400 Multimeter

Το μετρητικό όργανο είναι ρυθμισμένο απ' ευθείας ώστε να μετράει αντίσταση. Το όργανο συμπεριφέρεται ως πηγή ρεύματος με ένα βολτόμετρο συνδεδεμένο παράλληλα στους ακροδέκτες εξόδου. Το ρεύμα που διαρρέει τους αισθητήρες κυμαίνεται από 100 nA για αντιστάσεις της τάξεως των 200 MΩ έως 100mA για αντιστάσεις της τάξης των 20Ω. Στην πράξη δεν υπάρχουν τέτοιες αντιστάσεις. Το σύνηθες ρεύμα, όμως, βρίσκεται στην περιοχή των 1 – 10μΑ [38].

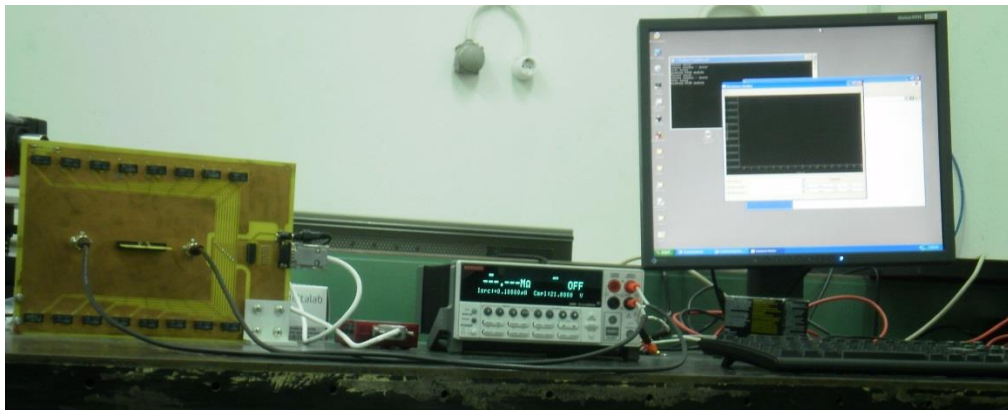


Εικόνα 3.13: Ισοδύναμο κύκλωμα του Keithley 2400 για την απευθείας μέτρηση της αντίστασης.

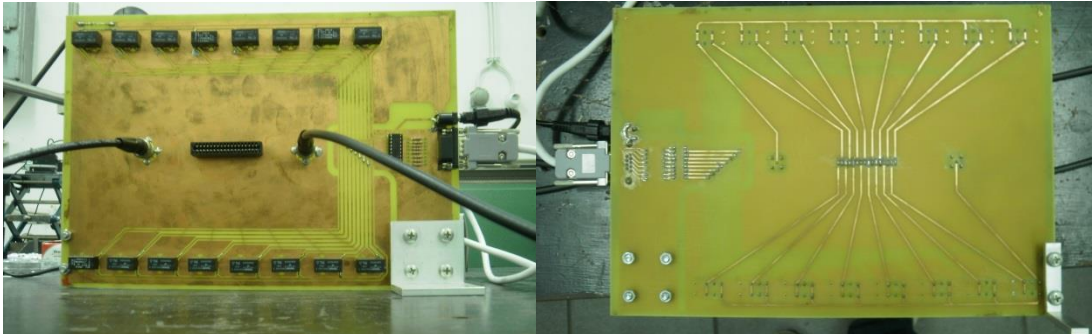
3.4.2 Λογισμικό

Το λογισμικό αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα «Νανοηλεκτρονικών Υλικών και Διατάξεων» ειδικά για τα συγκεκριμένα πειράματα. Χρησιμοποιήθηκαν οι βιβλιοθήκες του

προγράμματος LabView και το πρόγραμμα γράφτηκε σε γλώσσα Python λόγω της μεγάλης ευελιξίας που προσφέρει. Το πρόγραμμα είναι υπεύθυνο για τη μεταγωγή των ηλεκτρικών κυκλωμάτων και για το συγχρονισμό των μετρήσεων και τη λήψη, αποθήκευση των δεδομένων. Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα στον πειραματιστή να επιλέξει ποιοι αισθητήρες θα συμπεριλαμβάνονται στην εκάστοτε μέτρηση, αλλά και ποιους θα μπορεί ο πειραματιστής να βλέπει στην οθόνη. Επίσης, παρέχει τη δυνατότητα στο χρήστη – πειραματιστή να επιλέξει το χρονικό διάστημα μεταξύ των αλλαγών στα κυκλώματα. Ο ελάχιστος χρόνος είναι τα 100 msec και είναι αυτός που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα.



(α)



(β)

(γ)

Εικόνα 3.14: (α) Πειραματική Διάταξη, (β) εμπρόσθια όψη πλακέτας μεταγωγής – κύκλωμα μεταγωγής, (γ) οπίσθια όψη πλακέτας μεταγωγής – κύκλωμα αίσθησης.

3.4.3 Σχόλια για την πειραματική διάταξη

3.4.3.1 Επιμετάλλωση οπών

Η πλακέτα σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας τις αρχές της ολοκληρωμένης σχεδίασης δύο όψεων. Βασική παραδοχή στην εν λόγω φιλοσοφία είναι πως το κύκλωμα που βρίσκεται στην άνω όψη της πλακέτας επικοινωνεί με το κύκλωμα που βρίσκεται στην κάτω όψη. Η επικοινωνία γίνεται συνήθως μέσω των οπών στις οποίες θα τοποθετηθούν και θα συγκολληθούν τα διακριτά εξαρτήματα. Αυτό προϋποθέτει την ύπαρξη επιμετάλλωσης στην οπή ώστε να βραχυκυκλώνει το

άνω και κάτω κύκλωμα. Η επιμετάλλωση των οπών είναι μια περίπλοκη διαδικασία και δεν συνηθίζεται όταν γίνεται εμφάνιση των πλακετών με υγρή εγχάραξη. Σε αυτή την περίπτωση το κάθε εξάρτημα που θα τοποθετηθεί πρέπει να συγκολληθεί και στις δύο πλευρές της πλακέτας, κάτι που δυσχεραίνει σε μεγάλο βαθμό την κατασκευαστική διαδικασία αφού σε περίπτωση βλάβης κάποιου εξαρτήματος είναι πολύ δύσκολη η αποκόλληση και απομάκρυνσή του.

3.4.3.2 Δημιουργία οπών στο BioBoard για καλύτερη στήριξη ηλεκτροδίων

Στη σχεδίαση του BioBoard λήφθηκε υπόψη η πιθανότητα χρήσης του σε εναλλασσόμενα πεδία οπότε τόσο οι απολήξεις του χαλκού όσο και τα ηλεκτρόδια σύνδεσης με τους αισθητήρες κρατήθηκαν σε ικανές αποστάσεις ώστε τα παρασιτικά που εμφανίζονται να είναι κατά το δυνατό μικρότερα. Επίσης, τα ηλεκτρόδια επαφής με τις συστοιχίες κατασκευάστηκαν από χαλκό για τη μείωση των παρασιτικών χωρητικοτήτων στη διεπαφή απόληξης – ηλεκτροδίου. Η μοναδική βελτίωση που προτείνεται για την καλύτερη μηχανική στήριξη των ηλεκτροδίων είναι η διάτρηση των μεταλλικών επαφών που στηρίζονται τα ηλεκτρόδια ώστε το ηλεκτρόδιο να συγκολλείται και στην κάτω πλευρά της. Έτσι θα αυξηθεί η μηχανική αντοχή του ηλεκτροδίου και θα αποφορτιστεί η επιφάνεια (pad) από τη μηχανική τάση κατά την τοποθέτηση του δείγματος. Με αυτή τη μικρή βελτίωση, λοιπόν, μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα αστοχίας της διάταξης από λανθασμένη τοποθέτηση του δείγματος.

Η πειραματική διάταξη λειτούργησε απρόσκοπτα και χωρίς να χρειαστούν παρεμβάσεις ή τροποποιήσεις για την εκ των υστέρων βελτίωσή της. Στο σύνολο θα μπορούσαν να γίνουν κάποια σχόλια όσον αφορά το κατασκευαστικό μέρος. Αρχικά, η φιλοσοφία του σχεδιασμού χρησιμοποιεί μηχανικά ρελέ τα οποία πλέον θεωρούνται ξεπερασμένα. Εναλλακτικά η σχεδίαση μπορεί να γίνει με χρήση τρανζίστορ MOSFET σε λειτουργία αναλογικού διακόπτη (analog switch). Τα ρεύματα που διαρρέουν το κύκλωμα μεταγωγής είναι μικρά, της τάξης των 100mA. Με τη χρήση αναλογικών διακοπών τα ρεύματα αυτά περιορίζονται σε τάξεις μεγέθους των μερικών mA και η αξιοπιστία της διάταξης αυξάνεται κατακόρυφα. Επίσης, με τη χρήση αναλογικών διακοπών μπορούν να ενσωματωθούν περισσότερα από 8 κυκλώματα για αντίστοιχες εφαρμογές.

Σε μετρήσεις ευαίσθητων συστημάτων είναι θεμιτό οι εντάσεις των ρευμάτων γύρω από την υπό μέτρηση διάταξη (Device Under Test) να είναι κατά το δυνατό μικρότερες για την αποφυγή θορύβου. Αυτό κυρίως συμβαίνει σε μετρήσεις εναλλασσόμενου ρεύματος. Θεωρούμε ότι οι μετρήσεις συνεχούς ρεύματος είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητες. Κατά σχεδιασμό, όμως, μίας πειραματικής διάταξης πρέπει οι δυνατότητες που ενσωματώνονται σε αυτή να προβλέπουν πιθανές μελλοντικές χρήσεις πέρα από την άμεση εφαρμογή ώστε η διάταξη αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω με καθόλου ή μικρές τροποποιήσεις.

Εν κατακλείδι, η παρούσα διάταξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για μετρήσεις συνεχούς ρεύματος όσο και για μετρήσεις εναλλασσόμενου ρεύματος έως τις μεσαίες συχνότητες χωρίς την εμφάνιση αξιόλογων παρασιτικών μεγεθών. Τα παρασιτικά μεγέθη αναμένονται να εμφανιστούν σε συχνότητες μεγαλύτερες του 1 MHz και θα οφείλονται κυριότερα στη γεωμετρία της διάταξης. Τα παρασιτικά αυτά είναι σταθερά σε κάθε συχνότητα και αφαιρούνται εύκολα από το συνολικό σήμα. Ωστόσο, πριν από τη χρήση της διάταξης σε οποιαδήποτε τέτοια εφαρμογή απαιτείται ακριβής προσδιορισμός των παρασιτικών μεγεθών (κυρίως χωρητικότητα, ίσως επαγωγή) ώστε αυτά να αφαιρούνται κατά την επεξεργασία.

3.5 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία βασίζεται στην υπόθεση του κορεσμού. Ένας αισθητήρας ο οποίος βρίσκεται σε περιβάλλον μηδενικής υγρασίας (π.χ. κενό, ατμόσφαιρα αζώτου κτλ) εμφανίζει αντίσταση που είναι ανάλογη με την επιφανειακή κάλυψη των νανοσωματιδίων που έχουν επικαθίσει ανάμεσα στα ηλεκτρόδια. Κατά τη μικροσκοπική θεώρηση, η αντίσταση μεταξύ δύο νανοσωματιδίων βασίζεται στις ιδιότητες του φράγματος δυναμικού που υπάρχει ανάμεσα στα δύο νανοσωματίδια. Δηλαδή, εξαρτάται από την πιθανότητα που έχει ένα ηλεκτρόνιο να διαδοθεί μέσω σήραγγας από ένα νανοσωματίδιο σε ένα άλλο.

Όταν μεταβληθούν οι ιδιότητες του περιβάλλοντος μέσου των νανοσωματιδίων (πχ υγρασία) τότε θα μεταβληθεί και η μακροσκοπικά μετρούμενη αντίσταση. Με βάση αυτή τη λογική, πάνω στον αισθητήρα τοποθετείται μια σταγόνα 2μL ρυθμιστικού διαλύτη. Το περιβάλλον μέσο των νανοσωματιδίων γίνεται ακαριαία πιο αγώγιμο, επομένως η μετρούμενη αντίσταση μειώνεται.

Λόγω της κινητικής ενέργειας της σταγόνας (επομένως και των μορίων – ιόντων που περιέχει) απαιτείται ένας ικανός χρόνος που κυμαίνεται μεταξύ 30-150 sec για να σταθεροποιηθεί η αντίσταση. Λόγω της τυχαιότητας του δικτύου των νανοσωματιδίων ο χρόνος που απαιτείται για τη σταθεροποίηση κάθε αισθητήρα είναι διαφορετικός. Όταν, όμως, όλοι οι αισθητήρες ισορροπήσουν στην νέα τιμή της αντίστασης, τότε αφήνεται με προσοχή άλλη μια σταγόνα ρυθμιστικού διαλύματος στην επιφάνεια της πρώτης.

Όταν ισορροπήσουν εκ νέου οι αισθητήρες τότε θεωρούμε πως υπάρχει πλέον κορεσμός από τον διαλύτη οπότε σε ικανό χρόνο εναποτίθεται η σταγόνα που περιέχει την προσδοκώμενη συγκέντρωση ολιγομερών – στόχων. Αν το ολιγομερές – στόχος που εναποτίθεται είναι πλήρως συμπληρωματικό τότε διαχυθεί προς την επιφάνεια του αισθητήρα και θα υβριδοποιηθεί με το μόριο – ιχνηλάτη. Αν το μόριο στόχος δεν είναι συμπληρωματικό, θα διαχυθεί σε όλο τον όγκο της

σταγόνας και θα αναπτύξει μη συγκεκριμένους δεσμούς με το υπόστρωμα ή με κάποια βάση από τον μη-συμπληρωματικό κλώνο. Λόγω της νέας ρίψης διαλύτη, ο αισθητήρας επηρεάζεται λόγω των κινητικών φαινομένων (συνήθως έως 10 sec) και η αντίστασή του πέφτει εκ νέου. Στη μόνιμη κατάσταση όμως, η πτώση της αντίστασής του οφείλεται στην υβριδοποίηση των ολιγομερών αφού προηγουμένως έχουμε εξασφαλίσει ότι ο αισθητήρας έχει κορεστεί από διαλύτη με διαδοχικές ρίψεις.

Η πτώση της αντίστασης ενός αισθητήρα που έχει γίνει ρίψη μη συμπληρωματικών ολιγομερών, οφείλεται στη μικρή αλλαγή των ιδιοτήτων της επιφάνειας λόγω των ολιγομερών-στόχων. Όμως, επειδή δεν έχει γίνει υβριδοποίηση, είναι εμφανές ότι τα ολιγομερή – δείκτες παραμένουν μονωτικά και δεν ευνοούν τη μεταφορά φορτίου. Θεωρητικά λοιπόν, η αντίσταση ενός τέτοιου αισθητήρα θα μειωθεί σε μικρότερο βαθμό. Η πτώση της αντίστασης, από την άλλη, ενός αισθητήρα με πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή θα οφείλεται στην υβριδοποίηση αφού το υβριδοποιημένο, πλέον, ολιγομερές είναι πολλαπλάσια αγωγίμο εν αντιθέσει με το μη υβριδοποιημένο.

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης, λοιπόν, δύο τέτοιων αισθητήρων θα αποτελέσει χειροπιαστή απόδειξη για την επιτυχία της μεθόδου.

Για την εξασφάλιση της ορθότητας της παραπάνω μεθοδολογίας έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα ελέγχου στους ίδιους αισθητήρες που χρησιμοποιήθηκαν για την μετέπειτα υβριδοποίηση, στα οποία έγινε επαναληπτικά ρίψη σταθερής ποσότητας διαλύτη έως ότου η αντίσταση έπαυε να αλλάζει, όπως θα φανεί στη συνέχεια. Όταν ο αισθητήρας έφτανε σε κορεσμό τότε γινόταν η εναπόθεση του διαλύτη με τη γνωστή συγκέντρωση ολιγομερών αφού θεωρήθηκε πως περαιτέρω αλλαγή στην αγωγιμότητα οφείλεται μόνο στα ολιγομερή.

Η μέθοδος για την ανίχνευση της υβριδοποίησης βασίζεται μόνο στη διαφορά της απόκρισης ομοειδών αισθητήρων που έχουν μη - συμπληρωματικούς κλώνους - ιχνηλάτες με αυτούς που έχουν πλήρως συμπληρωματικούς. Για να θεωρηθούν δύο αισθητήρες ομοειδείς πρέπει:

- Να έχουν το ίδιο διάκενο.
- Να έχουν παρόμοια αντίσταση.

3.5.1 Εύρος επιθυμητών αντιστάσεων για την αποτελεσματικότητα των βιοαισθητήρων

Οι αισθητήρες που χρησιμοποιήθηκαν στα εν λόγω πειράματα είχαν αντιστάσεις που κυμαίνονταν μεταξύ της τάξης των 10 MΩ έως την τάξη των 10 kΩ. Η διαφορά στην αντίσταση

οφείλεται, προφανώς, στα διαφορετικά διάκενα δεδομένης της ομοιόμορφης επιφανειακής κάλυψης του αισθητήρα με νανοσωματίδια.

Όταν οι αισθητήρες έχουν παρόμοια αντίσταση, μπορούμε με σχετική ασφάλεια να υποθέσουμε ότι η μορφολογία του υμενίου είναι ίδια και ότι οι ενδοαποστάσεις των νανοσωματιδίων είναι ανάλογες. Επομένως, στα ίδια ερεθίσματα θα υπάρχει ανάλογη απόκριση.

3.5.2 Συγκεντρώσεις βιολογικού υλικού που χρησιμοποιήθηκαν

Η ανίχνευση της υβριδοποίησης βασίζεται σε δύο σκέλη. Αφενός την συγκέντρωση των κλώνων που ακινητοποιούνται στην επιφάνεια του αισθητήρα και αφετέρου στη συγκέντρωση των κλώνων – στόχων που εναποτίθενται. Ρυθμίζοντας την επιφανειακή πυκνότητα των ολιγομερών – στόχων είναι δυνατή η υβριδοποίηση περισσότερων πλήρως συμπληρωματικών στόχων, επομένως η πτώση της αντίστασης θα είναι μεγαλύτερη.

Στα πειράματα που διεξήχθησαν, έγινε αρχικοποίηση της μελέτης χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 10μΜ τόσο σε ολιγομερή – ιχνηλάτες όσο και σε ολιγομερή – στόχους. Στη συνέχεια έγινε ένα πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν 10 μΜ δεικτών και 1μΜ στόχων. Τέλος, έγινε πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε 1 μΜ δεικτών και 1μΜ στόχων.

3.5.3 Επεξεργασία των μετρήσεων

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας γίνεται επεξεργασία των δεδομένων στην οποία συγκρίνεται η απόκριση των αισθητήρων που είχαν πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή με αυτούς που είχαν μη συμπληρωματικά ολιγομερή στην επιφάνειά τους. Συγκεκριμένα, λαμβάνεται η σχετική πτώση των αντιστάσεων των αισθητήρων και η διαφορά τους είναι αυτή που υποδεικνύει την επιτυχή ανίχνευση.

Η αλγεβρική σχέση που χρησιμοποιήθηκε είναι η:

$$\frac{\Delta R}{R0} \Big|_{FC} - \frac{\Delta R}{R0} \Big|_{NC} \quad (4.1)$$

Αν η διαφορά είναι θετική τότε θεωρούμε πως έχει επιτευχθεί ανίχνευση. Σε μερικές περιπτώσεις, η διαφορά που προέκυψε ήταν της τάξης του 500%. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι εύκολο να υποτεθεί ότι κάποια αστάθμητη παράμετρος συνέβαλλε (πχ. Βραχυκύκλωμα του αισθητήρα με πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή από τον διαλύτη) και τότε το αποτέλεσμα αυτό απορρίπτεται. Αντίστοιχα συμβαίνει και στην περίπτωση της εμφάνισης αρνητικής διαφοράς.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης, αποτελούνταν μερικές φορές από 6 αισθητήρες αντί για 8. Αυτό συνέβαινε λόγω της θέσης του δείγματος στο δισκίο

πυριτίου που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των αισθητήρων. Τα αποτελέσματα των αισθητήρων που δεν είχαν ομοειδείς δεν λαμβάνονταν υπόψη. Συνήθως αυτό συνέβαινε με αισθητήρες διακένου 5 και 2μm.

3.6 Επίλογος

Η συνολική μελέτη, θα είναι αυτή που θα δείξει αν η ανίχνευση της υβριδοποίησης είναι επιτυχής. Με άλλα λόγια, σε αυτή την προκαταρκτική φάση της μελέτης, η επιτυχία ή όχι της μεθόδου κρίνεται από τη στατιστική επεξεργασία των πειραμάτων και όχι τόσο από τα αυτά πειράματα.

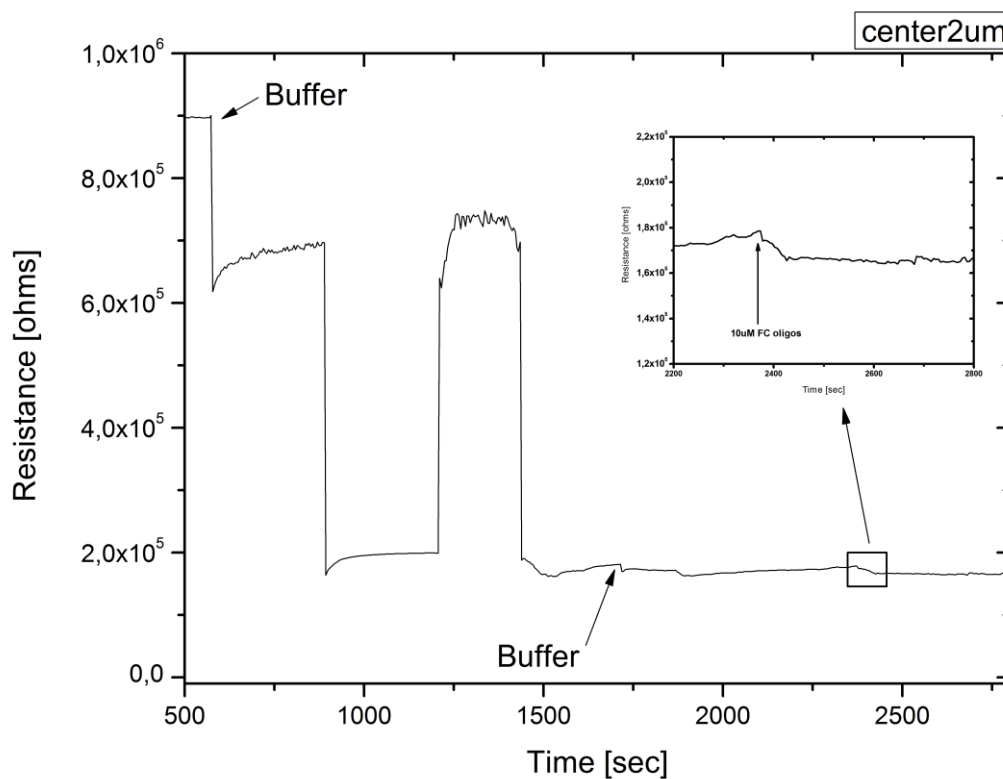
Η ύπαρξη επαρκούς στατιστικού δείγματος μπορεί να επιβεβαιώσει την ορθότητα της προσέγγισης αλλά και πόσο η ίδια είναι επαρκής για την ανίχνευση υβριδοποίησης σε χαμηλές συγκεντρώσεις (<100 nM) αλλά και στην ανίχνευση της υβριδοποίησης κλώνων με αστοχίες βάσεων.

Η μέση τιμή της απόκρισης για κάθε συγκέντρωση (δεδομένου ότι όλοι οι αισθητήρες έχουν ανάλογες αντιστάσεις και ανάλογες συγκεντρώσεις ακινητοποιημένων μορίων στην επιφάνειά τους) θα είναι η «ταυτότητα» της κάθε συγκέντρωσης. Αντίστοιχα, αν η τυπική απόκλιση δεν αυξάνεται σημαντικά, θα καθορίζει αν κάθε συγκέντρωση είναι πράγματι διακρίσιμη.

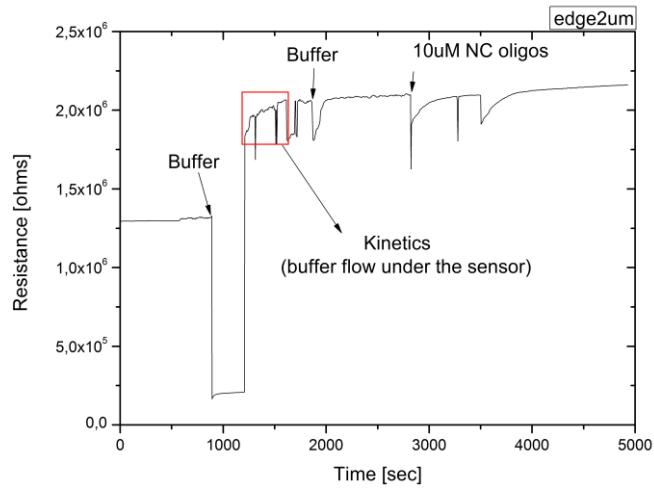
Κεφάλαιο 4^ο - Πειραματικά Αποτελέσματα

4.1 - Αποτελέσματα

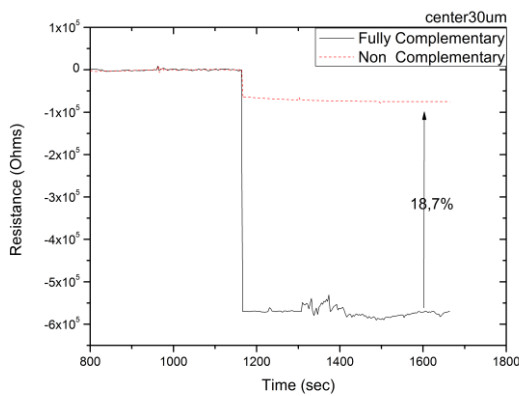
Η διεξαγωγή μεταβατικών μετρήσεων αποτέλεσε τη βέλτιστη λύση για την παρακολούθηση του φαινομένου σε πραγματικό χρόνο. Τόσο κατά τη ρίψη διαλύτη όσο και κατά τη ρίψη των ολιγομερών (συμπληρωματικών ή μη) η τεχνική αυτή συνέβαλε στην κατανόηση της κατάστασης του αισθητήρα και στην άμεση αποτύπωση των φαινομένων που εκτυλίσσονται κατά την υβριδοποίηση. Παράλληλα όμως αυξήθηκαν οι παράμετροι που πρέπει να προσδιοριστούν για την πλήρη κατανόηση όλων των φαινομένων που υπεισέρχονται. Στην παρούσα μελέτη, για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων αρκούν τα δεδομένα που λαμβάνονται μετά τη χρονική στιγμή που εναποτίθεται η σταγόνα που περιέχει τα ολιγομερή – στόχους πάνω στους αισθητήρες. Κάθε προηγούμενη μεταβολή της αντίστασης του αισθητήρα δε λαμβάνεται υπόψη. Στην εικόνα 4.1 φαίνονται τα μεταβατικά διαγράμματα που προέκυψαν από τα πειράματα.



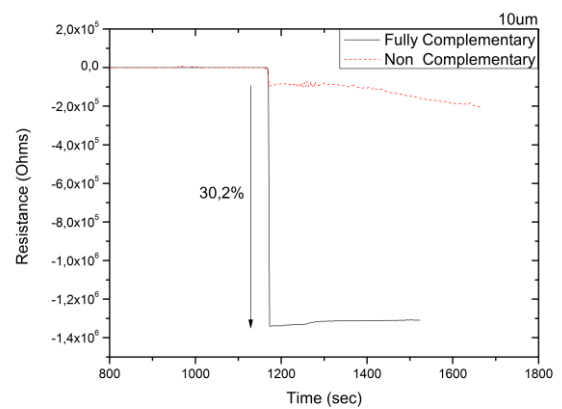
(α)



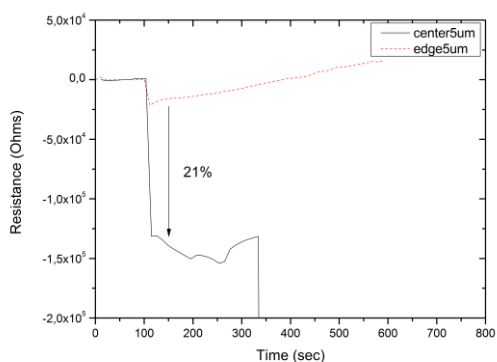
(β)



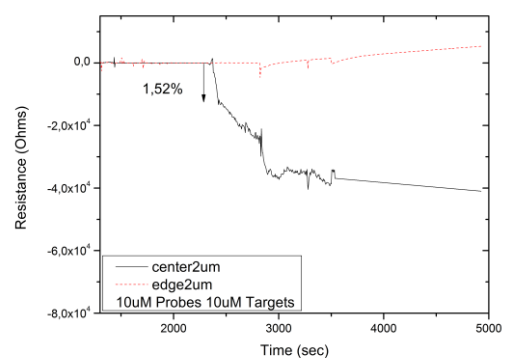
(γ)



(δ)



(ε)

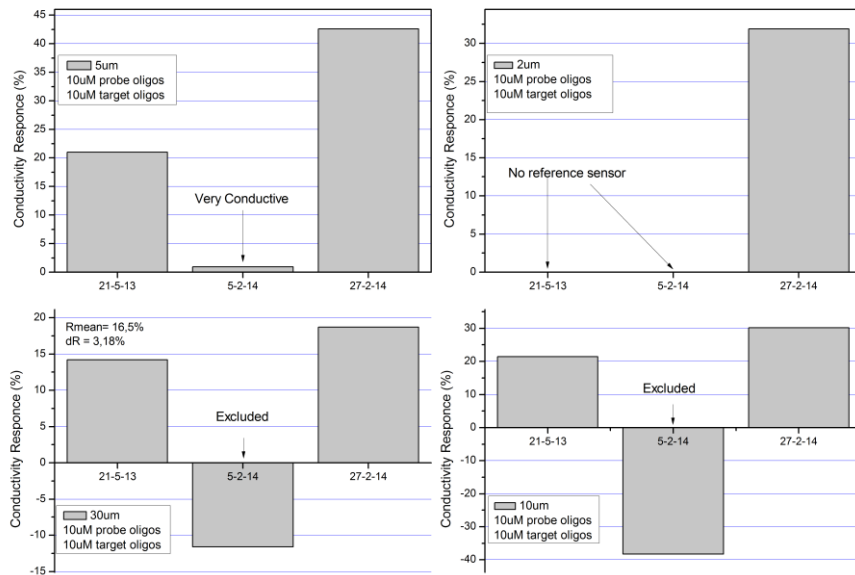


(στ)

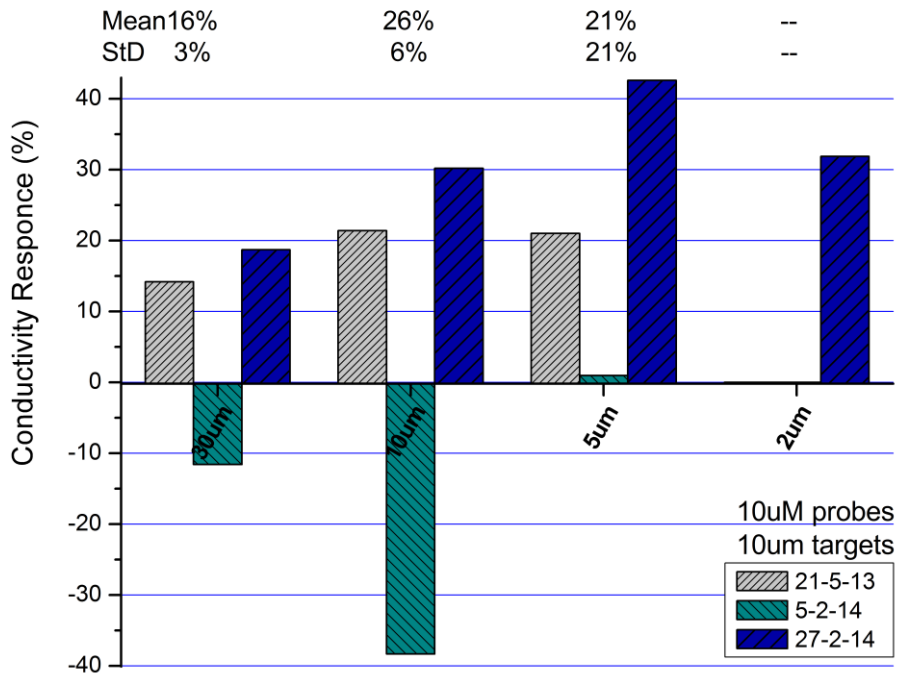
Εικόνα 4.1: (α) Μεταβατικό διάγραμμα αισθητήρα διακένου 2 μm με 10μM πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή. Το σκαλοπάτι που εικονίζεται στα 1700 sec οφείλεται σε κινητικά φαινόμενα, και συγκεκριμένα στην κίνηση όλης της σταγόνας στην επιφάνεια της συστοιχίας. Όταν αυτή σταματά, τότε η αντίσταση του αισθητήρα επανέρχεται. (β) Μεταβατικό διάγραμμα αισθητήρα διακένου 2 μm με 10μM μη συμπληρωματικά ολιγομερή. Η αρχική άνοδος στην αντίσταση οφείλεται στο γεγονός ότι ο διαλύτης είναι λιγότερο αγωγίμος. (γ)-(στ) Επεξεργασμένα διαγράμματα με την

απόκριση ομοειδών αισθητήρων σε πλήρως συμπληρωματικά ολιγομερή (μαύρη συνεχής γραμμή) και μη συμπληρωματικά ολιγομερή (κόκκινη εστιγμένη γραμμή).

Τα πρώτα πειράματα διεξήχθησαν με συγκεντρώσεις 10 uM τόσο σε μόρια ιχνηλατών όσο και μόρια στόχων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι δυνατή η ανίχνευση της υβριδοποίησης εξαρτάται όμως από πειραματικές παραμέτρους που δεν είναι πάντα ελέγξιμες. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την εικόνα 4.2 όπου στους αισθητήρες με διάκενο 5μm η μεγάλη αγωγιμότητα του δείγματος από το δίκτυο των νανοσωματιδίων συντέλεσε σε μικρή απόκριση. Στους αισθητήρες των 30 και 10 μm, οι αισθητήρες αναφοράς (μη συμπληρωματικά ολιγομερή) έδειξαν μεγαλύτερη πτώση ίσως και λόγω κάποιου βραχυκυκλώματος. Αυτό έχει ως άμεσο αποτέλεσμα πολλά πειράματα να μην δείχνουν τα προσδοκώμενα αποτελέσματα.



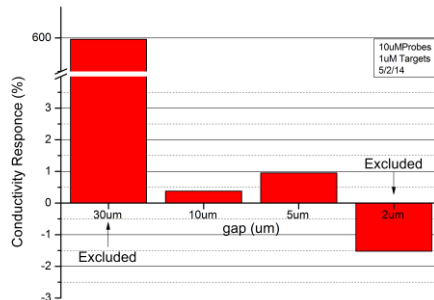
Εικόνα 4.2: Επίδραση της αγωγιμότητας στην απόκριση των αισθητήρων.



Εικόνα 4.3: Απόκριση αισθητήρων από 10μΜ ιχνηλάτες, 10uM στόχους.

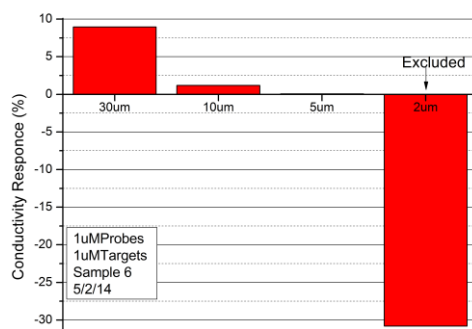
Στην εικόνα 4.3 απεικονίζεται η συνολική απόκριση των αισθητήρων στα τρία πειράματα που έγιναν με συγκεντρώσεις 10 μΜ σε δείκτες και στόχους. Το στατιστικό δείγμα είναι πολύ μικρό για να χρησιμοποιηθεί για ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων, τυπικά όμως εικονίζονται τα αποτελέσματα στατιστικής επεξεργασίας. Τα αποτελέσματα του αισθητήρα των 30 μm είναι αυτά που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συνέπεια.

Οι αποκρίσεις του πειράματος με 1μΜ στόχους (εικόνα 4.4) ήταν μειωμένες, όπως είναι αναμενόμενο, καθότι υπάρχουν λιγότεροι διαθέσιμοι κλώνοι προς υβριδοποίηση. Τα αποτελέσματα των αισθητήρων με διάκενο 30 και 2 μm έχουν αποκλειστεί για τους λόγους που προαναφέρθηκαν.



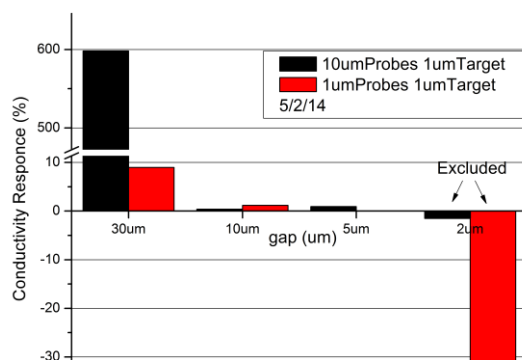
Εικόνα 4.4: Απόκριση των αισθητήρων για 1μΜ στόχων.

Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε η εξάρτηση της απόκρισης από τη συγκέντρωση των ακινητοποιημένων μορίων στην επιφάνεια του αισθητήρα. Στην επιφάνεια του δείγματος ακινητοποιήθηκαν μόρια- δείκτες με συγκέντρωση 1 μM για να διαπιστωθεί αν στην επιφάνεια του αισθητήρα έχει περιέλθει κορεσμός από μόρια – ιχνηλάτες.

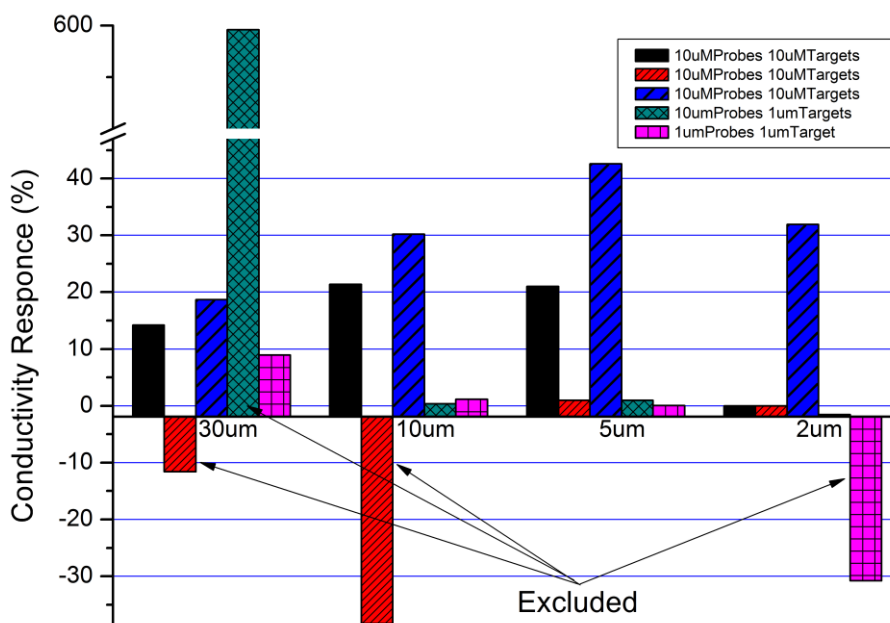


Εικόνα 4.5: Απόκριση των αισθητήρων με 1 μM ιχνηλατών και 1 μM στόχων. Η απόκριση του αισθητήρα των 5 μm είναι 0,056%.

Στην εικόνα 4.6 φαίνεται συγκεντρωτικά η διαφορά στην απόκριση όταν ο αισθητήρας έχει υποδεκαπλάσια συγκέντρωση στην επιφάνειά του, σε σχέση με την αρχική (10 μM).



Εικόνα 4.6: Συγκεντρωτικό ιστόγραμμα της απόκρισης για 10 μM και 1 μM μορίων ιχνηλατών.



Εικόνα 4.7: Αποτελέσματα όλων των πειραμάτων.

Τέλος, στην εικόνα 4.7 εικονίζονται τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων. Είναι σαφής η αξιοπιστία των αισθητήρων με διάκενο 30μm έναντι των υπολοίπων. Επίσης φαίνεται η μειωμένη απόκριση των αισθητήρων όσο η συγκέντρωση των ακινητοποιημένων μορίων- στόχων φθίνει και κατά συνέπεια η μειωμένη απόκριση των αισθητήρων με 1μM σε στόχους και ιχνηλάτες.

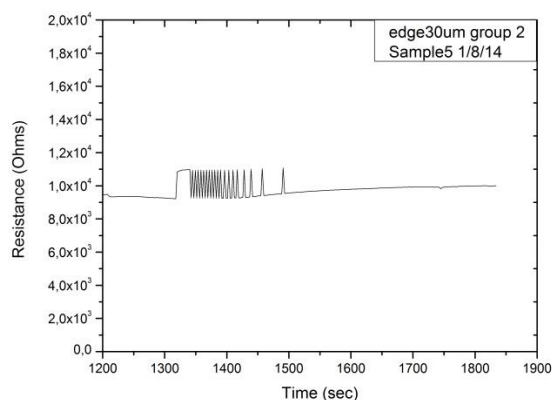
4.2 Συζήτηση

4.2.1 Επίδραση της αγωγιμότητας του διαλύτη

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μια μεθοδολογία με σκοπό όχι να προσδιοριστεί ποσοτικά η επιρροή του διαλύτη λόγω της αγωγιμότητάς του αλλά να βρεθεί πειραματικά πότε ο διαλύτης σταματά να επηρεάζει τον αισθητήρα. Για το λόγο αυτό έγινε επανειλημμένη ρίψη ίσης ποσότητας διαλύτη (2μL) πάνω στον αισθητήρα με επαρκή χρόνο αναμονής ανάμεσα στις ρίψεις έως ότου να σταθεροποιηθεί η αντίσταση του με το χρόνο. Αυτό έγινε επαναληπτικά έως ότου η αντίσταση του αισθητήρα έπαυε να αλλάζει. Όταν ο αισθητήρας έφτανε σε κορεσμό τότε ήταν δυνατή η ρίψη των μορίων – στόχων αφού η αλλαγή στην αντίσταση θα οφειλόταν μόνο στα μόρια – στόχους. [5]

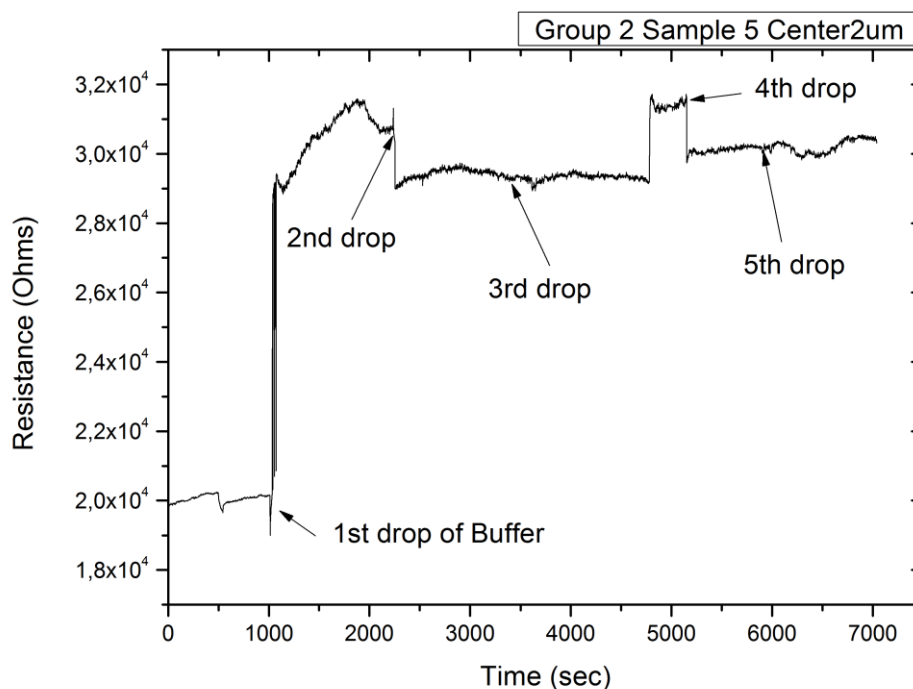
Η επίδραση του διαλύτη στις μετρήσεις υπήρξε ο μεγαλύτερος αντίλογος της αξιοπιστίας της μεθοδολογίας. Όμως, η συνεισφορά του μπορεί να αγνοηθεί πέρα από το σημείο όπου ο

αισθητήρας φθάνει σε κορεσμό. Ο κορεσμός ανιχνεύθηκε πειραματικά όταν κατά τη ρίψη διαλύτη στον αισθητήρα, αυτός επανέρχεται στην αρχική του αντίσταση μετά την πάροδο μιας μεταβατικής περιόδου. Η μεταβατική περίοδος οφείλεται στην κινητική ενέργεια της καινούριας σταγόνας. Ο χρόνος «ηρεμίας» κυμαίνεται από 30-150 δευτερόλεπτα. Όταν ο αισθητήρας αργεί να εισέλθει στην κατάσταση κορεσμού τότε συνήθως υπεισέρχονται φαινόμενα ροής του διαλύτη στην επιφάνεια του αισθητήρα, όπως φαίνεται στις εικόνες 4.1(α), 4.8.



Εικόνα 4.8: Ροή διαλύτη προς τις επαφές της συστοιχίας.

Στις περισσότερες από τις μετρήσεις που έγιναν, δύο ρίψεις ίσης ποσότητας διαλύτη σε σύντομο χρονικό διάστημα ήταν αρκετές για τη σταθεροποίηση του αισθητήρα. Υπήρξαν, όμως, αρκετές περιπτώσεις αισθητήρων που η ρίψη διαλύτη δημιούργησε ολίσθηση η οποία όμως δε σταμάτησε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις δε στάθηκε δυνατή η εξήγηση της προέλευσης αυτής της συμπεριφοράς και η ποσότητα ΔR λαμβάνονταν με την πάροδο 60-70 δευτερολέπτων μετά τη ρίψη του βιολογικού υλικού θεωρώντας ότι ήταν περισσότερο από επαρκής χρόνος για να διαχυθούν τα ολιγομερή – στόχοι έως την επιφάνεια του αισθητήρα. Σε κάθε περίπτωση είναι επιβεβλημένη μια ξεχωριστή μελέτη για την διερεύνηση της επίδρασης του διαλύτη στους αισθητήρες. Επίσης, η παρασκευή διαλύτη με μικρότερη συγκέντρωση αλάτων θα μπορούσε να αποτελέσει μια λύση για την ελαχιστοποίηση της επιρροής της αγωγιμότητας στους αισθητήρες.



Εικόνα 4.9: Συμπεριφορά αισθητήρα μετά από 5 ρίψεις διαλύτη.

4.2.2 Ευαισθησία των αισθητήρων ως συνάρτηση του διακένου τους

Από τα αποτελέσματα γίνεται σαφές ότι το μειούμενο διάκενο αυξάνει την απόκριση των αισθητήρων. Ταυτόχρονα η επιρροή των πειραματικών παραμέτρων που θα αναφερθούν παρακάτω διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στην απόκρισή τους. Για το λόγο αυτό, περισσότερο βάρος έπεσε στους αισθητήρες με διάκενο 30 και 10 μm , αφού αυτοί ήταν λιγότερο ευαίσθητοι και οι αποκρίσεις τους ήταν μεν μειωμένες αλλά ήταν περισσότερο αξιόπιστες. Οι αισθητήρες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σαν «οδηγοί» καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

4.2.3 Ευαισθησία των αισθητήρων ως συνάρτηση της αντίστασής τους

Οι αισθητήρες με μεγαλύτερη αντίσταση εμφάνισαν μεγαλύτερες διακυμάνσεις σε κάθε βήμα της πειραματικής διαδικασίας. Ταυτόχρονα όμως εμφάνισαν μεγαλύτερους χρόνους αποκατάστασης και τις κάποιες φορές μεγαλύτερο θόρυβο. Η προτίμηση, επομένως, μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων είναι καθαρά θέμα ακρίβειας των μετρητικών οργάνων. Δεδομένου ότι το όργανο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Keithley 2400 Multimeter) σε συνδεσμολογία δύο ακροδεκτών έχει διακριτική ικανότητα της τάξης $10^{-2}\Omega$, η ανίχνευση αλλαγών στην αντίσταση της τάξης του 0.1Ω είναι δυνατή, αλλά δεν είναι επιθυμητή. Τόσο μικρές τιμές στην αλλαγή της αντίστασης δεν είναι απαραίτητο ότι οφείλονται στο υπό μελέτη φαινόμενο, αλλά πιθανότατα σε κάποιο αστάθμητο παράγοντα (πχ βραχυκύκλωμα κάποιου αισθητήρα).

4.2.4 Θέση της σταγόνας

Η εναπόθεση των σταγόνων έγινε με πιπέττα, στοχεύοντας στο κέντρο των υπό μελέτη αισθητήρων κάθε φορά. Η ρίψη της πρώτης σταγόνας συνήθως αποτελούσε το όριο της διάχυσης των υπόλοιπων σταγόνων. Αν η πρώτη σταγόνα δεν ήταν σωστά τοποθετημένη πάνω από τους αισθητήρες υπήρχε αυξημένη πιθανότητα να διαχυθεί είτε στις επιφάνειες διασύνδεσης με την πλακέτα BioBoard είτε τη συνένωση με κάποια γειτονική σταγόνα αν αυτή ήταν στην κεντρική συστοιχία (“center”) αισθητήρων. Από την άλλη, αν η σταγόνα των αισθητήρων στα άκρα (συστοιχία “edge”) δεν τοποθετούταν στην ακριβή θέση υπήρχε κίνδυνος αυτή να διαχυθεί κάτω από το δείγμα. Σε εκείνη την περίπτωση, η αντίσταση εμφάνιζε μία συνεχή ολίσθηση με εξάρτηση από τη ροή της σταγόνας από την επιφάνεια.

Επομένως, η ακριβής τοποθέτηση του δείγματος, η σωστή ευθυγράμμιση των σταγόνων πάνω από τους αισθητήρες και κυριότερα η κλίση του δείγματος αποτελούν προϋποθέσεις για τη διεξαγωγή ενός επιτυχημένου πειράματος.

4.2.5 Θερμοκρασία

Αν και τα πειράματα διεξήχθησαν σε ελεγχόμενες θερμοκρασίες 20–24°C, η εξάτμιση του διαλύτη σίγουρα επηρέασε τα αποτελέσματα. Γι αυτό το λόγο, το πείραμα γίνονταν με τις ελάχιστες δυνατές καθυστερήσεις και η ρίψη διαλύτη (με ή χωρίς βιολογικό υλικό) γινόταν ακόμα και αν κάποιος αισθητήρας δεν είχε ισορροπήσει πλήρως. Αρκετές φορές, μετά τη δεύτερη ρίψη διαλύτη όλοι οι αισθητήρες ισορροπούσαν μετά από εύλογο χρόνο όπως φαίνεται στην εικόνα 4.7.

Η συμπεριφορά όμως της εικόνας δεν ήταν πάντα επαναλήψιμη. Δεν είχαν όλοι οι αισθητήρες την ίδια απόκριση, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η πτώση της αντίστασης οφείλεται σε διαλύτες και όχι στην υβριδοποίηση. Από αισθητήρες όπως της εικόνας 4.9 στάθηκε δυνατή η εξακρίβωση της ορθότητας της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

4.2.6 Φωτισμός

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρατηρήθηκε πως ο φωτισμός επηρεάζει την αγωγιμότητα της συστοιχίας. Συγκεκριμένα, οι αισθητήρες πάνω στους οποίους υπήρχε σταγόνα διαλύτη όταν αυτοί φωτίζονταν η αντίστασή τους έπεφτε και συνήθως σταθεροποιούταν σε μια χαμηλότερη τιμή χωρίς όμως να παρουσιάζει τάση για ολίσθηση. Προς αποφυγή όμως ανεξέλεγκτης συνεισφοράς στην αγωγιμότητα, όλα τα πειράματα διεξήχθησαν υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού ιδιαίτερα κοντά στην μετρητική διάταξη.

4.3 Μελλοντικές προοπτικές

Στο μέλλον θα πραγματοποιηθούν περισσότερα πειράματα ώστε να αυξηθεί το στατιστικό δείγμα σε κάθε συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης, θα γίνει αναλυτικότερη μελέτη της

επίδρασης της αγωγιμότητας του διαλύτη σε αισθητήρες με ακινητοποιημένα ολιγομερή- ιχνηλάτες. Τέλος, θα δοκιμαστεί η λειτουργία των αισθητήρων αυτών σε εναλλασσόμενα πεδία σε μεσαίες συχνότητες και υψηλές συχνότητες. Η μέθοδος αυτή αναμένεται να αυξήσει την απόκριση αφού εκτός από την διαφορά στην αντίσταση λόγω της υβριδοποίησης, σημαντικό ρόλο αναμένεται να διαδραματίσει η πτώση της χωρητικότητας στην επιφάνεια του αισθητήρα, λόγω της διάχυσης των ολιγομερών – στόχων. Τέλος, θα διερευνηθεί το κατώτατο όριο ανίχνευσης του αισθητήρα ρυθμίζοντας κατάλληλα τη συγκέντρωση των ακινητοποιημένων ολιγομερών – ιχνηλατών στην επιφάνεια του αισθητήρα.

4.4 Συζήτηση

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία προσέγγισε με επιτυχία το πρόβλημα. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το σύνολο των πειραμάτων φαίνεται να παρουσιάζουν διακυμάνσεις στην απόκριση. Οι διακυμάνσεις αυτές οφείλονται στον σχετικά μικρό αριθμό πειραμάτων που διεξήχθησαν. Με την επανάληψη των ίδιων πειραμάτων με περισσότερα δείγματα θα επιτευχθεί η δημιουργία μίας απόκρισης – αποτυπώματος για κάθε συγκέντρωση και διάκενο.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων έγινε προσπάθεια να αναγνωριστούν οι μηχανισμοί που δρουν ταυτόχρονα με την υβριδοποίηση του βιολογικού υλικού με σκοπό να καταστεί δυνατή η απομόνωσή τους και να εστιαστεί η μελέτη μόνο στο γεγονός της υβριδοποίησης.

Η μέθοδος αυτή συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις των μικροσυστημάτων, στις οποίες γίνεται προσπάθεια σμίκρυνσης των διαστάσεων των διατάξεων αλλά και ταυτόχρονα μείωσης των ποσοτήτων των υλικών που χρησιμοποιούνται (βιολογικά υλικά, διαλύτες κτλ).

Βιβλιογραφία

- [1] J. L. Tanner, D. Mousadakos, K. Giannakopoulos, E. Skotadis και D. Tsoukalas, «High strain sensitivity controlled by the surface density of platinum nanoparticles,» *Nanotechnology*, τόμ. 23, 2012.
- [2] Λ. Μαδιανός, Χημικοί αισθητήρες νανοσωματιδίων, Μεταπτυχιακή Εργασία, Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2013.
- [3] «<http://www.sigmaaldrich.com/>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440167?lang=en®ion=GR>.
- [4] G. Tsekenis, M. Chatzipetrou, J. Tanner, S. Chatzandroulis, D. Thanos, D. Tsoukalas και I. Zergioti, «Surface functionalization studies and direct laser printing of oligonucleotides toward the fabrication of a micromembrane DNA capacitice biosensor,» *Sensors and Actuators B*, τόμ. 175, pp. 123-131, 2012.
- [5] Ε. Σκοτάδης, Αυτοοργάνωση Νανοσωματιδίων με Εφαρμογές σε Χημικούς Αισθητήρες, Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2013.
- [6] «www.newsroom.intel.com/community,» intel, 2014. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://newsroom.intel.com/community/intel_newsroom/blog/2014/08/11/intel-discloses-newest-microarchitecture-and-14-nanometer-manufacturing-process-technical-details. [Πρόσβαση 02 09 2014].
- [7] A. M. Ionescu, «Nanoelectronics roadmap: evading Moore's law,» 2008. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://eda-publishing.imag.fr/ewme2008/htmls/pdfs/I4.pdf>.
- [8] A. Tsigara, B. Mourched, P. Falgayrettes, B. Belier, E. Nativel, R. Kribich, P. Etienne, S. Calas και P. Gall-Borrut, «Fabrication and mechanical properties of an organo-mineral cantilever-based probe for near-field optical microscopy,» *Sensors and Actuators A*, τόμ. 212, pp. 12-17, 2014.
- [9] J. W. Gardner, Μικροαισθητήρες - Αρχές και Εφαρμογές, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα, 2000, pp. 15-21.
- [10] B. Giese, «Electron transfer in DNA,» *Current Opinion in Chemical Biology*, τόμ. 6, p. 612–618, 2002.
- [11] Mishra, P. Deepti και Sourav, «Ionization potential and structure relaxation of adenine, thymine, guanine and cytosine bases and their base pairs: A quantification of reactive sites,» *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, τόμ. 902, αρ. 1-3, pp. 96-102, 2009.
- [12] E. M. Boon και B. J. K., «Charge transport in DNA,» *Current Opinion in Structural Biology*, τόμ. 12, pp. 320-329, 2002.

- [13] J. M. Artés, M. López-Martínez, I. Díez-Pérez, F. Sanz και P. Gorostiza, «Nanoscale charge transfer in redox proteins and DNA: Towards biomolecular electronics,» *Electrochimica Acta*, τόμ. 140, pp. 83-95, 2014.
- [14] M. Bixon και J. Jortner, «Charge Transport in DNA Via Thermally Induced Hopping,» *J. Am. Chem. Soc.*, τόμ. 123, pp. 12556-12567, 2001.
- [15] E. M. Conwell, «Charge transport in DNA in solution: The role of polarons,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, τόμ. 102, αρ. 25, pp. 8795-8799, 2005.
- [16] S. Tokonami, H. Shiigi και T. Nagaoka, «Preparation of Nanogapped Gold Nanoparticle Array for DNA Detection,» *Electroanalysis*, τόμ. 20, αρ. 4, p. 355 – 360, 2008.
- [17] S. Tokonami, H. Shiigi και T. Nagaoka, «Open Bridge - Structured Gold Nanoparticle Array for Label Free DNA Detection,» *Analytical Chemistry*, τόμ. 80, αρ. 21, pp. 8071-8075, 2008.
- [18] T. Hianik, V. Gajdos, R. Krivanek, T. Oretskaya, V. Metelev, E. Volkov και P. Vadgama, «Amperometric detection of DNA hybridization on the gold surface depends on the orientation of oligonucleotide chains,» *Biochemistry*, τόμ. 53, pp. 199-204, 2001.
- [19] C. S. Ah, Y. J. Yun, H. J. Park, S. K. Jung, W.-J. Kim, D. H. Ha και W. S. Yun, «Electric detection of DNA hybridization by nanoparticle nanoswitch,» *Current Applied Physics*, τόμ. 6S1, p. 157 – 160, 2006.
- [20] T. L. Chang, Y. W. Lee, C. C. Chen και K. F. Hsiang, «Effect of different gold nanoparticle sizes to build an electrical detection DNA between nanogap electrodes,» *Microelectronic Engineering*, τόμ. 84, pp. 1698-1701, 2007.
- [21] A. L. Moreau, R. Janissen, C. A. Santos, L. A. Peroni, D. R. Stach-Machado, A. A. deSouza, A. P. deSouza και M. A. Cotta, «Highly-sensitive and label-free indium phosphide biosensor for early phytopathogen diagnosis,» *Biosensors and Bioelectronics*, τόμ. 36, pp. 62-68, 2012.
- [22] Y. T. Cheng, C. Y. Tsai και P. H. Chen, «Development of an integrated CMOS DNA detection biochip,» *Sensors and Actuators B*, τόμ. 120, p. 758 – 765, 2007.
- [23] L. Su, W. Jia, C. Hou και Y. Lei, «Microbial biosensors: A review,» *Biosensors and Bioelectronics*, τόμ. 26, αρ. 5, pp. 1788-1799, 2011.
- [24] E. Barsoukov και J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications*, Δεύτερη επιμ., John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [25] H. Shiigi, S. Tokonami, H. Yakabe και T. Nagaoka, «Label – Free Electronic Detection of DNA – Hybridization on Nanogapped Gold Particle Film,» *J. Am. Chem. Soc.*, τόμ. 127, αρ. 10, 2005.
- [26] H. Shiigi, S. Tokonami, Y. Yamamoto και T. Nagaoka, «Placement of Nanospace on an Electrode

- for Biosensing,» *Analytical Sciences*, τόμ. 28, pp. 1037-1047, 2012.
- [27] C.-C. Chen, F.-H. Ko, C. –. Chen, T. –. F. Liu και E. Yi Chang, «Electrical signal amplification of DNA hybridization by nanoparticles in a nanoscale gap,» *Applied Physics Letters*, τόμ. 91, 2007.
- [28] C. C. Chen, F. H. Ko, E. Y. Chang, F. C. Chang και S. W. Kuo, «Hybridization sensing by electrical enhancement with nanoparticles in nanogap,» *Journal of Vacuum Science and Technology B*, τόμ. 26, αρ. 6, 2008.
- [29] D. Berdat, A. Marin, F. Herrera και M. A. Gijs, «DNA biosensors using fluorescence microscopy and impedance spectroscopy,» *Sensors and Actuators B*, τόμ. 118, pp. 53-59, 2006.
- [30] Π. Γιαννακουδάκης, «<http://www.chem.auth.gr>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.chem.auth.gr/content/physical_lab/panjian/EIS/e10.pdf. [Πρόσβαση 1 10 2014].
- [31] J. R. Macdonald, «Impedance Spectroscopy,» *Annals of Biomedical Engineering*, τόμ. 20, pp. 289-305, 1992.
- [32] A. A. Ensafi, M. Taei, H. Rahmani και T. Khayamiian, «Sensitive DNA impedance biosensor for detection of cancer, chronic lymphocytic leukemia, based on gold nanoparticles/gold modified electrode,» *Electrochimica Acta*, τόμ. 56, pp. 8176-8183, 2011.
- [33] J. Kafka, O. Panke, B. Abendroth και F. Lisdat, «A label free DNA sensor based on Impedance Spectroscopy,» *Electrochimica Acta*, τόμ. 53, pp. 7467-7474, 2008.
- [34] «<http://publiclab.org/>,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://publiclab.org/wiki/potentiostat>.
- [35] R. R. Sinden, M. J. Pytlos - Sinden και V. N. Potaman, «Slipped stand DNA structures,» *Frontiers in Bioscience*, τόμ. 12, pp. 4788-4799, 2007.
- [36] F. Bonet, V. Delmas, S. Grugeon, R. Herrera Urbina, P.-Y. Silvert και K. Tekaiia-Elhissen, «Synthesis of monodisperse Au, Pt, Pd, Ru and Ir nanoparticles in ethylene glycol,» *NanoStructured Materials*, τόμ. 11, αρ. 8, pp. 1277-1284, 2000.
- [37] J. Kua και W. A. I. Goddard, «Chemisorption of Organics on Platinum. 2. Chemisorption of C₂H_x and CH_x on PT (111),» *J. Phys. Chem. B*, τόμ. 102, pp. 9492-9500, 1998.
- [38] Keithley Instruments, Inc., «Ohms Measurements,» σε *2400 Series SourceMeter User's Manual*, Cleveland, Ohio, U.S.A., 2002, pp. 4-2, 4-10.
- [39] V. Perumal και U. Hashim, «Advances in biosensors: Principle, architecture and applications,» *Journal of Applied Biomedicine*, τόμ. 12, pp. 1-15, 2014.

