



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ & ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ
ΧΡΟΝΟ ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΤΗΝ
ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΘΕΣΗΣ ΠΕΡΙΟΔΙΚΩΝ
ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΩΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΟ ΠΥΡΙΤΙΟ**

ΙΩΑΝΝΗΣ ΑΡΧΟΝΤΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΙΣΙΑΚΟΣ, Ερευνητής Α΄ Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΑΘΗΝΑ 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το παρόν κείμενο αποτελεί αντικείμενο διπλωματικής εργασίας στον τομέα της Ανοσοανάλυσης, με τίτλο «ΒΙΟΑΝΑΛΥΤΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΘΕΣΗΣ ΠΕΡΙΟΔΙΚΩΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΩΝ ΠΑΝΩ ΣΕ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΟ ΠΥΡΙΤΙΟ». Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο ίδρυμα ερευνών ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος και συγκεκριμένα στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Ραδιενεργών και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα ερευνητή Δρ. Κωνσταντίνο Μισιακό, Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Μικροηλεκτρονικής του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας αλλά και για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση που μου έδειξε κατά την διάρκειά της. Οι γνώσεις του και η εμπειρία του ήταν καθοριστικές για τη διεκπεραίωση του πειράματος και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Αλέξανδρο Σαλαπάτα, για την άριστη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του πειράματος, στο σκέλος της επεξεργασίας, την ομάδα των τεχνικών του καθαρού καθώς και τον Α. Μποτσιαλά για τη βοήθειά του στην κατασκευή μέρους της πειραματικής διάταξης

Επίσης, ευχαριστώ τους Δρ. Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Γ΄ Βαθμίδας και Δρ. Σωτήριο Κακαμπάκο, Ερευνητή Α΄ Βαθμίδας από το Ινστιτούτο Ραδιενεργών και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων για τη βοήθειά τους τόσο στο πειραματικό σκέλος.

Τέλος δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου καθώς δε θα κατάφερα τίποτα, χωρίς τη δική τους συνεχή υλική και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των πολυετών σπουδών μου. Χάρης στις θυσίες τους κατάφερα να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου, τις εμπειρίες μου κι έτσι να γίνω καλύτερος άνθρωπος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
SUMMARY	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	10
2.1 Βιοαισθητήρες	10
2.2 Σήματα	12
2.2.1 Σήματα και Συστήματα Διακριτού Χρόνου	12
2.2.2 Επεξεργασία Σήματος	13
2.2.2.1 Αναλογική Επεξεργασία Σήματος	14
2.2.2.2 Ψηφιακή Επεξεργασία Σήματος	14
2.2.3 Βιοχημικά Σήματα	14
2.2.4 Βιοοπτικά Σήματα	15
2.4 Ακινητοποίηση Βιομορίων σε Επιφάνειες	15
2.4.1 Μέθοδοι προσρόφησης πρωτεϊνικών μορίων στα πλαστικά	17
2.4.2. Μέθοδοι ομοιοπολικής σύνδεσης μορίων στα πλαστικά	19
2.4.3. Μέθοδοι έμμεσης πρόσδεσης μορίων σε πλαστικά	20
2.5 Προσδιορισμός Ποσοτήτων Χωρίς Επισήμανση	21
2.6 Μετασχηματισμός Fourier	21
2.7 Μέθοδος Πινάκων (Matrix Method)	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	28
3.1 Λιθογραφία	28
3.2 Ευθυγράμμιση	30
3.3 Εγχάραξη	33
3.4 Εγχάραξη Piranha (Piranha Etch)	34

3.4.1 Χημική σύνθεση και τρόπος υλοποίησης της εγχάραξης <i>Piranha</i>	34
3.5 Διαδικασίες Εναπόθεσης Λεπτών Υμενίων	34
3.5.1 Θερμικές Διαδικασίες	35
3.5.2 Οξείδωση	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	38
4.1 Βιολογικά Αντιδραστήρια	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	40
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	
5.1 Προετοιμασία Πρωτεϊνών	40
5.1.1 Υλικά	40
5.1.2 Διαλύματα	41
5.1.3 Παρασκευή συζεύγματος βοείου οραλβουμίνης με βιοτίνη	41
5.2 Κατασκευή του ρευστομηχανικού καναλιού	41
5.3 Προετοιμασία δισκίων Si σε στάδια	43
5.3.1 Ανάπτυξη του στρώματος SiO_2	43
5.3.2 Επίστρωση	44
5.4 Πειραματική Διάταξη	47
5.5 Πειραματική Πορεία	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	50
6.1 Αποτελέσματα	50
6.2 Συζήτηση - Συμπεράσματα – Μελλοντικοί στόχοι	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζουμε μια μέθοδο για σύνδεση μεταξύ πρωτεϊνών, χωρίς επισήμανση, με βάση την πρωτεϊνικά προκληθείσα αντίθεση της εικόνας, ενός διαμορφωμένου υποστρώματος πυριτίου, που λαμβάνεται από μικροσκόπιο. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε επιφάνεια διοξειδίου του πυριτίου, πάχους 100nm, επικαλυμμένη με πολυμερικό υμένιο. Χρησιμοποιείται αντλία για την παροχή των αντιδραστηρίων με ελεγχόμενο ρυθμό σε μικρορευστομηχανικά κανάλια. Λαμβάνονται φωτογραφίες της επιφάνειας καθ' όλη τη διάρκεια και σε μικρά χρονικά διαστήματα, της τάξης των τεσσάρων δευτερολέπτων, με σκοπό να έχουμε καταγραφή της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Ο συντελεστής ανάκλασης του συστήματος διάλυμα-πρωτεΐνη-οξείδιο-πυρίτιο, λειτουργεί ως αποτέλεσμα του συνδυασμένου πάχους του οξειδίου και της πρωτεΐνης. Η παράγωγος του συντελεστή ανάκλασης αναφορικά με το πάχος της πρωτεΐνης, εξαρτάται από το εύρος του μήκους κύματος και το πάχος του οξειδίου. Αυτές οι παράμετροι, επιλέγονται με σκοπό τη μεγιστοποίηση του παραγόμενου μεγέθους της ανάκλασης, στις περιοχές του οξειδίου. Αντίθετα, στα σημεία που υπήρχε μόνο πυρίτιο, μετά την αφαίρεση του οξειδίου, ο συντελεστής ανάκλασης έχει τη μέγιστη τιμή του και μεταβάλλεται ελάχιστα με την σύνδεση. Οι οξειδωμένες περιοχές αυξάνουν το συντελεστή ανάκλασης τους με την πρόσδεση της στρεπταβιδίνης και πλησιάζει την ανακλαστικότητα των γυμνών περιοχών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η αντίθεση στις περιοδικές δομές με τη μορφή σκακιέρας, να πέφτει κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το μέγεθος της πτώσης είναι συνέπεια της διαδικασίας της βιομοριακής αντίδρασης.

SUMMARY

A method is presented for label-free protein-protein binding based on the protein induced contrast modulation of the microscope image of a patterned silicon substrate. The substrate was oxidized so that a 100 nm SiO₂ was grown on top. The oxide layer was patterned through photolithography and etching of the oxide in buffered HF solution, so that a chessboard pattern was created. Then, the wafer was placed in a fluidic structure consisting of two Al plates, a PDMS gasket, and plastic tubing. The top Al plate had a quartz window so that the silicon pattern could be monitored on real time while biomolecular solutions were pumped through the fluidic channels. The monitoring was performed by placing the Al plates on the microscope chuck, focusing through the quartz window on the silicon patterned surface and by filtering the microscope light in the blue (426-475nm). Before the fluidic structure application, the wafer was silanized with APTES and coated with biotinylated Bovine Serum Albumin. Then it was dried, inserted in the fluidic structure and placed under the microscope while a micropump was supplying streptavidin solutions. The reflection coefficient of the solution-protein-oxide-silicon stack is a function of the oxide-protein combined thickness. The derivative of the reflection coefficient with respect to the protein thickness depends on the wavelength range employed and the oxide thickness. These parameters are chosen to maximize the derivative magnitude on the oxide areas. On the contrary, on the bare silicon spots where the oxide was removed, the reflection coefficient is at its maximum value and barely changes upon binding. For the parameters employed here, the oxidized areas increase their reflection coefficient upon streptavidin binding and approach the reflectivity of the bare areas. As a consequence, the contrast of the chessboard pattern drops during the experiment and the magnitude of the drop is a measure of the progress of the biomolecular reaction.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι παρέχει άμεσα πληροφορία σχετικά με την κινητική εξίσωση της ταχύτητας με την οποία τα βιομόρια αλληλεπιδρούν και τις σταθερές ισορροπίας. Αρκετές οπτικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για την ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως η ελλειψομετρία, η RIFS, οι κυματοδηγοί τύπου Mach-Zehnder ή Grating Coupler, η τεχνολογία SPR και οπτοηλεκτρονικοί αισθητήρες. Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται μια μεθοδολογία που βασίζεται σε επεξεργασία σήματος που λαμβάνεται από φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ενδείκνυται για την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο, των βιομοριακών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε στερεά υποστρώματα. [1]

Η συμβατική θεώρηση του οπτικού μικροσκοπίου σαν ένα όργανο για τη μελέτη στερεωμένων δειγμάτων ιστού έχει μετασηματιστεί τα τελευταία χρόνια. Σήμερα, το μικροσκόπιο, μπορεί να θεωρηθεί δίκαια ως ένα δυναμικό όργανο για τις μελέτες της βιολογικής δραστηριότητας σε πραγματικό χρόνο. Η ικανότητα σύνδεσης γρήγορων φωτογραφικών μηχανών και της τεχνολογίας των υπολογιστών στα συμβατικά μικροσκόπια έκανε δυνατές όχι μόνο τις ποιοτικές παρατηρήσεις αλλά και την εξαγωγή ποσοτικών δεδομένων από διάφορα οργανικά συστήματα, όπως κυτταρικές καλλιέργειες, μεμονωμένα κύτταρα, πρωτεΐνες κ.α.. Οι ταχύτητες που επιτυγχάνονται μας δίνουν τη δυνατότητα να παρακολουθούμε τα συστήματα αυτά στενά και καθ' όλη τη διάρκεια με πολλές εκατοντάδες «καρέ».

Διάφορες ανακαλύψεις έδωσαν στους επιστήμονες τη δυνατότητα να αυξήσουν την ικανότητα παρατήρησης και καταγραφής και να εφαρμόσουν τις τεχνικές αυτές σε προβλήματα τα οποία παλαιότερα θεωρούνταν δυσεπίλυτα. Η επεξεργασία εικόνων μικροσκοπίου από τον υπολογιστή, προσφέρει στην κυτταροπαθολογία και την ιστοπαθολογία δυνατότητα ποσοτικοποίησης και αντικειμενοποίησης, στη λήψη αποφάσεων.

Η εισαγωγή στις ποσοτικές διαδικασίες αρχίζει να έχει μια πιο ευρεία επίδραση, οδηγώντας στην εξερεύνηση των διαδικασιών, οι οποίες υπόκεινται σε υποκειμενική ανθρώπινη κρίση για διαγνωστικούς σκοπούς. Οι αντλούμενες ποσοτικές πληροφορίες αναλύονται με τη βοήθεια πολυμεταβλητών στατιστικών μεθόδων. Μπορούν έτσι να

εντοπιστούν μικρές αλλαγές στα χαρακτηριστικά πολυμεταβλητών στατιστικών κατανομών σε οργανικά συστήματα, ενώ με την οπτική παρατήρηση, αυτό δε μπορεί να επιτευχθεί.

Οι ήδη υπάρχουσες μεθοδολογίες, σταδιακά δίνουν τη θέση τους στις νέες τεχνικές που παρέχει η ανάλυση και επεξεργασία εικόνας με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών. Οι τελευταίες συνδυάζουν αντικειμενικότητα και ακριβή προσδιορισμό ποσοτικών μεγεθών της εικόνας, που δεν είναι δυνατό να καταγραφούν με τη χρήση μόνο οπτικού μικροσκοπίου. [2]

Τα σήματα χρησιμοποιούνται για την επικοινωνία τόσο μεταξύ των ανθρώπων όσο και μεταξύ ανθρώπων και μηχανών. Η χρήση των σημάτων γίνεται κυρίως για τη διερεύνηση του υπό μελέτη συστήματος με σκοπό να αποκαλυφθούν λεπτομέρειες της δομής και της κατάστασης του που δε μπορούν να παρατηρηθούν εύκολα με άλλο τρόπο. Επίσης χρησιμοποιούνται στον έλεγχο και την ανάλυση της ενέργειας και του πληροφοριακού περιεχομένου σημάτων. Η ανάλυση σήματος αποτελείται από την παρουσίαση, το μετασχηματισμό και τη χρησιμοποίηση των σημάτων και των πληροφοριών που περιέχουν. Για παράδειγμα, μπορούμε να διαχωρίσουμε δύο ή και περισσότερα σήματα, τα οποία με κάποιο τρόπο έχουν συνδυαστεί, ή να ενισχύσουμε κάποια μέρη ή παραμέτρους ενός σήματος. Για πολλές δεκαετίες η ανάλυση σήματος έπαιξε σημαντικό ρόλο σε ποικίλα πεδία, όπως η επικοινωνία μέσω ομιλίας και δεδομένων, στη βιοϊατρική τεχνολογία, σε εφαρμογές της ηχοακουστικής, στην τεχνολογία των sonar και των radars, στη σεισμολογία, στην ανίχνευση πετρελαίου, στην οργανολογία, στις ηλεκτρονικές συσκευές οικιακής χρήσης, στη ρομποτική και σε πολλά άλλα.

Περίπλοκοι αλγόριθμοι ανάλυσης σημάτων υλοποιημένοι σε ειδικούς μικροεπεξεργαστές χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος συστημάτων, από πολύ εξειδικευμένα στρατιωτικά συστήματα μέχρι βιομηχανικές εφαρμογές μείωσης κόστους. Αν και παίρνουμε ως δεδομένη την απόδοση των συστημάτων διασκέδασης που μπορεί να έχουμε στα σπίτια μας, όπως η τηλεόραση και τα στερεοφωνικά συγκροτήματα, η βελτιστοποιημένη λειτουργία αυτών των συσκευών επαφίεται στην καλύτερη ανάλυση σημάτων που έχει έως τώρα επιτευχθεί. [3]

Ο τομέας της ανάλυσης σημάτων υποβοηθούνταν πάντα από το πάντρεμα της θεωρίας, των εφαρμογών και των τεχνολογιών που εφαρμόζονταν στα συστήματα ανάλυσης σήματος. Πριν τη δεκαετία του 1960 ήταν άμεσα εξαρτώμενη από την εξέλιξη της τεχνολογίας. Η ραγδαία εξέλιξη της ψηφιακής τεχνολογίας στους υπολογιστές και στους μικροεπεξεργαστές, παράλληλα με σημαντικά θεωρητικά επιτεύγματα έδωσε ώθηση στον

τομέα της επεξεργασίας σημάτων. Ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό της ψηφιακής επεξεργασίας σήματος είναι ότι βασίζεται στην ανάλυση ακολουθιών και δειγμάτων. Τα σήματα απεικονίζονται ως ακολουθίες αριθμών πεπερασμένης ακρίβειας και η ανάλυση γίνεται μέσω ψηφιακού υπολογισμού. Ο συνήθης τρόπος ανάλυσης σήματος περιλαμβάνει επεξεργασία ενός σήματος με σκοπό τη λήψη ενός άλλου. Μια ακόμα σημαντική κατηγορία προβλημάτων κατά την επεξεργασία σήματος είναι η κατανόηση του περιεχομένου του. Σε αυτή την περίπτωση το αντικείμενο δεν είναι η λήψη ενός σήματος αλλά ο χαρακτηρισμός του σήματος το οποίο εισάγουμε. Η πολυπλοκότητα των συστημάτων που σχεδιάζονται για την έκφραση της επεξεργασίας των σημάτων επηρεάζεται άμεσα από το συνδυασμό θεμελιωδών αρχών της ανάλυσης σημάτων που βασίζονται σε θεωρήματα και μαθηματικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, ένα περιβάλλον επεξεργασίας σημάτων ενσωματώνει την ιδιότητα όπου ένα πολύπλοκο σήμα στο πεδίο του χρόνου μπορεί να αναλυθεί σε επιμέρους απλούστερα σήματα στο πεδίο της συχνότητας, με τη βοήθεια αλγορίθμων διακριτού μετασχηματισμού Fourier (DFT) ή γρήγορου μετασχηματισμού Fourier (FFT). Τα προβλήματα της επεξεργασίας σημάτων προφανώς δεν περιορίζονται μόνο στα μονοδιάστατα συστήματα αλλά και στα πολυδιάστατα. [5][6]

Η επεξεργασία σήματος περιλαμβάνει πολλούς τομείς. Ένας από αυτούς και μάλιστα, ένα από τα αντικείμενα μελέτης της συγκεκριμένης εργασίας, είναι η *ανάλυση εικόνων*. Η ανάλυση εικόνας είναι οποιαδήποτε μορφή επεξεργασίας σήματος για την οποία τα δεδομένα που εισάγουμε είναι μια εικόνα, όπως φωτογραφίες ή καρτέ από οπτικοακουστικό μέσο (video). Τα εξερχόμενα δεδομένα από μια τέτοια επεξεργασία μπορούν να είναι είτε μια άλλη εικόνα είτε ένα σύνολο από χαρακτηριστικά και παραμέτρους σχετιζόμενα με την εικόνα. Οι περισσότερες τεχνικές επεξεργασίας εικόνων περιλαμβάνουν μετατροπή τους σε σήματα δύο διαστάσεων και εφαρμογή γνωστών τεχνικών επεξεργασίας σήματος. Συνήθως, όταν μιλάμε για επεξεργασία εικόνων αναφερόμαστε σε ψηφιακή επεξεργασία εικόνων, χωρίς αυτό να αποκλείει οπτική και αναλογική επεξεργασία. [6] Στη βιολογία και τη βιοχημεία, η επεξεργασία σήματος έχει πολλές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα στην ανοσοανάλυση στην οποία με τη βοήθεια φθορίζουσών ουσιών καθορίζονται η παρουσία και η θέση αντιγόνων και αντισωμάτων. Λαμβάνονται φωτογραφίες των περιοχών αυτών και στη συνέχεια με την επεξεργασία τους βγαίνουν πολύτιμα συμπεράσματα. Ουσιαστικά η χρήση της επεξεργασίας των εικόνων αυτών γίνεται σε εκείνες τις φωτογραφίες που με γυμνό μάτι ή ακόμα και με μικροσκόπιο δε μπορεί να ανιχνευτεί σήμα (ανάκλαση) από τις φθορίζουσες ουσίες. Έτσι με τη χρήση των υπολογιστών γίνεται αυτός ο καθορισμός της παρουσίας και της θέσης πρωτεϊνών, αντιγόνων, αντισωμάτων και άλλων βιοχημικών μορίων. Ωστόσο, αυτή τη φορά θα μελετήσουμε ένα σύστημα πρωτεϊνών χωρίς τη βοήθεια τέτοιων ιχνηθετών, κάτι το οποίο κάνει την επεξεργασία των εικόνων ακόμα πιο αναγκαία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Βιοαισθητήρες

Ένας βιοαισθητήρας ορίζεται ως μία ανεξάρτητη ολοκληρωμένη συσκευή η οποία είναι ικανή να παρέχει συγκεκριμένη ποσοτική ή ημι-ποσοτική αναλυτική πληροφορία χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοχημικός υποδοχέας) το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα στοιχείο μετατροπέα (IUPAC, 1999). Με άλλα λόγια είναι μια αναλυτική συσκευή, ευαίσθητη σε ένα φυσικό ή χημικό ερέθισμα, η οποία μετατρέπει μια βιολογική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα μεταδίδοντας πληροφορίες για μια ζωτική διαδικασία [1]. Ο όρος χρησιμοποιείται συχνά και για συσκευές ανίχνευσης που προσδιορίζουν τη συγκέντρωση ουσιών και άλλες παραμέτρους βιολογικού ενδιαφέροντος χωρίς άμεση χρήση βιολογικών συστημάτων, π.χ. στη βιομηχανία τροφίμων.

Ένας λειτουργικός βιοαισθητήρας πρέπει να έχει την πλειοψηφία των παρακάτω ιδιοτήτων:

- 1) ευαισθησία και δυνατότητα διαχωρισμού
- 2) επιλεκτικότητα και επαναληπτική ικανότητα
- 3) ταχύτητα απόκρισης
- 4) αξιοπιστία και ικανότητα αυτοελέγχου
- 5) δυναμικό εύρος
- 6) να μην επηρεάζεται από ηλεκτρικές ή περιβαλλοντικές παρεμβάσεις
- 7) να έχει συνάφεια το σήμα εξόδου με το περιβάλλον της μέτρησης
- 8) διάρκεια ζωής και δυνατότητα επισκευής και επαναχρησιμοποίησης
- 9) οικονομική τιμή

Η ταξινόμηση γίνεται βάσει της αισθητήριας αρχής με την οποία ανιχνεύεται η μετρήσιμη ποσότητα και περιλαμβάνει τους εξής τύπους βιοαισθητήρων [2,6]:

1.Αγωγιμομετρικοί: Ανιχνεύουν αλλαγές στην αγωγιμότητα μεταξύ δύο ηλεκτροδίων όπως για παράδειγμα τα “Nanowires Si”. Όποιο βιολογικό μόριο το οποίο είναι φορτισμένο ή πολωμένο προσδεθεί στο ‘νανοκαλώδιο πυριτίου’ θα αλλάξει την αγωγιμότητά του.

2.Ποτενσιομετρικοί

3.Χωρητικοί: Χρησιμοποιούνται όταν η αντίδραση της βιοαναγνώρισης μπορεί να προκαλέσει μια αλλαγή στη διηλεκτρική σταθερά του μέσου.

4.Αμπερομετρικοί: Ανιχνεύουν αλλαγές στο ρεύμα.

5.Θερμιδομετρικοί: Μετράνε τη θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται όταν τα μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους

6. Ακουστικοί-Συντονισμού: Παρακολουθούν την αλλαγή στη συχνότητα συντονισμού και την αντίσταση όταν τα βιομόρια αλληλεπιδρούν.

7. Οπτικοί: Συσχετίζουν αλλαγές στη συγκέντρωση του μορίου προς ανίχνευση με κάποια αλλαγή στις ιδιότητες του φωτός.

8. Φθορισμού: Οι αισθητήρες φθορισμού χρησιμοποιούν ιχνηθέτες για την ανίχνευση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων. Ένας ιχνηθέτης μπορεί να είναι ραδιοϊσότοπο, ένζυμο, φθορίζουσα ουσία, ουσία χημειοφωταύγειας, μέταλλο. Πλεονεκτούν στο ότι έχουν πιο αναπτυγμένη τεχνολογία και πετυχαίνουν μεγαλύτερες ευαισθησίες σε σχέση με τις άμεσες μελέτες. Μειονεκτούν όμως στο γεγονός ότι οι φθορίζουσες ουσίες, μπορεί να επηρεάσουν τον τρόπο με τον οποίο οι πρωτεΐνες προσδένονται σε άλλα μόρια (δραστικότητα).

Ανάλογα με την προς μελέτη αντίδραση οι βιοαισθητήρες κατατάσσονται σε βιοκαταλυτικούς, στους οποίους ο υποδοχέας μπορεί να είναι ένζυμο, κύτταρο ή ιστός και σε βιοσυγγενικούς, όπου ο υποδοχέας μπορεί να είναι DNA, RNA ή αντίσωμα.

Ένας βιοαισθητήρας αποτελείται από τον υποδοχέα, δηλαδή το βιολογικό υλικό που ακινητοποιείται στην επιφάνεια του αισθητήρα και αντιδρά με τον αναλύτη, ο οποίος είναι κάποιο άλλο μόριο που προστίθεται στο διάλυμα, το μεταγωγέα, ο οποίος μετρά τη φυσικοχημική μεταβολή και μπορεί να είναι ακουστικός, οπτικός ή ηλεκτροχημικός και από το ηλεκτρικό τμήμα, το οποίο λαμβάνει το σήμα από το μεταγωγέα, το καταγράφει και το εκφράζει υπό μορφή μετρήσεων.

Επίσης ένα βιοαισθητήρας διαθέτει τα εξής εξαρτήματα:

1. Βιοκαταλύτης
2. Μετατροπέας
3. Ενισχυτής
4. Επεξεργαστής
5. Έξοδος-οθόνη

Οι ανοσοαισθητήρες μελετούν τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μεταξύ αντισώματος και αντιγόνου. Οι βιοσυγγενικοί αισθητήρες που χρησιμοποιούν αντισώματα ή αντιγόνα, ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης, ονομάζονται ανοσοαισθητήρες. Οι ανοσοαισθητήρες βασίζονται στις ίδιες αρχές με τους κλασσικούς ανοσοπροσδιορισμούς στερεάς φάσης και ως εκ τούτου η ευαισθησία τους και η εξειδίκευσή τους εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα και τη διακριτική ικανότητα του εφαρμοζόμενου συστήματος ανίχνευσης. Ωστόσο, λόγω της ικανότητας του στερεού φορέα να δρα ως μετατροπέας σήματος, οι ανοσοαισθητήρες παρέχουν μειωμένο χρόνο ανάλυσης και κόστος, όπως και αυξημένες

δυνατότητες σμίκρυνσης, κατασκευής φορητών διατάξεων για αναλύσεις πεδίου, μετρήσεων σε πραγματικό χρόνο, προσδιορισμών χωρίς τη χρήση ιχνηθετών και ταυτόχρονων προσδιορισμών μίγματος αναλυτών.[17] Οι ανοσοαισθητήρες μελετούν τη συγκεκριμένη αλληλεπίδραση μεταξύ αντισώματος και αντιγόνου. Οι τεχνικές των ανοσοδοκιμασιών πλεονεκτούν στο ότι είναι απλές, εξαιρετικά ευαίσθητες και οικονομικές στην κατανάλωση αντιδραστηρίων. Επίσης, οι ανοσοπροσδιορισμοί χαρακτηρίζονται από μεγάλη επιλεκτικότητα, όσον αφορά στην αντίδραση μεταξύ των συμπληρωματικών βιομορίων και γρήγορα αποτελέσματα.[18]

2.2 Σήματα

2.2.1 Σήματα και Συστήματα Διακριτού Χρόνου

Ένα σήμα μπορεί να οριστεί ως μια συνάρτηση που μεταφέρει πληροφορίες, γενικά για την κατάσταση ή τη συμπεριφορά ενός φυσικού συστήματος. Τα σήματα αναπαρίστανται μαθηματικά σαν συναρτήσεις μιας ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών. Για παράδειγμα, ένα σήμα ομιλίας αναπαρίσταται μαθηματικά σαν συνάρτηση του χρόνου και της έντασης και μια φωτογραφική εικόνα σα συνάρτηση της φωτεινότητας δυο χωρικών μεταβλητών. Αποτελεί κοινή σύμβαση να αναφερόμαστε στην ανεξάρτητη μεταβλητή της μαθηματικής αναπαράστασης ενός σήματος ως χρόνο, αν και σε συγκεκριμένα παραδείγματα αυτή η μεταβλητή μπορεί να μην απεικονίζει στην πραγματικότητα χρόνο.

Η μεταβλητή αυτή μπορεί να είναι είτε συνεχής είτε διακριτή. Τα σήματα *συνεχούς χρόνου* καθορίζονται από μια συνέχεια και απεικονίζονται από μια συνεχή ανεξάρτητη μεταβλητή. Τα σήματα *συνεχούς χρόνου* συχνά αναφέρονται και ως *αναλογικά σήματα*. Τα σήματα *διακριτού χρόνου* καθορίζονται από διακριτούς χρόνους κι έτσι η ανεξάρτητη μεταβλητή παίρνει διακριτές τιμές. Για παράδειγμα αυτού του είδους τα σήματα απεικονίζονται και ως ακολουθίες αριθμών. Σήματα όπως αυτά της ομιλίας ή εικόνων μπορεί να έχουν είτε συνεχή, είτε διακριτή τιμή μεταβλητής και αν επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες αυτές οι απεικονίσεις είναι εξολοκλήρου ισοδύναμες. Εκτός των ανεξάρτητων μεταβλητών, το εύρος του σήματος μπορεί να είναι συνεχές ή διακριτό. *Ψηφιακά σήματα* είναι εκείνα για τα οποία και ο χρόνος και το εύρος είναι διακριτά. [6]

2.2.2 Επεξεργασία Σήματος

Ως *επεξεργασία σήματος*, ορίζουμε την ανάλυση, την ερμηνεία και επεξεργασία των σημάτων. Κατηγορίες σημάτων που έχουν ενδιαφέρον για επεξεργασία είναι ο ήχος, οι

εικόνες, τα βιολογικά σήματα όπως το ηλεκτροκαρδιογράφημα, τα σήματα των radar και πολλά άλλα. Η ανάλυση αυτών των σημάτων περιλαμβάνει φιλτράρισμα, αποθήκευση και ανακατασκευή, διαχωρισμό της πληροφορίας από το θόρυβο (για παράδειγμα, αναγνώριση αεροσκαφών από radar), συμπίεση (για παράδειγμα, συμπίεση εικόνας) και εξαγωγή (για παράδειγμα, μετατροπή λόγου σε κείμενο).[11]

Με τον όρο *θόρυβος* εννοούμε ανεπιθύμητο ήχο ή ηχορύπανση. Στην ηλεκτρονική με τον όρο αυτό, αναφερόμαστε στο ηλεκτρικό σήμα που αφορά τον ακουστικό ήχο (σε ένα ακουστικό σύστημα), ή στο ηλεκτρικό σήμα που αφορά τον οπτικό θόρυβο ευρέως γνωστό ως «χιόνι» στις εικόνες της τηλεόρασης. Στην πληροφορική και την ανάλυση σήματος, με τον όρο θόρυβος, χαρακτηρίζουμε δεδομένα άνευ σημασίας. Τέτοια είναι δεδομένα που δε χρησιμοποιούνται για τη μετάδοση κάποιου σήματος, αλλά προκύπτουν ως ανεπιθύμητο παραπροϊόν από άλλες ενέργειες. Στη Θεωρία της Πληροφορίας βέβαια, ο θόρυβος εξακολουθεί να θεωρείται πληροφορία. Υπό μια ευρεία έννοια, θόρυβο μπορούμε να χαρακτηρίσουμε και τις διαφημίσεις στις ιστοσελίδες, μιας και αποτελούν «άχρηστο» υλικό συγκριτικά με την πληροφορία που θέλουμε να πάρουμε από τους διαδικτυακούς αυτούς τόπους. Ο θόρυβος μπορεί να εμποδίσει, παραμορφώσει, ή ακόμα και να αλλάξει τη σημασία ενός μηνύματος τόσο στην ανθρώπινη, όσο και στην ηλεκτρονική επικοινωνία. [3]

Τα σήματα είναι ηλεκτρικές αναπαραστάσεις χρονικά ή χωρικά εξαρτώμενων ποσοτήτων, είτε αναλογικά είτε ψηφιακά και μπορεί να προέρχονται από ποικίλες πηγές. Στο πλαίσιο της ανάλυσης σημάτων, αυθαίρετες δυαδικές ακολουθίες δεδομένων δε θεωρούνται σήματα, αλλά ψηφιακά σήματα που αποτελούν αναπαραστάσεις αναλογικών φυσικών ποσοτήτων.

2.2.2.1 Αναλογική Επεξεργασία Σήματος

Αναλογική επεξεργασία σήματος είναι οποιαδήποτε επεξεργασία σήματος κατευθύνεται από αναλογικά σήματα με αναλογικά μέσα. Ο όρος *αναλογικός* δηλώνει κάτι το οποίο αναπαρίσταται μαθηματικά σε σύνολο συνεχών μεταβλητών. Αυτό διαφέρει από το *ψηφιακό* που χρησιμοποιεί σειρές από διακριτές ποσότητες για να απεικονίσει ένα σήμα. Οι αναλογικές τιμές συνήθως παρουσιάζονται σαν ένταση, ηλεκτρικό ρεύμα, ή ηλεκτρικό φορτίο γύρω από τα μέρη ηλεκτρικών συσκευών. Κάποιο σφάλμα ή θόρυβος που μπορεί να επηρεάσει τέτοιες φυσικές ποσότητες θα οδηγήσει σε ανάλογο σφάλμα στα σήματα που αυτές οι ποσότητες αντιπροσωπεύουν.[5]

Για τα αναλογικά σήματα, η ανάλυση σημάτων μπορεί να περιλαμβάνει την ενίσχυση και το φιλτράρισμα ακουστικών σημάτων για ακουστικό εξοπλισμό ή τη διαμόρφωση και την

αποδιαμόρφωση των σημάτων για τις τηλεπικοινωνίες. Παραδείγματα αναλογικής επεξεργασίας σήματος περιλαμβάνουν φίλτρα διασταυρώσεων στα μεγάφωνα, «μπάσο», «τρέμολο» και «ένταση» στα κουμπιά ελέγχου των στερεοφωνικών συγκροτημάτων και της τηλεόρασης. Πυκνωτές, αντιστάτες και transistors είναι κοινά αναλογικά στοιχεία επεξεργασίας. [5]

2.2.2.2 Ψηφιακή Επεξεργασία Σήματος

Ψηφιακή επεξεργασία σήματος (digital signal process, DSP) είναι η μελέτη των σημάτων σε ψηφιακή αναπαράσταση και τις διαδικασίες επεξεργασίας αυτών των σημάτων. Από τη στιγμή που ο στόχος της ψηφιακής ανάλυσης εικόνας είναι συνήθως η μέτρηση ή το φιλτράρισμα συνεχών πραγματικών αναλογικών σημάτων, το πρώτο βήμα είναι συνήθως η μετατροπή του σήματος από αναλογική σε ψηφιακή μορφή, χρησιμοποιώντας ένα μετατροπέα αναλογικού προς ψηφιακό. Συχνά, το απαιτούμενο σήμα εξόδου είναι κάποιο άλλο αναλογικό σήμα εξόδου, που χρειάζεται μετατροπέα ψηφιακού σε αναλογικό. [5]

2.2.3 Βιοχημικά Σήματα

Τα βιοχημικά σήματα περιέχουν πληροφορίες για τα επίπεδα και τις μεταβολές των διαφόρων χημικών ουσιών στο σώμα. Παραδείγματος χάριν, η συγκέντρωση των διαφόρων ιόντων, όπως το ασβέστιο και το κάλιο, στα κύτταρα μπορεί να μετρηθεί και να καταγραφεί, όπως μπορούν και οι αλλαγές στις μερικές πιέσεις του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα στο αναπνευστικό σύστημα ή το αίμα. Όλα αυτά αποτελούν βιοχημικά σήματα. Τα βιοχημικά σήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποικίλους λόγους, όπως ο καθορισμός των επιπέδων γλυκόζης, λακτάσης και μεταβολιτών και η παροχή πληροφοριών για τη λειτουργία των διαφόρων φυσιολογικών συστημάτων.

2.2.4 Βιοοπτικά Σήματα

Τα βιοοπτικά σήματα παράγονται από τις οπτικές ιδιότητες των βιολογικών συστημάτων. Τα βιοοπτικά σήματα μπορούν να εμφανιστούν φυσικά ή, σε μερικές περιπτώσεις, μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας μια βιοϊατρική τεχνική. Παραδείγματος χάριν, οι πληροφορίες για την υγεία ενός εμβρύου μπορούν να ληφθούν με τη μέτρηση των χαρακτηριστικών φθορισμού του αμνιακού υγρού. Η εκτίμηση της καρδιακής παροχής μπορεί να γίνει με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου διαλύσεων χρωστικών ουσιών που περιλαμβάνει τον έλεγχο της συγκέντρωσης μιας χρωστικής ουσίας όπως επανακυκλοφορεί μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

2.4 Ακίνητοποίηση Βιομορίων σε Επιφάνειες

Ακίνητοποίηση ονομάζεται η διαδικασία σύνδεσης ενός βιομορίου σε κάποιο αδιάλυτο υλικό-υπόστρωμα στήριξης, με τέτοιο τρόπο, ώστε να συνεχίσει να διατηρεί τις ιδιότητές του. Η σύνδεση πρωτεϊνικών μορίων και εν γένει βιομορίων σε επιφάνειες στερεών φορέων έχει βρει τα τελευταία χρόνια πολλαπλές εφαρμογές σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους, όπως η βιοϊατρική, η βιοχημεία, η ανοσοχημεία, η οργανική χημεία. Στη συνέχεια αναπτύσσεται διεξοδικά η εφαρμογή των ακίνητοποιημένων στην επιφάνεια στερεών φορέων βιομορίων στον τομέα της ανοσοχημείας.

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την ακίνητοποίηση βιολογικά ενεργών ουσιών (ενζύμων, αντιγόνων/αντισωμάτων, βακτηρίων, ιστών), βασίζονται σε φυσικές ή χημικές μεθόδους ή σε συνδυασμούς αυτών. Η κύρια φυσική μέθοδος είναι η προσρόφηση (adsorption) σε μη υδατοδιαλυτό φορέα. Οι πιο διαδεδομένες τεχνικές χημικής ακίνητοποίησης είναι η διαμοριακή σύνδεση (cross-linking) σύνδεση σε ενεργοποιημένο φορέα. Η διαμοριακή σύνδεση μέσω διλειτουργικών υποκαταστατών (bifunctional agents) συνδυάζεται συνήθως με προσρόφηση των πρωτεϊνικών μορίων [7]. Εκτός από την απευθείας πρόσδεση αντιγόνου ή αντισώματος στην επιφάνεια στερεών φορέων έχουν αναπτυχθεί διάφορες εναλλακτικές διαδικασίες ακίνητοποίησης, όπως για παράδειγμα η πρόσδεση του αντισώματος της ανάλυσης στον στερεό φορέα μέσω ακίνητοποιημένου δευτέρου αντισώματος, μέσω συστήματος αβιδίνης-βιοτίνης.

Σημαντικά πλεονεκτήματα των τεχνικών στερεάς φάσης αποτελούν η μείωση των αναλυτικών σταδίων, καθώς παραλείπεται το στάδιο της φυγοκέντρωσης που είναι απαραίτητο σε όλες τις τεχνικές διαχωρισμού, η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους για οποιοδήποτε ζεύγος αντιγόνου-αντισώματος, η πολύ χαμηλή μη ειδική δέσμευση που τις χαρακτηρίζει, οι αυξημένες δυνατότητες αυτοματοποίησης που προσφέρουν, η δυνατότητα ανάπτυξης νέων τύπων ανοσοχημικών προσδιορισμών. Κυριότερα μειονεκτήματα των τεχνικών στερεάς φάσης είναι ότι απαιτούν ικανές ποσότητες αντιδραστηρίων καθώς και το ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η πρόσδεση στη στερεά φάση επηρεάζει την ταχύτητα ή και την ικανότητα σύνδεσης μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων.

Τις περισσότερες εφαρμογές ως στερεά φάση στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς βρίσκουν διάφοροι πλαστικοί φορείς σε ποικίλες μορφές (σωλήνες, σφαιρίδια, φρεάτια μικροτιτλοδότησης, μικροσωματίδια, σωματίδια και φορείς πολυσακχαριτικής φύσεως, μεμβράνες κατασκευασμένες είτε από πλαστικά πολυμερή, είτε από πολυσακχαρίτες (π.χ.

κυτταρίνη) καθώς και γυάλινοι σωλήνες. Ειδική κατηγορία υλικών που χρησιμοποιούνται ως στερεοί φορείς για την ανάπτυξη ανοσοχημικών προσδιορισμών αποτελούν τα μαγνητικά σωματίδια τα οποία παρασκευάζονται με ενσωμάτωση παραμαγνητικού υλικού συνήθως κάποιων οξειδίων του σιδήρου σε σφαιρίδια ενός αδρανούς πολυμερούς υλικού. Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη του πεδίου των ανοσοαισθητήρων οι οποίοι συνδυάζουν την αρχή των ανοσοχημικών τεχνικών με τεχνικές ανίχνευσης που επιτρέπουν την παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος έχουν χρησιμοποιηθεί ως στερεοί φορείς οπτικές ίνες κατασκευασμένες από γυαλί ή πυρίτιο, καθώς και ψηφίδες πυρίτιου.

Οι στερεοί φορείς που χρησιμοποιούνται στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς το λόγο του όγκου αντίδρασης προς την επιφάνεια αντίδρασης, ο οποίος επηρεάζει τόσο την κινητική των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη διεπιφάνεια, όσο και το δυναμικό εύρος των ανοσοχημικών προσδιορισμών που τελικά αναπτύσσονται. Επειδή οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα μόνο σε μικρή απόσταση από την επιφάνεια του στερεού φορέα ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της ισορροπίας είναι πολύ μεγαλύτερος συγκριτικά με τις αντιδράσεις υγρής φάσης, ενώ η διάχυση των αντιδρώντων είναι ο καθοριστικός παράγοντας που ρυθμίζει την ταχύτητα των αντιδράσεων. Έτσι, οι μικροσωματιδιακοί φορείς που έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια σε σχέση με τους σωλήνες, τα μακροσφαιρίδια, πλεονεκτούν ως προς αυτούς, σε ότι έχει να κάνει με την ταχύτητα των προσδιορισμών. Οι μεμβράνες, τέλος, έχουν σε σύγκριση με άλλες μορφές στερεών φορέων, μεγαλύτερη επιφάνεια προσρόφησης και παρέχουν τη δυνατότητα συνεχούς ροής αντιδραστηρίων, ώστε η διάχυση να μην είναι πλέον ο ρυθμιστικός παράγοντας της ταχύτητας της ανοσοαντίδρασης.

Οι διάφοροι στερεοί φορείς που χρησιμοποιούνται στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς διαφέρουν επίσης ως προς τον τρόπο σύνδεσης των βιομορίων στην επιφάνειά τους. Η μέθοδος πρόσδεσης εξαρτάται από τον υδρόφιλο ή υδρόφοβο χαρακτήρα της επιφάνειας του στερεού φορέα και την παρουσία σε αυτήν δραστικών ομάδων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αντίδραση με δραστικές ομάδες του βιομορίου. Οι μακροσκοπικοί πλαστικοί φορείς (σωλήνες, σφαιρίδια) που παρασκευάζονται κυρίως από πολυστυρένιο, πολυπροπυλένιο, πολυβινυλοχλωρίδιο και πολυαιθλένιο δε φέρουν στην επιφάνεια τους δραστικές ομάδες, αλλά παρ' όλα αυτά, πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια τους με προσρόφηση. Είναι φυσικά δυνατή η επιφανειακή τροποποίηση αυτών των πολυμερών και η εισαγωγή δραστικών ομάδων, οι μέθοδοι όμως είναι συχνά χρονοβόροι και έχουν μειωμένη επαναληψιμότητα. Επιφανειακή τροποποίηση για την εισαγωγή δραστικών ομάδων είναι απαραίτητη και στην περίπτωση των γυάλινων

στερεών φορέων, οι οποίοι δεν προσροφούν βιομόρια στην επιφάνειά τους. Οι μικροσωματιδιακοί πλαστικοί φορείς μπορεί, ανάλογα με το πολυμερές από το οποίο έχουν παρασκευαστεί, να έχουν υδρόφοβη ή υδρόφιλη επιφάνεια και να φέρουν ή όχι στην επιφάνειά τους δραστικές ομάδες, οπότε η πρόσδεση βιομορίων πραγματοποιείται ανάλογα με τη φύση του υλικού, είτε με προσρόφηση, είτε με ομοιοπολική σύνδεση. Οι πολυσακχαρικοί μικροσωματιδιακοί φορείς, τέλος, διαφέρουν από τους πλαστικούς στερεούς φορείς, τόσο στη χημεία, όσο και στην απόδοση της επικάλυψης με μόρια. Η πρόσδεση μορίων στην επιφάνειά τους γίνεται αποκλειστικά με ομοιοπολικό τρόπο. [1]

2.4.1 Μέθοδοι προσρόφησης πρωτεϊνικών μορίων στα πλαστικά

Μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές ακινητοποίησης βιομορίων σε επιφάνεια είναι αυτή της προσρόφησης (adsorption). Η προσρόφηση των βιομορίων πάνω σε μη υδατοδιαλυτούς φορείς είναι η απλούστερη μέθοδος ακινητοποίησης. Η σύνδεση του βιομορίου με το μη υδατοδιαλυτό υλικό γίνεται μέσω ιοντικών, πολικών ή υδρόφοβων δεσμών ή δεσμών υδρογόνου ή μέσω π-ηλεκτρονιακών αλληλεπιδράσεων. Η σύνδεση των πρωτεϊνών στα πλαστικά με υδρόφοβη επιφάνεια επιτυγχάνεται κυρίως με μη ειδικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι δυνάμεις που συμμετέχουν στη δημιουργία αυτής της σύνδεσης είναι δευτερεύουσες δυνάμεις Van der Waals, οι οποίες αν και ασθενείς οδηγούν σε ισχυρή σύνδεση λόγω της μεγάλης τους έκτασης. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται κατά την επαφή υδατικού διαλύματος του βιομορίου με το προσροφητικό μέσο για κάποια χρονική περίοδο, μετά την πάροδο της οποίας η περίσσεια του βιομορίου απομακρύνεται από το διάλυμα. Διάφορα υλικά, όπως το διοξείδιο του τιτανίου, νάιλον μεμβράνες τροποποιημένες με τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα, πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), αλουμίνα, κατιονικές και ανιονικές ιονανταλλακτικές ρητίνες, κεραμικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ακινητοποίηση μεγάλου αριθμού βιομορίων.[9]

Το προσροφητικό υλικό πρέπει να έχει υψηλή προσροφητική χωρητικότητα, μεγάλη συγγένεια με το προσροφούμενο βιομόριο. Τέλος το βιομόριο πρέπει να προσροφάται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρεί το μεγαλύτερο ποσοστό της ενεργότητάς του. Τα προσροφούμενα βιομόρια διατηρούν πολύ ψηλό ποσοστό ή σχεδόν όλη την αρχική τους ενεργότητα ανάλογα με τη φύση των αναπτυσσόμενων δεσμών, οι οποίοι δεν προκαλούν καταστροφή των ενεργών κέντρων.

Η προσρόφηση πρωτεϊνών στην επιφάνεια ενός υλικού είναι μία αντιστρεπτή διαδικασία, γι αυτό οι συνθήκες παρασκευής και λειτουργίας (pH, ιοντική ισχύς,

θερμοκρασία, διαλύτης), πρέπει να διατηρούνται σταθερές. Αλλαγές των συνθηκών λειτουργίας μπορούν να προκαλέσουν την εκρόφιση του βιομορίου με αποτέλεσμα τη μείωση της ενζυμικής του δραστηριότητας. Η σύνδεση των πρωτεϊνών δεν επηρεάζεται γενικά από το είδος του ρυθμιστικού διαλύματος, οι μεταβλητές που κυρίως επηρεάζουν την προσρόφιση στη στερεά φάση είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος και η συγκέντρωση του διαλύματος επώασης. Το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί επίσης να περιέχει ουδέτερα άλατα όπως χλωριούχο νάτριο, δεν πρέπει όμως να περιέχει μη ιοντικά επιφανειοδραστικά όπως Triton X100 ή Tween 20, γιατί ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες για τις θέσεις δέσμευσης του πλαστικού. Ο απαιτούμενος χρόνος επώασης εξαρτάται τόσο από τη θερμοκρασία επώασης όσο και από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα επώασης. Οι πιο συνηθισμένες θερμοκρασίες επώασης είναι 4°C, θερμοκρασία δωματίου, ή 37°C. Όταν η επώαση γίνεται στους 4 °C ή σε θερμοκρασία δωματίου, ο χρόνος επώασης κυμαίνεται από 18 έως 24 ώρες. Αντίθετα, όταν η επώαση γίνει στους 37°C, ο απαιτούμενος χρόνος μειώνεται σε λίγες ώρες.

Κατά την προσρόφιση των πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια στερεών φορέων δεν ενδιαφέρει μόνο η ποσότητα της πρωτεΐνης που ακινητοποιείται αλλά και η λειτουργικότητά της. Κατά την προσρόφιση επέρχονται αλλαγές στην τριτοταγή διαμόρφωση των πρωτεϊνικών μορίων που έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγή στη λειτουργικότητάς τους. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση πρωτεϊνικών μορίων κατά την προσρόφισή τους στην επιφάνεια στερεών φορέων σχετίζονται με τη μετακίνηση υδρόφοβων τμημάτων της πρωτεΐνης που σε διάλυμα βρίσκονται στο εσωτερικό της προς την εξωτερική επιφάνεια, ώστε να ενισχυθεί η αλληλεπίδραση με την υδρόφοβη επιφάνεια του στερεού. Από μελέτες που έγιναν με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης, προκύπτει ότι τα προσροφημένα στην επιφάνεια πλαστικών φορέων αντισώματα σε συνθήκες κορεσμού σχηματίζουν συστάδες (clusters), τα οποία πιθανότατα αντιστοιχούν στο μικρό ποσοστό (περίπου 10%), των ακινητοποιημένων αντισωμάτων που διατηρούν τη δεσμευτική τους ικανότητα.

Γεγονός είναι ότι, παρά την εκτεταμένη καταστροφή των πρωτεϊνικών μορίων, κατά την προσρόφισή τους στην επιφάνεια πλαστικών φορέων η μέθοδος εξακολουθεί να εφαρμόζεται ευρέως, και ο λόγος είναι ότι η τεχνική της προσρόφισης είναι απλή στην εφαρμογή ης, το μικρό δε ποσοστό των δραστικών μορίων που παραμένει είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αρκετό για την εφαρμογή για την οποία προορίζεται. Τέλος η σταθερότητα των προσροφημένων πρωτεϊνών παρέχει τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των επικαλυμμένων με αντιγόνο ή αντίσωμα πλαστικών φορέων μετά από απομάκρυνση με κατάλληλη επεξεργασία των ανοσοπροσοφημένων μορίων. [8]

2.4.2. Μέθοδοι ομοιοπολικής σύνδεσης μορίων στα πλαστικά

Η ομοιοπολική σύνδεση βιομορίων στην επιφάνεια πλαστικών στερεών φορέων δεν είναι απαραίτητη αφού ο υδρόφοβος χαρακτήρας των πλαστικών φορέων επιτρέπει την εύκολη πρόσδεση των πρωτεϊνικών μορίων, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις πλεονεκτεί σε σχέση με την προσρόφηση ως προς τη σταθερότητα της σύνδεσης και τη διατήρηση της δραστηριότητας των προσροφημένων μορίων. Επίσης, η ομοιοπολική σύνδεση είναι απαραίτητη για τη σύνδεση ουσιών που δεν προσροφούνται ικανοποιητικά στα πλαστικά.

Για την ομοιοπολική σύνδεση μορίων σε πλαστικούς φορείς είναι αναγκαία η ύπαρξη δραστικών ομάδων στην επιφάνεια των πλαστικών με τις οποίες είναι δυνατή η σύζευξη με ομάδες του μορίου. Εκτός από τα πλαστικά υλικά που από κατασκευής φέρουν δραστικές ομάδες τα τελευταία χρόνια έχουν παρασκευαστεί προϊόντα στα οποία έχουν ενσωματωθεί δραστικές ομάδες, όπως αμινομάδες, αλδεϋδοδομάδες, καρβοξυλομάδες, και άλλες ομάδες [8]. Αν δεν υπάρχουν δραστικές ομάδες στην επιφάνεια του πλαστικού, αυτές μπορούν να εισαχθούν με διάφορες μεθόδους οι οποίες διαφέρουν, τόσο στην πολυπλοκότητα τους, όσο και στο μηχανισμό στον οποίο στηρίζονται. Πλαστικοί φορείς στην επιφάνεια των οποίων έχουν εισαχθεί ενεργές ομάδες (με ακτινοβολήση, ε χημικό τρόπο, με εμφύτευση ουσιών στο πλαστικό σε συνθήκες πλασματος ή με επικάλυψη του φορέα με πολυμερές που φέρει δραστικές ομάδες) έχουν χρησιμοποιηθεί για ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών, ανοσοσφαιρινών, πεπτιδίων, αντιγόνων ή βιοτίνης για εφαρμογή σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς.

Ο τρόπος με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί η ομοιοπολική πρόσδεση βιομορίων στην επιφάνεια των πλαστικών φορέων εξαρτάται από τις διαθέσιμες για αντίδραση ομάδες ανεξάρτητα από τον τρόπο που δημιουργήθηκαν οι ομάδες αυτές στο στερεό ή με το είδος του μορίου που ανήκουν.

Γενικά, με τις μεθόδους ομοιοπολικής σύνδεσης είναι δυνατή η σύνδεση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης από αυτήν που μπορεί να προσδεθεί στο στερεό με προσρόφηση, η αύξηση όμως αυτή δεν οδηγεί πάντα σε ανάλογη αύξηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου μορίου. Ως προς τις φυσικές μεθόδους ακινητοποίησης η μέθοδος υστερεί σε απλότητα, αφού οι αντιδράσεις ενεργοποίησης των υλικών στήριξης είναι χρονοβόρες και σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούν την χρήση ακριβών αντιδραστηρίων. [7]

2.4.3. Μέθοδοι έμμεσης πρόσδεσης μορίων σε πλαστικά

Η απευθείας πρόσδεση αντιγόνων ή αντισωμάτων στην επιφάνεια πλαστικών φορέων πολλές φορές οδηγεί είτε σε απώλεια της λειτουργικότητάς τους, είτε σε μη ικανοποιητική συγκέντρωση της ουσίας που μας ενδιαφέρει στην επιφάνεια του στερεού. Για τους λόγους αυτούς έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι έμμεσης ακινητοποίησης βιομορίων στην επιφάνεια στερεών φορέων, όπου η σύνδεση βιομορίου-στερεού πραγματοποιείται μέσω ενός μορίου-γέφυρας.

Το μόριο-γέφυρα μπορεί να είναι μία πρωτεΐνη με μεγάλη σταθερά συγγενείας για σύνδεση με τον πλαστικό φορέα. Το συνθέςτερα χρησιμοποιούμενο μόριο γέφυρα είναι η βόειος οραλβουμίνη (BSA). Μετά την πρόσδεση της BSA στην επιφάνεια του στερεού, η ουσία που ενδιαφέρει μπορεί να ακινητοποιηθεί με ομοιοπολική σύνδεση με τα μόρια της BSA [18].

Μια άλλη μέθοδος ακινητοποίησης εκμεταλλεύεται την υψηλή σταθερά σύνδεσης της βιοτίνης με τις πρωτεΐνες αβιδίνη και στρεπταβιδίνη [8]. Επειδή όμως η αβιδίνη και η στρεπταβιδίνη έχουν σχετικά χαμηλή σταθερά σύνδεσης με το πολυμερές η πρόσδεση στην επιφάνεια του στερεού μπορεί να επιτευχθεί μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης της αβιδίνης ή της στρεπταβιδίνης στο στερεό, χρήσης μίας βιοτινυλιωμένης πρωτεΐνης, π.χ. BSA που προσροφάται εύκολα στο στερεό, ή χρήση βιοτίνης ομοιοπολικά συνδεδεμένης στην επιφάνεια του στερεού. [9]

Η μέθοδος ακινητοποίησης μέσω του συστήματος αβιδίνης-βιοτίνης έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοστεί για οποιοδήποτε ζεύγος αντιγόνου-αντισώματος, ωστόσο στην πράξη η εφαρμογή της περιορίζεται λόγω του ότι: η πρόσδεση της αβιδίνης στην στερεά επιφάνεια συνοδεύεται από εκτεταμένη απώλεια της ικανότητας της να δεσμεύει τη βιοτίνη, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί μόνο για απομονωμένα αντισώματα και όχι για αντιορούς, η μέθοδος περιλαμβάνει ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της βιοτινιλίωσης του αντισώματος. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή εφαρμογή αυτής της μεθόδου πρόσδεσης είναι η προσρόφηση να μην επηρεάζει τη δραστηριότητα του μορίου-γέφυρα.[9]

Τέλος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ολόκληρα τα κύτταρα ως αντιδραστήρια στερεάς φάσης. Επειδή, όμως, η χρήση τους δημιουργεί προβλήματα υψηλής μη ειδικής δέσμευσης, η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη.

2.5 Προσδιορισμός Ποσοτήτων Χωρίς Επισήμανση

Ο προσδιορισμός ποσότητας χωρίς επισήμανση (label-free quantification), είναι μια μέθοδος φασματοσκοπίας μάζας που έχει σκοπό, τον προσδιορισμό της διαφορικής έκφρασης των πρωτεϊνών σε δύο ή περισσότερα βιολογικά δείγματα. Αντίθετα με άλλες μεθόδους για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών, δε χρησιμοποιεί σταθερά ισότοπα που περιλαμβάνουν σκευάσματα, τα οποία δένουν χημικά και κατά συνέπεια επισημαίνουν την πρωτεΐνη.

Ο προσδιορισμός χωρίς επισήμανση, βασίζεται στην πρόδρομη ένταση του σήματος, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις, εφαρμόζεται σε δεδομένα που παίρνουμε από φασματοσκόπους μάζας υψηλής ακρίβειας. Αυτή η δυνατότητα υψηλής ακρίβειας, διευκολύνει την εξαγωγή σημάτων πεπτιδίων από το φασματοσκόπο μάζας και κατ' αυτό τον τρόπο αποσυνδέει τον προσδιορισμό με τη διαδικασία ταυτοποίησης. Αυτό δεν ισχύει για μια άλλη μέθοδο προσδιορισμού χωρίς επισήμανση, τη μέτρηση φάσματος, που απλώς μετράει τον αριθμό των φασμάτων που αναγνωρίζονται για ένα δεδομένο πεπτίδιο σε διαφορετικά βιολογικά δείγματα και μετά ενώνει τα αποτελέσματα για όλα τα μετρημένα πεπτίδια της πρωτεΐνης ή των πρωτεϊνών που έχουν προσδιοριστεί

2.6 Μετασχηματισμός Fourier

Στα μαθηματικά, ο συνεχής μετασχηματισμός Fourier είναι μία από τις καθορισμένες συναρτήσεις της ανάλυσης Fourier. Έχει τη δυνατότητα της μετατροπής μιας συνάρτησης σε μια άλλη, κάτι το οποίο ονομάζεται απεικόνιση της περιοχής συχνότητας της αρχικής συνάρτησης (όπου η αρχική συνάρτηση είναι συχνά συνάρτηση του χρόνου). Σε αυτή τη συγκεκριμένη περίπτωση και τα δυο πεδία ορισμού είναι συνεχή και χωρίς όρια. Ο όρος μετασχηματισμός Fourier μπορεί να αναφέρεται είτε στην απεικόνιση της περιοχής της συχνότητας, είτε στη διαδικασία που «μετατρέπει» μια συνάρτηση σε μια άλλη. [4]

ΟΡΙΣΜΟΣ

Υπάρχουν διάφορες κοινές συνθήκες για τον ορισμό του μετασχηματισμού Fourier. Στις επικοινωνίες και την επεξεργασία εικόνων, για παράδειγμα, χρησιμοποιείται συνήθως η συνάρτηση:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-i2\pi ft} dt \quad (1), \text{ για κάθε πραγματικό αριθμό } f.$$

Όταν η ανεξάρτητη μεταβλητή t απεικονίζει το χρόνο (σε δευτερόλεπτα), η μεταβλητή f είναι η συνηθισμένη συχνότητα σε hertz. Αν X είναι η ανισότητα Hölder, τότε μπορεί να ξαναγραφεί με τη βοήθεια του X ως ο αντίστροφος μετασχηματισμός:

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} X(f) e^{i2\pi ft} df \quad (2), \text{ για κάθε πραγματικό αριθμό } t.$$

Άλλοι συμβολισμοί για το $X(f)$ είναι: $F\{x(t)\}$, $\hat{x}(f)$ και $F\{x\}(f)$.

Η ερμηνεία του $X(f)$ μπορεί να γίνει πιο εύκολα με τη βοήθεια των πολικών συντεταγμένων: $X(f) = A(f) e^{i\phi(f)}$ (3), όπου:

$$A(f) = |X(f)|, \text{ το πλάτος}$$

$$\phi(f) = \arg\{X(f)\}, \text{ η φάση}$$

Τότε ο αντίστροφος μετασχηματισμός μπορεί να γραφτεί ως:

$$x(t) = \int_{-\infty}^{\infty} A(f) e^{i(2\pi ft + \phi(f))} df \quad (4)$$

που είναι ένας συνδυασμός όλων των στοιχείων $x(t)$. Κάθε στοιχείο είναι μια σύνθετη ημιτονοειδής συνάρτηση της μορφής $e^{i2\pi ft}$ της οποίας το πλάτος είναι $A(f)$ και η αρχική της φάση (για $t = 0$) είναι $\phi(f)$.

Στα μαθηματικά, ο μετασχηματισμός Fourier συνήθως γράφεται με βάση τη γωνιακή συχνότητα: $\omega = 2\pi f$ της οποίας οι μονάδες είναι rad ανά δευτερόλεπτο.

Η αντικατάσταση $f = \frac{\omega}{2\pi}$ στους παραπάνω τύπους μας δίνει:

$$X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-i\omega t} dt \quad (5)$$

$$x(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} X(\omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (6)$$

που είναι επίσης ένας διμερής μετασχηματισμός Laplace υπολογισμένος στο $s = i\omega$.

Ο παράγοντας 2π μπορεί να χωριστεί εξίσου μεταξύ του κανονικού και του αντίστροφου μετασχηματισμού Fourier, κάτι το οποίο οδηγεί σε μία άλλη δημοφιλή έκφραση:

$$X(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-i\omega t} dt \quad (7)$$

$$x(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} X(\omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (8)$$

2.7 Μέθοδος Πινάκων (Matrix Method)

Για την εύρεση αναλυτικών εκφράσεων για τους συντελεστές ανάκλασης και διάδοσης σε ένα σύστημα πολλαπλών υμενίων απαιτείται μια σχετικά δύσκολη διαδικασία δεδομένων των δύσκολων και αρκετά πολύπλοκων τύπων που χρησιμοποιούνται. Ο υπολογισμός τέτοιων εκφράσεων γίνεται συνήθως σταδιακά , οπότε γενικά είναι πιο εύκολο να δίνονται εκφράσεις για την ανάκλαση R και τη διάδοση T σε διαδοχική μορφή από ενδιάμεσες εξισώσεις έτσι ώστε να υπολογίζονται απλούστερα. Η δυνατότητα εύρεσης αυτών των εκφράσεων δίνεται από τη μέθοδο των πινάκων (*matrix method*) αφού είναι αρκετά συνοπτική και εύχρηστη για τον αριθμητικό τους υπολογισμό. Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία εξαγωγής των κατάλληλων τύπων όπως προκύπτει από τον Heavens[5].

Η ανάλυση θα περιοριστεί για την περίπτωση όπου η δέσμη προσπίπτει κάθετα. Στις ακόλουθες σχέσεις χρησιμοποιούνται οι συντελεστές ανάκλασης και διάδοσης του Fresnel οι οποίοι συμβολίζονται αντίστοιχα με r και t . Στη γενική περίπτωση είναι μιγαδικοί και μπορούν να γραφτούν για ένα φίλμ m ως εξής:

$$r_m = g_m + ih_m$$

$$t_m = 1 + g_m + ih_m$$

Στη γενική περίπτωση όπου τα φίλμ $m-1$ και m έχουν απορρόφηση ο συντελεστής διάθλασης είναι επίσης μιγαδικός, άρα οι αντίστοιχοι συντελεστές διάθλασης θα είναι:

$$\mathbf{n}_{m-1} = n_{m-1} - ik_{m-1}$$

$$\mathbf{n}_m = n_m - ik_m$$

Συνεπώς για κάθετη πρόσπτωση θα ισχύει:

$$g_m = \frac{n_{m-1}^2 + k_{m-1}^2 - n_m^2 - k_m^2}{(n_{m-1} + n_m)^2 + (k_{m-1} + k_m)^2}$$

$$h_m = \frac{2(n_{m-1}k_m - n_mk_{m-1})}{(n_{m-1} + n_m)^2 + (k_{m-1} + k_m)^2}$$

Ο όρος που καθορίζει τη φάση στο $m-1$ film πάχους d_{m-1} εκφράζεται με τη σχέση:

$$\exp i\delta_{m-1} = \exp i \frac{2\pi}{\lambda} (n_{m-1} - ik_{m-1})d_{m-1} = \exp a_{m-1} \exp i\gamma_{m-1}$$

όπου $a_{m-1} = \exp i \frac{2\pi}{\lambda} k_{m-1}d_{m-1}$ και $\gamma_{m-1} = \exp i \frac{2\pi}{\lambda} n_{m-1}d_{m-1}$. Μπορούμε τώρα να ορίσουμε

τον πίνακα (C_m) για το υμένιο m του οποίου τα στοιχεία είναι μιγαδικά με τον παρακάτω τρόπο:

$$(C_m) = \begin{pmatrix} p_m + iq_m & r_m + is_m \\ t_m + iu_m & v_m + iw_m \end{pmatrix}$$

Η χρήση δεικτών με διψήφια νούμερα εξυπηρετεί στο συμβολισμό των στοιχείων για γινόμενα πινάκων. Τα στοιχεία του γινομένου $(C_1)(C_2)$ είναι:

$$(C_1)(C_2) = \begin{pmatrix} p_{12} + iq_{12} & r_{12} + is_{12} \\ t_{12} + iu_{12} & v_{12} + iw_{12} \end{pmatrix}$$

Ενώ τα αντίστοιχα για το γινόμενο $(C_1)(C_2)(C_3)$ είναι τα:

$$(C_1)(C_2)(C_3) = \begin{pmatrix} p_{13} + iq_{13} & r_{13} + is_{13} \\ t_{13} + iu_{13} & v_{13} + iw_{13} \end{pmatrix}$$

Ο κανόνας πολλαπλασιασμού πινάκων οδηγούν στις ακόλουθες αναδρομικές σχέσεις που επιτρέπουν τον υπολογισμό των στοιχείων του γινομένου $(C_1)(C_2)..(C_{n-1})$

$$p_{1,n+1} = p_{1n}p_{n+1} - q_{1n}q_{n+1} + r_{1n}t_{n+1} - s_{1n}u_{n+1}$$

$$q_{1,n+1} = q_{1n}p_{n+1} + p_{1n}q_{n+1} + s_{1n}t_{n+1} + r_{1n}u_{n+1}$$

$$r_{1,n+1} = p_{1n}r_{n+1} - q_{1n}s_{n+1} + r_{1n}v_{n+1} - s_{1n}w_{n+1}$$

$$s_{1,n+1} = q_{1n}r_{n+1} + p_{1n}s_{n+1} + s_{1n}v_{n+1} + r_{1n}w_{n+1}$$

$$t_{1,n+1} = t_{1n}r_{n+1} - u_{1n}q_{n+1} + v_{1n}t_{n+1} - w_{1n}u_{n+1}$$

$$u_{1,n+1} = u_{1n}p_{n+1} + t_{1n}q_{n+1} + w_{1n}t_{n+1} + v_{1n}u_{n+1}$$

$$v_{1,n+1} = t_{1n}r_{n+1} - u_{1n}s_{n+1} + v_{1n}v_{n+1} - w_{1n}w_{n+1}$$

$$w_{1,n+1} = u_{1n}r_{n+1} + t_{1n}s_{n+1} + w_{1n}v_{n+1} + v_{1n}w_{n+1}$$

Τα στοιχεία του πίνακα μπορούν να προκύψουν από τους συντελεστές Fresnel και τους τύπους της φάσης με την ακόλουθη αντιστοιχία

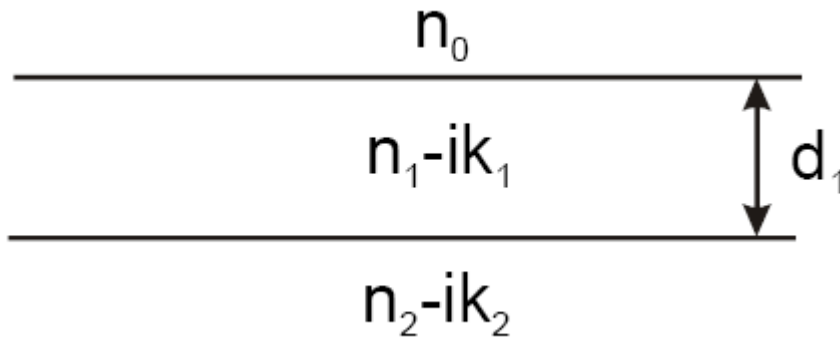
$$(C_m) = \begin{pmatrix} e^{i\delta_{m-1}} & r_m e^{i\delta_{m-1}} \\ r_m e^{-i\delta_{m-1}} & e^{-i\delta_{m-1}} \end{pmatrix} \equiv \begin{pmatrix} p_m + iq_m & r_m + is_m \\ t_m + iu_m & v_m + iw_m \end{pmatrix}$$

και

$$\begin{aligned}
p_m &= e^{a_{m-1}} \cos \gamma_{m-1} \\
q_m &= e^{a_{m-1}} \sin \gamma_{m-1} \\
r_m &= e^{a_{m-1}} (g_m \cos \gamma_{m-1} - h_m \sin \gamma_{m-1}) \\
s_m &= e^{a_{m-1}} (h_m \cos \gamma_{m-1} + g_m \sin \gamma_{m-1}) \\
t_m &= e^{-a_{m-1}} (g_m \cos \gamma_{m-1} + h_m \sin \gamma_{m-1}) \\
u_m &= e^{-a_{m-1}} (h_m \cos \gamma_{m-1} - g_m \sin \gamma_{m-1}) \\
v_m &= e^{-a_{m-1}} \cos \gamma_{m-1} \\
w_m &= -e^{-a_{m-1}} \sin \gamma_{m-1}
\end{aligned}$$

Ακολουθεί μια απλή εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου σε ένα σύστημα που αποτελείται από ένα απλό φιλμ (που απορροφά ακτινοβολία) πάνω σε υπόστρωμα απείρου πάχους, που και αυτό με τη σειρά του είναι απορροφητικό για την ακτινοβολία.

Στο σχήμα απεικονίζεται το σύστημα που αποτελείται από ένα υμένιο πάχους d_1 πάνω σε άπειρο υπόστρωμα, όπου και τα δύο είναι απορροφητικά



Σχήμα 2.1: Σύστημα με ένα απορροφητικό υμένιο σε άπειρο υπόστρωμα επίσης απορροφητικό

Σύμφωνα με την ανάλυση της προηγούμενης ενότητας, σε οποιοδήποτε μήκος κύματος λ για τον υπολογισμό της ανάκλασης, απαιτούνται οι ακόλουθες σχέσεις

$$g_1 = \frac{n_0^2 - n_1^2 - k_1^2}{(n_0 + n_1)^2 + k_1^2} \qquad g_2 = \frac{n_1^2 - n_2^2 + k_1^2 - k_2^2}{(n_1 + n_2)^2 + (k_1 + k_2)^2}$$

$$h_1 = \frac{2n_0k_1}{(n_0 + n_1)^2 + k_1^2}$$

$$h_2 = \frac{2(n_1k_2 - n_2k_1)}{(n_1 + n_2)^2 + (k_1 + k_2)^2}$$

$$p_2 = e^{a_1} \cos \gamma_1$$

$$q_2 = e^{a_{m-1}} \sin \gamma_{m-1}$$

$$t_2 = e^{-a_1} (g_2 \cos \gamma_1 + h_2 \sin \gamma_1)$$

$$u_2 = e^{-a_1} (h_2 \cos \gamma_1 - g_2 \sin \gamma_1)$$

όπου $a_1 = \frac{2\pi}{\lambda} k_1 d_1$ και $\gamma_1 = \frac{2\pi}{\lambda} n_1 d_1$ (rad). Με τη βοήθεια των σχέσεων έχουμε

$$p_{12} = p_2 + g_1 t_2 - h_1 u_2$$

$$q_{12} = q_2 + h_1 t_2 + g_1 u_2$$

$$t_{12} = t_2 + g_1 p_2 - h_1 q_2$$

$$u_{12} = u_2 + h_1 p_2 + g_1 q_2$$

Μετά τον υπολογισμό των παραπάνω σχέσεων ο συντελεστής ανάκλασης μπορεί να υπολογιστεί πλέον εύκολα από τον τύπο:

$$R_1 = \frac{t_{12}^2 + u_{12}^2}{p_{12}^2 + q_{12}^2}$$

Στην περίπτωση που το υμένιο ή το υπόστρωμα έχουν μηδενική απορρόφηση (διαφανή) οι προηγούμενες εκφράσεις απλοποιούνται αρκετά. Οι περιπτώσεις αυτές εξετάζονται στο βιβλίο του Heavens.

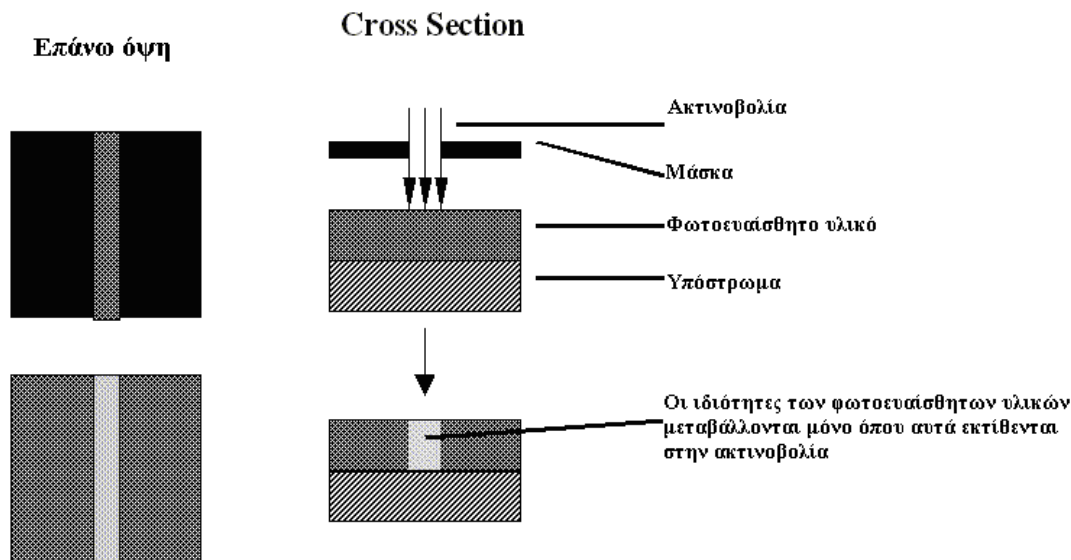
Η μέθοδος των πινάκων διευκολύνει αρκετά στον υπολογισμό των συντελεστών ανάκλασης και διάδοσης (σε ένα διαφανές υπόστρωμα αλλιώς είναι μηδενικοί) καθώς οι τελικοί τύποι απ' όπου εξάγονται είναι απλοί. Ο υπολογισμός τους γίνεται σταδιακά, κάτι που επιτρέπει την εύκολη υλοποίηση σε H/Y. Μέσω αυτής της μεθόδου και του κώδικα που αναπτύχθηκε απ' αυτήν, προέκυψε ο συντελεστής ανάκλασης του φιλμ της πειραματικής μας διάταξης.

Περισσότερες λεπτομέρειες για τη matrix method και το θεωρητικό υπόβαθρο υπάρχουν στο τέταρτο κεφάλαιο του βιβλίου του Heavens[5].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Λιθογραφία

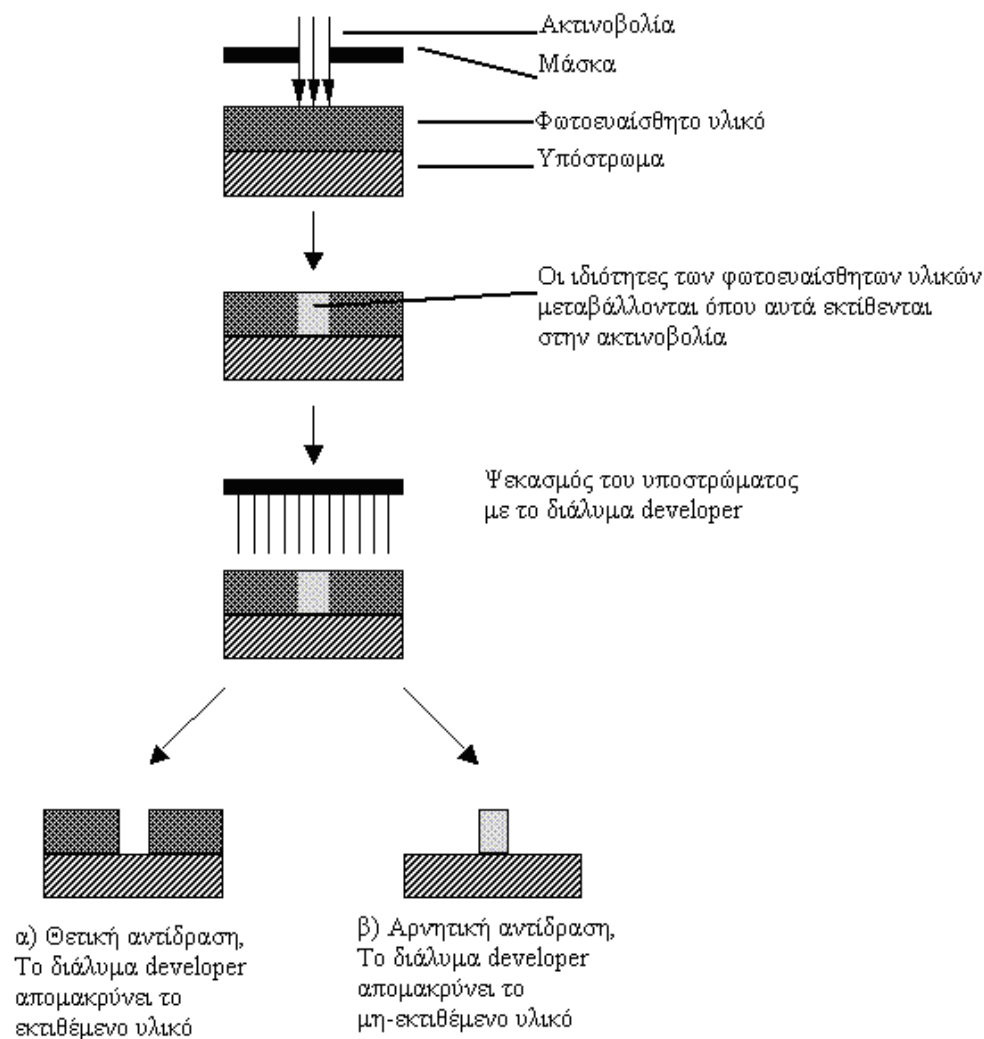
Η λιθογραφία είναι στην πραγματικότητα η μεταφορά ενός σχεδίου σε ένα φωτοευαίσθητο υλικό με επιλεκτική έκθεση σε μια πηγή ακτινοβολίας όπως το φως. Ως φωτοευαίσθητο υλικό μπορούμε να χαρακτηρίσουμε το υλικό το οποίο υφίσταται μια αλλαγή στις φυσικές του ιδιότητες όταν εκτεθεί σε μια πηγή ακτινοβολίας. Αν εκθέσουμε επιλεκτικά ένα φωτοευαίσθητο υλικό (για παράδειγμα, μπλοκάροντας κάποια ποσότητα της ακτινοβολίας), το σχήμα της ακτινοβολίας στο υλικό μεταφέρεται στο υλικό που εκτίθεται, αφού οι ιδιότητες των εκτιθέμενων και μη-εκτιθέμενων περιοχών διαφέρουν (όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Μεταφορά σχήματος σε ένα φωτοευαίσθητο υλικό.

Στη λιθογραφία για τη μικρομηχανική, το φωτοευαίσθητο υλικό που χρησιμοποιείται είναι μια τυπική φωτοευαίσθητη ρητίνη (photoresist, που επίσης λέγεται resist). Όταν η ρητίνη, (στο εξής η φωτοευαίσθητη ρητίνη θα καλείται ρητίνη ή resist), εκτίθεται στην πηγή ακτινοβολίας ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος, η χημική αντίσταση του resist στο διάλυμα του εμφανιστή αλλάζει. Αν η ρητίνη τοποθετηθεί σε ένα διάλυμα εμφανιστή μετά από επιλεκτική έκθεση στην πηγή φωτός, θα «φάει» μια από τις δυο περιοχές (εκτιθέμενη ή μη). Αν το εκτιθέμενο υλικό «φαγωθεί» από τον εμφανιστή και η μη-εκτεθειμένη περιοχή είναι ελαστική, το υλικό θεωρείται θετικού τόνου (φαίνεται στην εικόνα 3.2α). Αν το

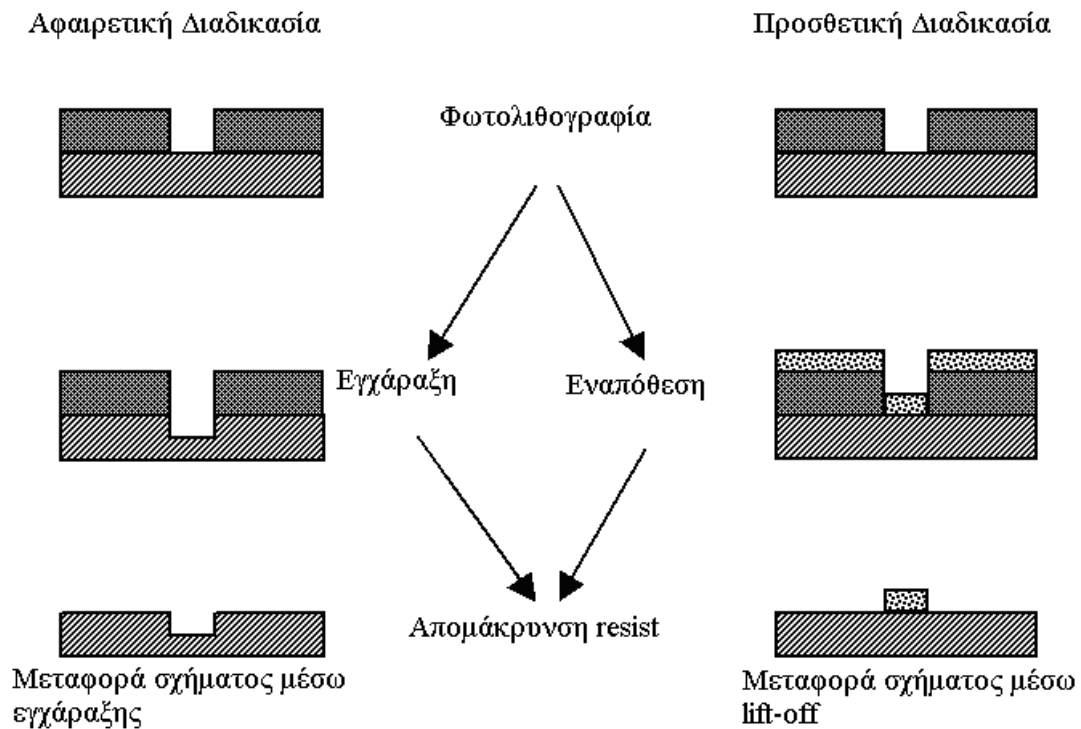
εκτιθέμενο υλικό είναι ελαστικό στον εμφανιστή και η μη-εκτιθέμενη περιοχή «φαγωθεί», θεωρείται αρνητικού τόνου (φαίνεται στη 3.2β).



Εικόνα 3.2: α) Καθορισμός σχήματος σε θετικό resist, β) Καθορισμός σχήματος σε αρνητικό resist

Η λιθογραφία είναι ο θεμελιώδης μηχανισμός για σχηματισμό δομών (pattern definition) στη μικρομηχανική. Τα φωτοευαίσθητα τμήματα είναι κυρίως οργανικά και δεν περιλαμβάνουν το φάσμα των ιδιοτήτων των υλικών που ενδιαφέρουν όσους ασχολούνται με τη μικρομηχανική. Εντούτοις, αφού σαν τεχνική είναι ικανή να παράγει καλές δομές και κατά οικονομικό τρόπο, ένα φωτοευαίσθητο υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί συχνά σαν παροδική μάσκα, όταν θέλουμε να χαράξουμε ένα υποκείμενο στρώμα, έτσι ώστε το σχήμα να μπορεί να μεταφερθεί στο υποκείμενο υπόστρωμα όπως φαίνεται και στην 3.3α. Οι ρητίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν οδηγοί για τη διαμόρφωση του υλικού που εναποτίθεται μετά τη λιθογραφία (όπως φαίνεται στην 3.3β). Η ρητίνη στη συνέχεια

απομακρύνεται και το υλικό που εναποτίθεται πάνω στη ρητίνη απομακρύνεται (υφίσταται “lift off”).



Εικόνα 3.3: α) Μεταφορά σχεδίου από σχηματισμένη ρητίνη σε υπόστρωμα μέσω εγχείρασης, β) Μεταφορά σχεδίου από σχηματισμένη ρητίνη σε υπερκείμενο υπόστρωμα μέσω lift-off.

Από τη στιγμή που το σχέδιο έχει μεταφερθεί σε άλλο στρώμα, το resist συνήθως απομακρύνεται. Αυτό είναι συχνά αναγκαίο μιας και το resist μπορεί να είναι ασύμβατο με επόμενα βήματα μικρομηχανικής. [14]

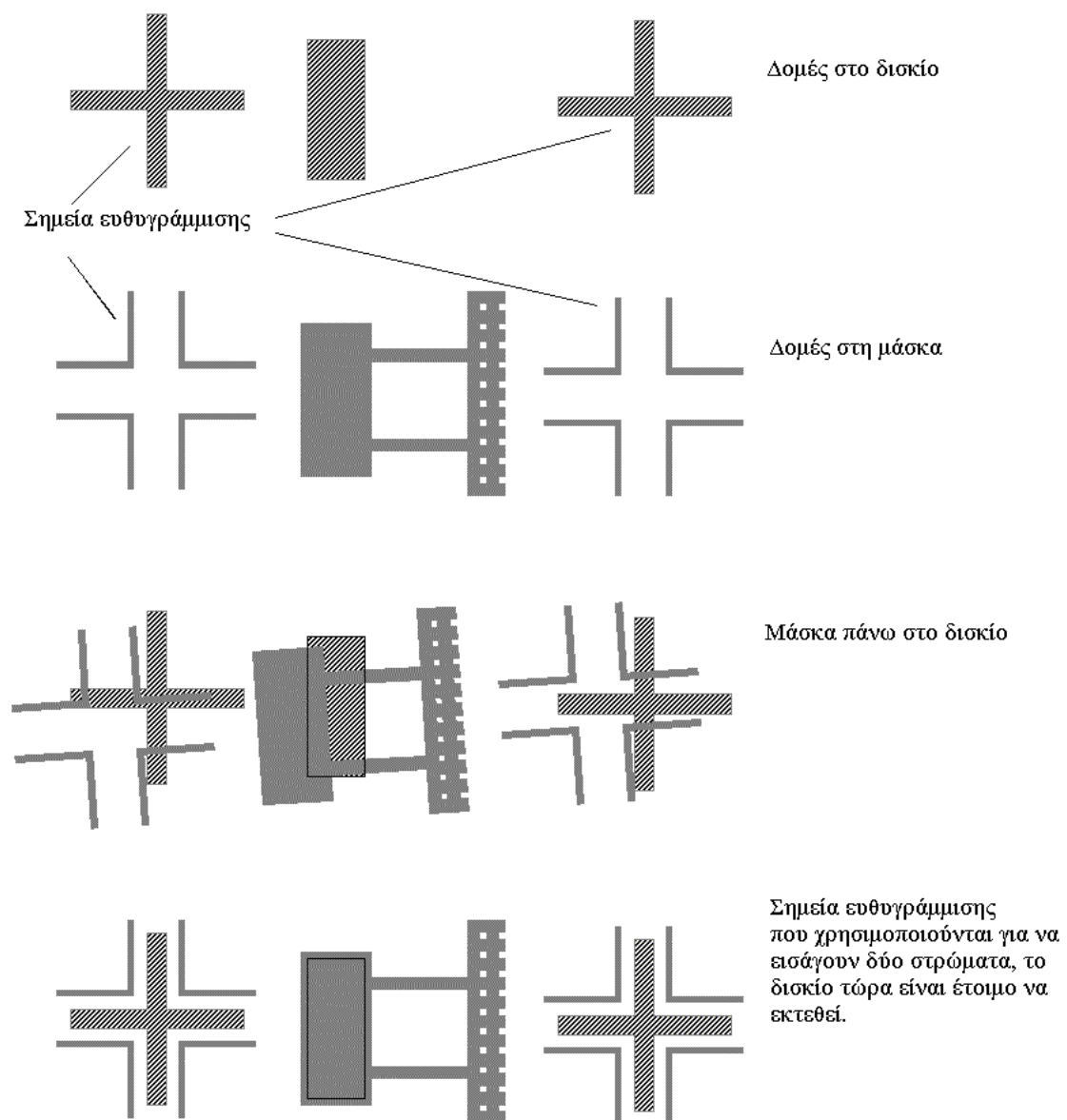
3.2 Ευθυγράμμιση

Για να κατασκευαστούν χρήσιμες διατάξεις τα σχέδια για διαφορετικά βήματα λιθογραφίας που ανήκουν σε μία δομή πρέπει να είναι ευθυγραμμισμένα. Το πρώτο σχέδιο που μεταφέρεται στο δισκίο συνήθως περιλαμβάνει ένα σύνολο από ευθυγραμμισμένα σημεία. Είναι υψηλής ακρίβειας δομές, οι οποίες χρησιμοποιούνται σα σημεία αναφοράς, κατά την τοποθέτηση νέων σχημάτων, στο αρχικό (όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4). Συχνά τα

σημάδια ευθυγράμμισης περιλαμβάνονται σε άλλα σχέδια, καθώς τα πρωτότυπα σημάδια ευθυγράμμισης μπορεί να παραληφθούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

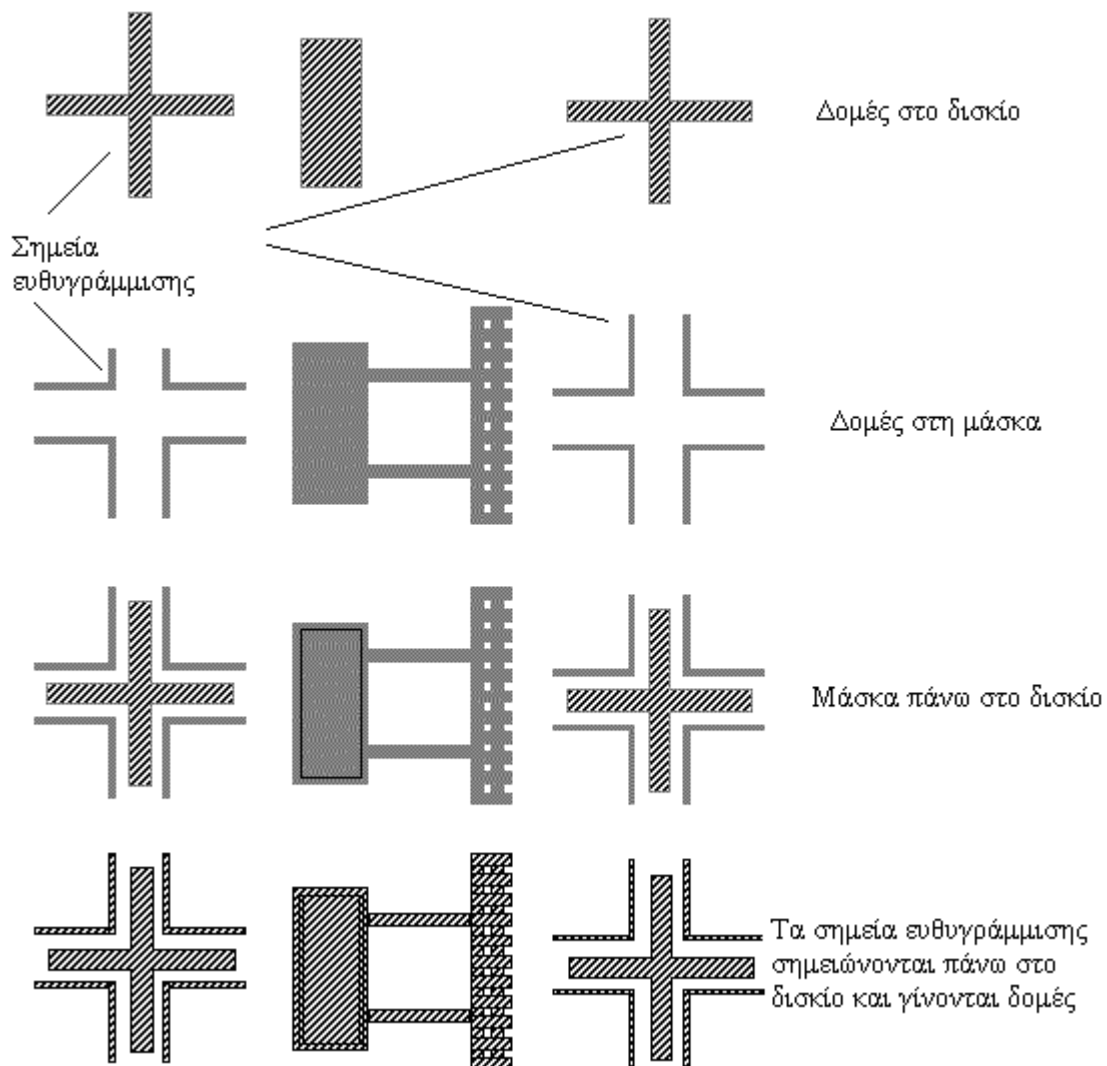
Είναι σημαντικό για κάθε σημάδι ευθυγράμμισης πάνω στο δισκίο να χαρακτηριστεί έτσι ώστε να μπορεί να αναγνωρίζεται, και για κάθε σχήμα να εξειδικεύεται το σημάδι ευθυγράμμισης (και η θέση κατά συνέπεια) για το οποίο έχει ευθυγραμμιστεί. Προσδιορίζοντας την τοποθεσία του σημείου ευθυγράμμισης είναι εύκολο για τον χειριστή να αναγνωρίσει τη σωστή δομή σε σύντομο χρόνο. [20]

Κάθε σχηματική επιφάνεια πρέπει να έχει μια ευθυγραμμισμένη δομή έτσι ώστε να μπορεί να σημειωθεί και στα υπόλοιπα υποστρώματα.

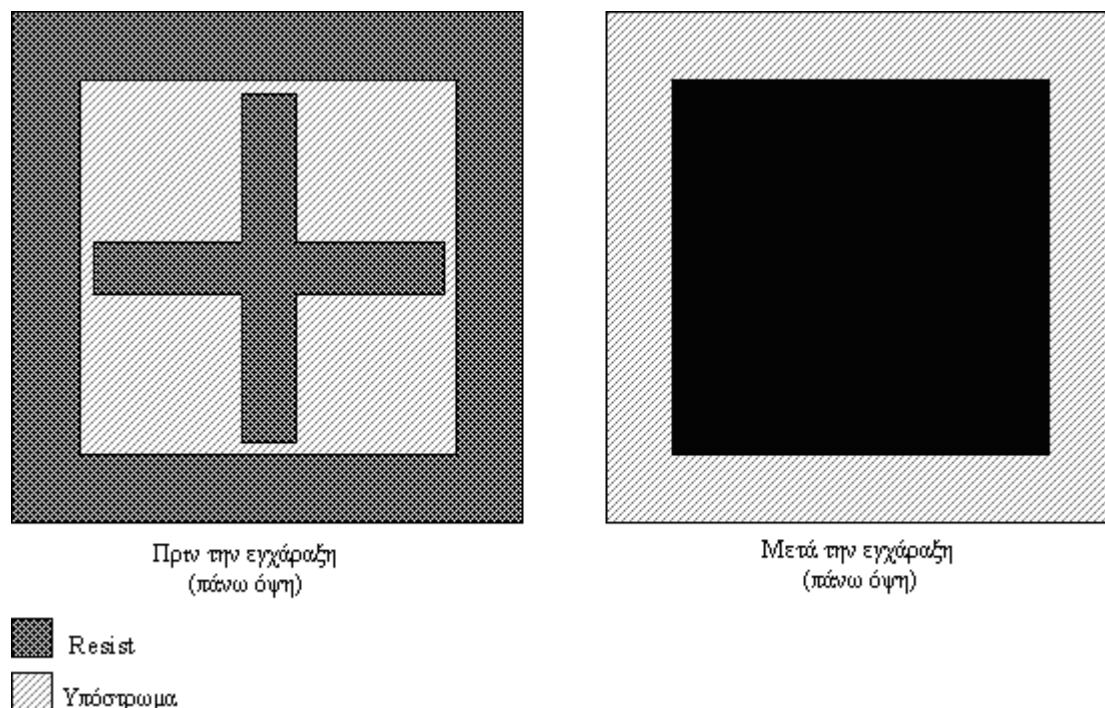


Εικόνα 3.4: Σημεία ευθυγράμμισης. Υψηλής ακρίβειας δομές, οι οποίες χρησιμοποιούνται σα σημεία αναφοράς, κατά την τοποθέτηση νέων σχημάτων.

Ανάλογα με τον εξοπλισμό λιθογραφίας που χρησιμοποιείται, η δομή στη μάσκα χρησιμοποιείται για να μεταφερθεί στο δισκίο (όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5). Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να είναι σημαντικό να εντοπιστούν τα σημεία ευθυγράμμισης έτσι ώστε να μην επηρεάζουν επακόλουθα τη διαδικασία δημιουργίας του δισκίου ή την απόδοση της συσκευής. Για παράδειγμα, το σημείο ευθυγράμμισης που φαίνεται στην εικόνα 3.6 θα πάψει να υπάρχει μετά από ξηρή εγχάραξη στο δισκίο. Μεταφορά των σχημάτων από τις δομές ευθυγράμμισης της μάσκας προς το δισκίο μπορεί να εξαλείψει τις δομές ευθυγράμμισης στο δισκίο. Σε αυτή την περίπτωση τα σημεία ευθυγράμμισης πρέπει να έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να μειώνουν αυτό το φαινόμενο, ή εναλλακτικά πρέπει να υπάρχουν πολλαπλά αντίγραφα των σημείων ευθυγράμμισης στο δισκίο, έτσι ώστε να υπάρχουν για τις μάσκες που μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν. [14]



Εικόνα 3.5: Μεταφορά των σημείων ευθυγράμμισης της μάσκας στο υπόστρωμα κατά τη λιθογραφία (ευθυγράμμιση επαφής)



Εικόνα 3.6: Κακή σχεδίαση σημείων ευθυγράμμισης για DRIE μέσω της εγχάραξης του δισκίου όπου ο σταυρός ευθυγράμμισης εξαφανίζεται.

Τα σημεία ευθυγράμμισης μπορεί να μην βρίσκονται απαραίτητα πάνω στο δισκίο, καθώς ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται μπορεί να έχει περιορισμένη δυνατότητα μετακίνησης του δισκιδίου και κατά συνέπεια να είναι ικανό να ευθυγραμμίσει δομές για μια συγκεκριμένη περιοχή του. Η γεωμετρία και το μέγεθος της περιοχής αυτής μπορεί επίσης να ποικίλει με τον τύπο ευθυγράμμισης, έτσι ώστε ο λιθογραφικός εξοπλισμός και ο τύπος ευθυγράμμισης που θα χρησιμοποιηθούν, να λαμβάνονται υπόψη πριν την τοποθέτηση των σημείων ευθυγράμμισης. Τυπικά χρησιμοποιούνται δυο σημεία ευθυγράμμισης για τη μάσκα και το δισκίο. Ένα τέτοιο σημείο είναι αρκετό για την ευθυγράμμιση της μάσκας και του δισκίου για τους άξονες x και y , αλλά απαιτούνται δύο σημεία (κατά προτίμηση μακριά το ένα από το άλλο) για τη διόρθωση του σφάλματος περιστροφής. [14]

3.3 Εγχάραξη

Για να διαμορφώσουμε μια λειτουργική δομή σε ένα υπόστρωμα, είναι απαραίτητο να εγχάραξουμε τα λεπτά υμένα που προηγουμένως έχουν εναποτεθεί και/ή το υπόστρωμα το ίδιο. Γενικά, υπάρχουν δύο είδη διαδικασίας εγχάραξης:

1. Υγρή εγχάραξη όπου το υλικό διαλύεται όταν εμβαπτίζεται σε ένα χημικό διάλυμα.

2. Ξηρή εγχάραξη όπου το υλικό απομακρύνεται (sputtered) ή διαλύεται χρησιμοποιώντας ιόντα που αντιδρούν, ή εγχάραξη αέριας φάσης . [14]

3.4 Εγχάραξη Piranha (Piranha Etch)

Η προέλευση των οργανικών υλικών στα δισκία, μπορεί να προέρχεται από εναπομένονσα φωτοευαίσθητη ρητίνη, λάδια του εξοπλισμού και ανθρώπινο λίπος που μένει από τα δαχτυλικά αποτυπώματα, υπολείμματα δέρματος, αλλά και μικροσταγονίδια που προκύπτουν από την αναπνοή κάποιου . Η απομάκρυνση των οργανικών υλικών είναι σημαντική μιας και λειτουργούν σα μάσκα όταν επιχειρούμε να χρησιμοποιήσουμε διάλυμα υδροφθορίου για να απομακρύνουμε το στρώμα του οξειδίου. Αυτό συμβαίνει γιατί, το οργανικό υλικό θα εμποδίσει την απομάκρυνση των οξειδίων που μπορεί να περιέχουν ακαθαρσίες τα οποία δεν θα επιτρέψουν την εναπόθεση του υλικού στις περιοχές αυτές του δισκίου. Αυτό οδηγεί σε μια άνιση κατανομή του εναποτιθέμενου υλικού, που επηρεάζει τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του ολοκληρωμένου κυκλώματος που βρίσκεται σε αυτή την περιοχή. [20]

3.4.1 Χημική σύνθεση και τρόπος υλοποίησης της εγχάραξης Piranha

Τυπικά, μείγματα από 98% H_2SO_4 (θεικού οξέος) και 30% H_2O_2 (υπεροξειδίου) σε αναλογίες όγκου της τάξης 2-4:1 χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασίες των $100^\circ C$ και πάνω. Αυτό το μείγμα αναφέρεται συχνά ως «Piranha etch» (εξαιτίας της αδηφάγου ικανότητας του να απομακρύνει οργανική ύλη). [14]

3.5 Διαδικασίες Εναπόθεσης Λεπτών Υμενίων

Η διαδικασία εναπόθεσης λεπτών υμενίων μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες:

1. Εναποθέσεις που συμβαίνουν εξαιτίας χημικών αντιδράσεων:
 - Χημική Εναπόθεση Ατμών (Chemical Vapor Deposition (CVD))
 - Ηλεκτροεναπόθεση (Electrodeposition)
 - Επιταξία (Epitaxy)
 - Θερμική Οξειδωση (Thermal oxidation)

Αυτές οι διαδικασίες εκμεταλλεύονται τη δημιουργία στερεών υλικών κατευθείαν απ' τις χημικές αντιδράσεις στα αέρια και/ή στα υγρά, ή με το υλικό του υποστρώματος. Το στερεό

υλικό συνήθως δεν είναι το μόνο προϊόν που σχηματίζεται με την αντίδραση. Τα παραπροϊόντα μπορεί να είναι αέρια, υγρά ή ακόμα και άλλα στερεά.

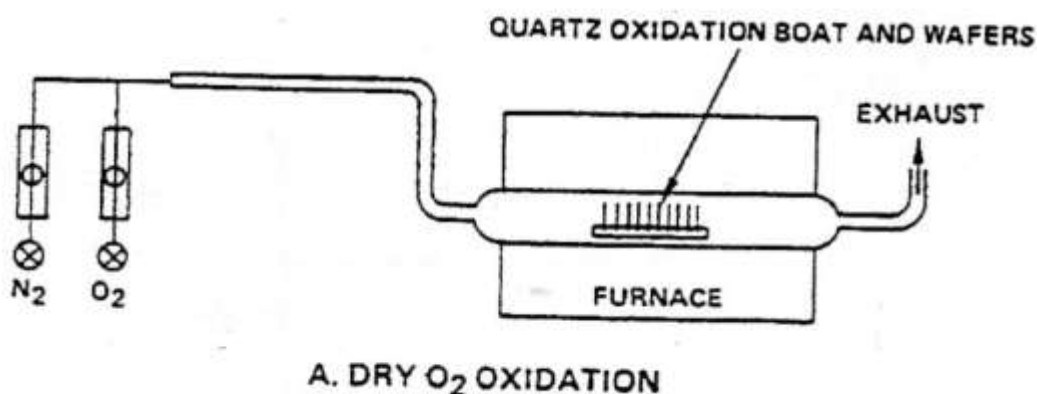
2. Εναποθέσεις που συμβαίνουν εξαιτίας φυσικών αντιδράσεων:

- Φυσική Εναπόθεση Ατμών (**Physical Vapor Deposition (PVD)**)
- Χύτευση (Casting)

Κοινό για όλες αυτές τις διαδικασίες είναι ότι το υλικό που εναποτίθεται, μετακινείται φυσικά πάνω στο υπόστρωμα. Με άλλα λόγια, δεν υπάρχει καμία χημική αντίδραση που να σχηματίζει το υλικό πάνω στο υπόστρωμα. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει απόλυτα στη διαδικασία της χύτευσης, αλλά είναι βολικό να το βλέπουμε έτσι και γι' αυτά. Εδώ θα κάνουμε αναφορά μόνο στη διαδικασία που ακολουθήθηκε. [14],[20]

3.5.1 Θερμικές Διαδικασίες

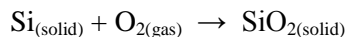
Η οξείδωση και η διάχυση των προσμίξεων είναι οι βασικές θερμικές διεργασίες που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία κατασκευής ολοκληρωμένων κυκλωμάτων. Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης, σχηματίζεται στην επιφάνεια του πυριτίου, οξείδιο του πυριτίου που χρησιμοποιείται είτε ως μάσκα, είτε ως διηλεκτρικό. Διάχυση είναι η μέθοδος της εισαγωγής προσμίξεων εντός του κρυσταλλικού πλέγματος του πυριτίου, μέσω παραθύρων που ανοίγονται στη μάσκα του διοξειδίου του πυριτίου. Και οι δύο παραπάνω διαδικασίες γίνονται σε υψηλή θερμοκρασία εντός φούρνων, που θερμαίνονται από αντιστάσεις.[19]



Εικόνα 3.7: Η διαδικασία της οξείδωσης και της διάχυσης σε υψηλές θερμοκρασίες.

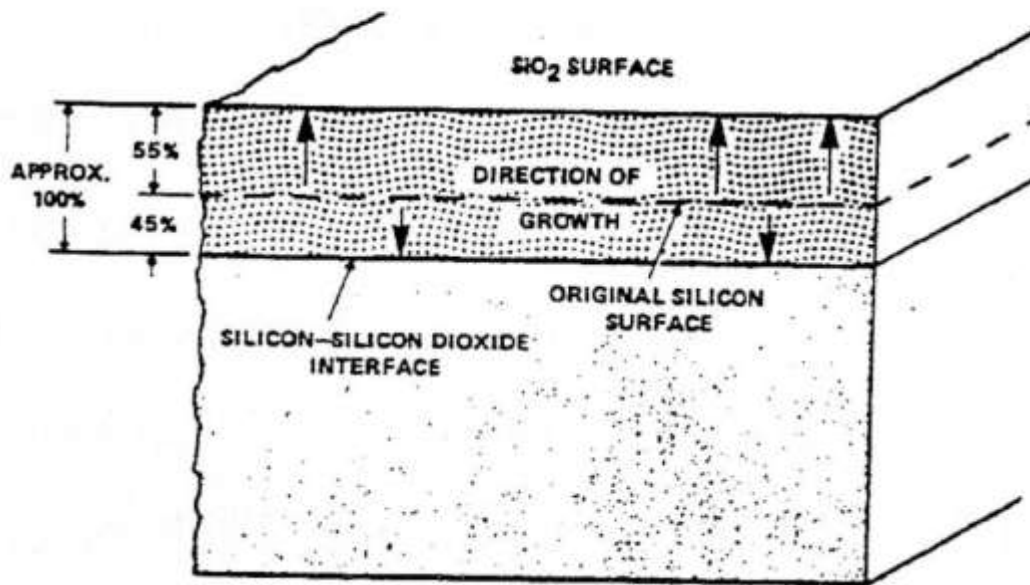
3.5.2 Οξείδωση

Όταν το πυρίτιο εκτίθεται σε ατμόσφαιρα οξυγόνου, λαμβάνει χώρα η παρακάτω αντίδραση:



Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στην ατμόσφαιρα, ο σχηματισμός ενός λεπτού στρώματος οξειδίου του πυριτίου, πάχους 2nm, είναι θέμα δευτερολέπτων. Το οξείδιο αυτό είναι αρκετά πυκνό ώστε να εμποδίζει το οξυγόνο της ατμόσφαιρας να το διασχίσει και να αντιδράσει εκ νέου με το υποκείμενο πυρίτιο, αυξάνοντας εκ νέου το πάχος του οξειδίου. Όταν όμως αυξήσουμε τη θερμοκρασία τοποθετώντας το δισκίο του πυριτίου εντός φούρνου που διαρρέεται από οξυγόνο, η διαχυτότητα του οξυγόνου, εντός του λεπτού στρώματος οξειδίου, αυξάνεται με αποτέλεσμα το οξυγόνο να φθάνει γρήγορα στο υποκείμενο πυρίτιο, να αντιδρά με αυτό σύμφωνα με την παραπάνω χημική αντίδραση και το πάχος του οξειδίου να αυξάνεται.

Η θερμική οξείδωση του πυριτίου στην πράξη γίνεται ανάμεσα στους 600°C και στους 1200 °C. Το στοιχείο που προκαλεί την οξείδωση είναι είτε ξηρό οξυγόνο, είτε υγρό οξυγόνο. Λέγοντας ξηρό οξυγόνο εννοούμε καθαρό οξυγόνο. Με τον όρο υγρό οξυγόνο, εννοούμε καθαρό οξυγόνο το οποίο πριν εισέλθει στο φούρνο, διέρχεται μέσω υδρατμών ύδατος, θερμοκρασίας 90°C. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας της οξείδωσης του πυριτίου φαίνεται στην εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8

Η φυσική της διαδικασίας της οξείδωσης περιγράφεται ικανοποιητικά από το μοντέλο Deal – Grove. Το γραμμικό-παραβολικό μοντέλο των Deal-Grove (D-G), περιγράφει την κινητική της θερμικής οξείδωσης τόσο για την ξηρή, όσο και για την υγρή οξείδωση του πυριτίου. Το μοντέλο αυτό συμφωνεί με τα πειραματικά δεδομένα για μια μεγάλη περιοχή τιμών οξειδίων (από 30nm μέχρι 2nm), για θερμοκρασίες από 700°C – 130°C και για μερικές πιέσεις από 0,2 Atm μέχρι 25 Atm.

Η βασική υπόθεση του μοντέλου D-G, είναι ότι τα μόρια του οξειδωτικού μέσου διαλύονται σε ενδοπλεγματικές θέσεις μέσα στο οξείδιο και διαχέονται προς τη διεπιφάνεια οξειδίου/πυριτίου, όπου και αντιδρούν, ακόμα και αν αλληλεπιδρούν σε κάποιο βαθμό με το πλέγμα του οξειδίου. [19]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Βιολογικά Αντιδραστήρια

- Στρεπταβιδίνη

Η λέξη πρωτεΐνη προέρχεται από την ελληνική ρίζα *πρώτα* και δόθηκε αρχικά από το Σουηδό χημικό Jöns Jakob Berzelius το 1838. Η επιλογή του ονόματος έγινε με σκοπό να τονίσει την *πρωταρχική* σημασία τους, το βασικό τους ρόλο στη δομή και λειτουργία του κυττάρου. Ωστόσο, ο κεντρικός ρόλος των πρωτεϊνών στους ζωντανούς οργανισμούς δεν είχε εκτιμηθεί πλήρως μέχρι και το 1926. Τότε ήταν που ο James B. Sumner, έδειξε ότι το ένζυμο ουρεάση, ήταν πρωτεΐνη. Η πρώτη πρωτεΐνη της οποίας βρέθηκε η ακολουθία των αμινοξέων, ήταν η ινσουλίνη, από τον Frederick Sanger, ο οποίος γι' αυτό του το επίτευγμα, τιμήθηκε και με το βραβείο Nobel το 1958.

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα οργανικά μόρια, αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία σχηματίζουν μια γραμμική αλυσίδα και ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται σύμφωνα με το γενετικό κώδικα. Παρόλο που ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί 20 αμινοξέα, τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη συχνά υφίστανται χημικές αλλαγές κατά τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση¹: είτε προτού να μπορέσει η πρωτεΐνη να λειτουργήσει στο κύτταρο, είτε ως τμήμα των μηχανισμών ελέγχου. Περισσότερες από μια πρωτεΐνες συχνά λειτουργούν μαζί για να επιτύχουν κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, ή μπορεί ακόμα και να συσσωματωθούν για να διαμορφώσουν τα σταθερά σύμπλοκα.

Όπως άλλα βιολογικά μακρομόρια (πολυσακχαρίτες, λιπίδια, και νουκλεϊκά οξέα) οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και συμμετέχουν σε κάθε διαδικασία μέσα στα κύτταρα. Πολλές δρουν ως ένζυμα που καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις, και είναι ζωτικής σημασίας για το μεταβολισμό. Άλλες, έχουν δομικές ή μηχανικές λειτουργίες, όπως οι πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού, οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση της μορφής των κυττάρων. Είναι επίσης σημαντικές στη διακυτταρική επικοινωνία, τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, τον σχηματισμό κυτταρικών ιστών,

¹ Η μετα-μεταγραφική τροποποίηση είναι η χημική τροποποίηση μιας πρωτεΐνης μετά τη μετάφρασή της. Είναι ένα από τα τελευταία στάδια στην πρωτεϊνική σύνθεση, για πολλές πρωτεΐνες.

και τον κυτταρικό κύκλο. Αποτελούν απαραίτητο συστατικό στη διατροφή μας, δεδομένου ότι τα ζώα δε μπορούν να συνθέσουν όλα τα αμινοξέα, αλλά πρέπει να τα λάβουν από τα τρόφιμα. Μέσω της διαδικασίας της πέψης, τα ζώα αποδομούν την πρωτεΐνη στα ελεύθερα αμινοξέα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρωτεϊνική σύνθεση.

Η πρωτεΐνη, που επίσης καλείται και πολυπεπτίδιο, είναι μια αλυσίδα από αμινοξέα. Κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, 20 διαφορετικά αμινοξέα μπορούν να συγχωνεύονται σε πρωτεΐνες. Μετά τη μετάφραση, η μετα-μεταγραφική τροποποίηση των αμινοξέων επεκτείνει το εύρος των λειτουργιών της πρωτεΐνης με το να προσκολλά άλλες βιοχημικές λειτουργικές ομάδες όπως acetate, phosphate, διάφορα λιπίδια και υδρογονάνθρακες, αλλάζοντας τη χημική φύση ενός αμινοξέος ή κάνοντας δομικές αλλαγές, όπως ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών.

Η στρεπταβιδίνη, είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη, την οποία παίρνουμε από το στρεπτομύκητα *Streptomyces avidinii*. Έχει ευρεία χρήση στη μοριακή βιολογία εξαιτίας της εξαιρετικά ισχυρής συγγένειας με τη βιταμίνη βιοτίνη (*biotin*). Η σταθερά αποσύνδεσης (K_d) του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης είναι της τάξης περίπου των $\sim 10^{-15}$ mol/L, κάτι που το καθιστά ανάμεσα στις πιο ισχυρές γνωστές μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.

Μεταξύ των πιο κοινών χρήσεων είναι ο καθαρισμός ή η ανίχνευση των διάφορων βιομορίων. Ο ισχυρός δεσμός στρεπταβιδίνης-βιοτίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συνδέσει τα διάφορα βιομόρια το ένα με το άλλο ή επάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα.

- Βιοτίνη

Η βιοτίνη είναι επίσης γνωστή και ως βιταμίνη H ή B₇ και ο χημικός της τύπος είναι C₁₀H₁₆N₂O₃S. Είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων, την παραγωγή των λιπαρών οξέων και το μεταβολισμό των λιπών και των αμινοξέων. Συμβάλει επίσης στον κύκλο του κιτρικού οξέος, που είναι η διαδικασία με την οποία παράγεται η βιοχημική ενέργεια κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Η βιοτίνη δε βοηθά μόνο στις διάφορες μεταβολικές αντιδράσεις, αλλά και στη μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης βοηθά στη διατήρηση ενός σταθερού επιπέδου σακχάρου στο αίμα. Τέλος τη βρίσκουμε σε πολλά προϊόντα κοσμητικής και φαρμακευτικά προϊόντα για τα μαλλιά και το δέρμα.

Στη βιολογία η βιοτίνη συνδέεται χημικά με κάποιο μόριο ή πρωτεΐνη και χρησιμοποιείται σε βιοαναλυτικές μεθόδους. Αυτή η διαδικασία καλείται βιοτινυλίωση (*biotinylation*). Τα επισημασμένα με βιοτίνη μόρια στη συνέχεια μπορούν να εξαχθούν από

ένα δείγμα με τη χρήση σφαιριδίων με αβιδίνη και ξέπλυμα οτιδήποτε άλλου που δεν είναι δεσμευμένο με τα σφαιρίδια. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της «προτίμησης» της αβιδίνης να δεσμεύει τη βιοτίνη.

Το σύστημα στρεπταβιδίνης – βιοτίνης χρησιμοποιείται στις βιοαναλυτικές μεθόδους είτε για την ακινητοποίηση είτε για τη σήμανση βιομορίων.

- Οραλβουμίνη

Είναι η πρωτεΐνη με τη μεγαλύτερη αφθονία στο πλάσμα του αίματος και παράγεται στο ήπαρ. Η οραλβουμίνη είναι σημαντική μιας και λειτουργεί ως φορέας μορίων με μικρή υδατοδιαλυτότητα, όπως κάλιο, σίδηρο, λιποδιαλυτές ορμόνες, φάρμακα και άλλα. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήσαμε βόειο οραλβουμίνη (BSA, Bovine serum albumin) η οποία έχει πολλές εφαρμογές στη βιοχημεία.

- *Phosphate buffer*

Διάλυμα φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των αντιδραστηρίων που δεν έχουν αντιδράσει αλλά και ως διαλύτης του αντιδραστηρίου που καλύπτει πρώτο τη βιοδεκτική επφάνεια. Το Phosphate buffer (PBS) παρασκευάζεται από Na_2HPO_4 (10 mM), KH_2PO_4 (1.8 mM), NaCl (140 mM), KCl (2.7 mM) και διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C, σε ψύκτη. Η τιμή του pH του ρυθμίζεται να έχει τιμή 7 – 7.4.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1 Προετοιμασία Πρωτεϊνών

5.1.1 Υλικά

Βόειος οραλβουμίνη (BSA, RIA grade, fraction V, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

Σύζευγμα βοείου οραλβουμίνης με βιοτίνη (παρασκευάστηκε)

Στρεπταβιδίνη (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)

5.1.2 Διαλύματα

Διάλυμα προσρόφησης της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του δισκίου: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,05 M, pH 7,4

Διάλυμα αποκλεισμού των κενών θέσεων της επιφάνειας: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,05 M, pH 7,4 που περιέχει 1% (β/ο) βόεια οραλβουμίνη.

Διάλυμα ανοσοαντίδρασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 50 mM, pH 7,4, που περιέχει 1% (β/ο) βόεια οραλβουμίνη, 0,9% NaCl και 0,05% νατραζίδιο.

Διάλυμα έκπλυσης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,05 M, pH 7,4 που περιέχει 0,5% (ο/ο) Tween 20 (μη ιονικό επιφανειοδραστικό) [8]

5.1.3 Παρασκευή συζεύγματος βοείου οραλβουμίνης με βιοτίνη

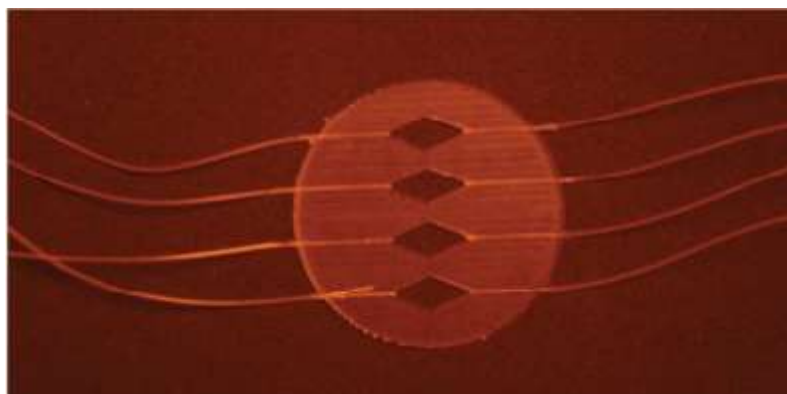
Παρασκευάστηκε διάλυμα βοείου οραλβουμίνης συγκέντρωσης 1 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών αλάτων 0,25 M, pH 9,1 το οποίο περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl. Επίσης, παρασκευάστηκε διάλυμα του σουλφο-ηλεκτριμιδυλο εστέρα του 6-[(βιοτινόυλο)αμινο] εξανοϊκού οξέος συγκέντρωσης 100 mg/mL σε διμεθυλοσουλφοξείδιο. Στο διάλυμα της βοείου οραλβουμίνης προστέθηκε διάλυμα σουλφο-ηλεκτριμιδυλο εστέρα του 6-[(βιοτινόυλο)αμινο] εξανοϊκού οξέος στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση, ώστε η κατά βάρος αναλογία του εστέρα προς τη βόεια οραλβουμίνη να είναι 2:1 και το μίγμα επώαστηκε επί 2 ώρες υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα διαπιδύθηκε ως προς διάλυμα όξινου ανθρακικού

νατρίου (NaHCO_3) 0,1 M, pH 8,5, το οποίο περιείχε 0,15 M χλωριούχο νάτριο (NaCl) και 0,5 % (β/ο) νατραζίδιο (NaN_3) και το σύζευγμα φυλάχτηκε στους 4 °C.

5.2 Κατασκευή του ρευστομηχανικού καναλιού

Παρασκευή του υμενίου PDMS:

Η ρομβοειδής γεωμετρία υιοθετήθηκε διότι σε αυτή επιτεύχθηκε καλύτερη ροή και έκπλυση των αντιδραστηρίων. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι οι φυσαλίδες κατά το μεγαλύτερο ποσοστό είτε να συγκρατούνται στην αρχή του καναλιού ή να κινούνται κατά μήκος των τοιχωμάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθότι σε περίπτωση που η φυσαλίδα συναντήσει την προσπίπτουσα δέσμη φωτός, θα προκαλέσει το φαινόμενο της σκέδασης του φωτός. Συνεπώς θα διαταραχθεί η σταθερότητα των αποτελεσμάτων. Οι διαστάσεις του ρόμβου είναι 0.8mm πλάτος και 1.5mm ύψος.



Εικόνα 5.1: Στεγανωτικό υμένιο PDMS μαζί με τους μικροσωλήνες και τα κανάλια που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα. Τοποθετήθηκε ανάμεσα στο δισκίο πυριτίου και το κάλυμμα του γυαλιού χαλαζία, ενώ δυο πλάκες αλουμινίου κρατούσαν σφικτά την κατασκευή.

Για την παρασκευή του υμενίου αναμιγνύεται, σε γυάλινο δοχείο των 50ml, θερμοσκληρυνόμενη ρητίνη SYLGARD 10ml με SYLGARD curing agent 1ml. Ανακατεύουμε το δείγμα μέχρι να ομογενοποιηθεί. Στο τέλος της ανάδευσης το μίγμα είναι γαλακτώδες με φυσαλίδες. Έπειτα, το εισάγουμε στον ξηραντήρα (ALFAGOMMA “PER PLIMENT”) όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2 για τρεις ώρες με σκοπό να απαλλαγεί από τις φυσαλίδες. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας το μίγμα φαίνεται διαυγές.



Εικόνα 5.2: Στον ξηραντήρα δημιουργείται κενό υπό πίεση με τη βοήθεια μηχανικής αντλίας με σκοπό να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες από το πολυμερικό μίγμα.

Αφού πάρουμε το δοχείο από τον ξηραντήρα ακολουθεί η έγχυση του μίγματος σε ειδικά διαμορφωμένη μήτρα από πολυμεθακρυλικό μεθυλεστέρα (PMMA). Η μήτρα αυτή σχεδιάστηκε σε autoCAD και το υλικό επιλέχθηκε λαμβάνοντας υπόψη τις ικανότητες πρόσδεσης των πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν. Σκοπός ήταν η δημιουργία ενός σταθερού καλουπιού στο οποίο θα γινόταν η χύτευση του PDMS για τη δημιουργία της μικρορευστομηχανικής μας διάταξης. Με τη βοήθεια της μήτρας αυτής πετύχαμε η διάταξή μας να έχει πιο λεία επιφάνεια κι έτσι να στεγανώνει καλύτερα. Τόσο τη μήτρα, όσο κι ένα wafer που χρησιμοποιήθηκε σαν καπάκι, επιστρώθηκαν με Teflon για να γίνει πιο εύκολη η αποδέσμευση του PDMS.

5.3 Προετοιμασία δισκίων Si σε στάδια

Όλα τα στάδια της προετοιμασίας των δισκίων, πραγματοποιήθηκαν σε εργαστήρια καθαρού χώρου με κατάλληλο φωτισμό για τα φωτοευαίσθητα υλικά του πειράματος.

5.3.1 Ανάπτυξη του στρώματος SiO_2

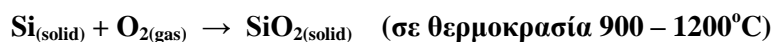
Για την ανάπτυξη του στρώματος SiO_2 στο Si ακολουθήθηκαν τρία βήματα:

A. Καθαρισμός των δισκίων αρχικά σε διάλυμα Piranha (H_2SO_4 , H_2O_2) και έκπλυση με απιονισμένο νερό. Ο σκοπός του καθαρισμού είναι να απομακρύνουμε από τα δισκία καθετί μολυσματικό ή οργανικό, όπως σκόνη ή άλλα οργανικά.

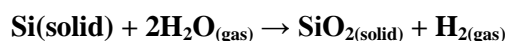
B. Ακολουθεί στέγνωμα με αέριο N_2 σε ειδικό στεγνωτήριο

Γ. Εναπόθεση των δισκίων στο φούρνο, όπου με τον κατάλληλο προγραμματισμό των αερίων που περνούν από το χώρο στον οποίο βρίσκονται τα δισκία, θα γίνει η οξειδωση του Si.

Αντίδραση:



Και



Τα οξειδωμένα δισκία φυλάσσονται στον καθαρό χώρο και πριν από κάποια επίστρωση επαναλαμβάνεται το στάδιο του καθαρισμού.

5.3.2 Επίστρωση

Οι πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται σε επιφάνειες και να σχηματίζουν στρώματα σε αυτές με ασθενείς μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Τέτοια επιφάνεια επιδεκτική σε βιομόρια είναι η AZ5214. Για το λόγο αυτό τα δισκία Si-SiO₂ τα επιστρώνουμε με λεπτά υμένα AZ5214. Η επιλογή της αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3.

Τα δισκία Si, επιστρώνονται με φωτοευαίσθητη ρητίνη AZ [AZ5214/PGMEA(1/30)] στον περιστροφικό επιστρωτή. Πριν την επίστρωση με ρητίνη επιστρώνεται στο δισκίο διάλυμα HDMS, πολυμερές που βοηθά στην ομοιόμορφη επίστρωση του AZ υμενίου.

Ο περιστροφικός επιστρωτής (Spin Coater – Karl Suss RC-8), χρησιμοποιείται για την επίστρωση διαλύματος πάνω σε δισκίο πυριτίου, ώστε να σχηματιστεί υμένιο επιθυμητού πάχους. Το στάδιο αυτό είναι σημαντικό για τη λήψη ομοιόμορφων υμενίων, καθώς επίσης και την απομάκρυνση του μεγαλύτερου ποσοστού του διαλύτη. Το δισκίο συγκρατείται με υποπίεση, η οποία δημιουργείται με μηχανική αντλία κενού, πάνω σε αυτό περιστρεφόμενη με τη βοήθεια ηλεκτρικού κινητήρα, κεφαλή ειδικού περιστροφέα. Η διάταξη του περιστροφικού επιστρωτή ελέγχεται από ένα ταμπλό οργάνων και ρυθμίζεται σε συνθήκες 5000rpm για 30 sec. Ο περιστροφικός επιστρωτής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία φαίνονται στα ακόλουθα σχήματα.



Εικόνα 5.3: Περιστροφικός επιστρωτής. Μοντέλο Karl Suss RC-8

Πριν από κάθε επίστρωση, ρυθμίζονται οι εξής παράγοντες: α) ταχύτητα περιστροφής της κεφαλής 5000rpm, β) χρόνος περιστροφής 30 sec. Αυτές οι δυο ρυθμίσεις προσδιορίζουν το πάχος του λαμβανόμενου υμενίου. Αρχικά το δισκίο με το υπόστρωμα τοποθετείται στην κεφαλή του περιστροφέα. Με τη βοήθεια σταγονόμετρου μεταφέρεται στο δισκίο ποσότητα διαλύματος, το οποίο απλώνεται κυκλικά και η διάμετρός του είναι συνήθως μικρότερη από τη συνολική διάμετρο του δισκίου. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, έτσι ώστε στο διάλυμα να μην υπάρχουν φυσαλίδες καθώς επίσης και σκόνη στο δισκίο, διότι επηρεάζουν την ποιότητα του υμενίου. Ακολουθεί η εκκίνηση της περιστροφής κατά την οποία εφαρμόζεται το κενό που συγκρατεί το δισκίο. Στο τέλος της περιστροφής παύει η εφαρμογή του κενού, το επιστρωμένο δισκίο απομακρύνεται και είναι έτοιμο για χρήση.

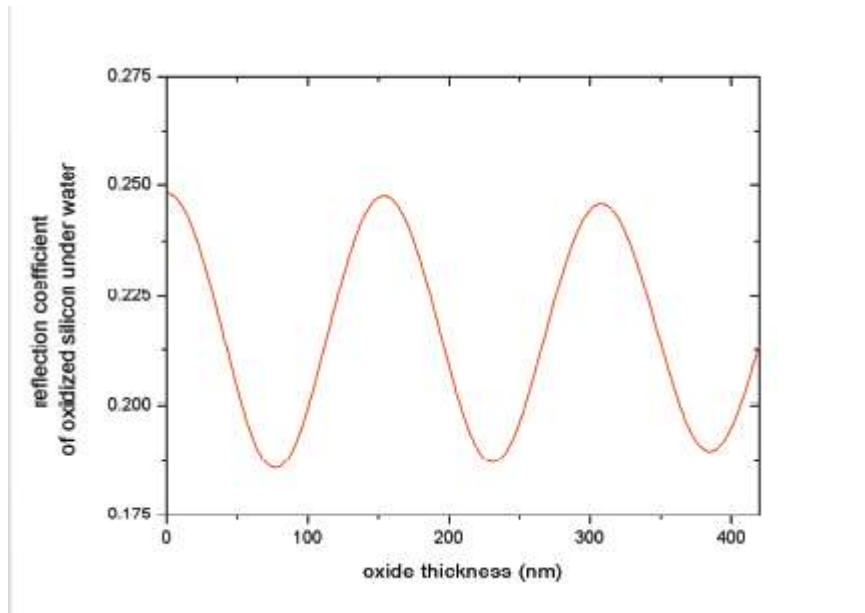
Ακολουθεί ψήσιμο των δισκίων για μια ώρα σε θερμαινόμενη πλάκα στους 180°C. Στη ρητίνη δημιουργούνται σταυροδεσμοί (cross-link) με αποτέλεσμα να μη διογκώνεται όταν έρθει σε επαφή με τα βιολογικά διαλύματα.

Ο συντελεστής ανάκλασης ενός υμενίου με δείκτη ανάκλασης n_1 , που βρίσκεται ανάμεσα σε δυο μέσα με δείκτες ανάκλασης n_0 και n_2 , δίνεται από τον τύπο:

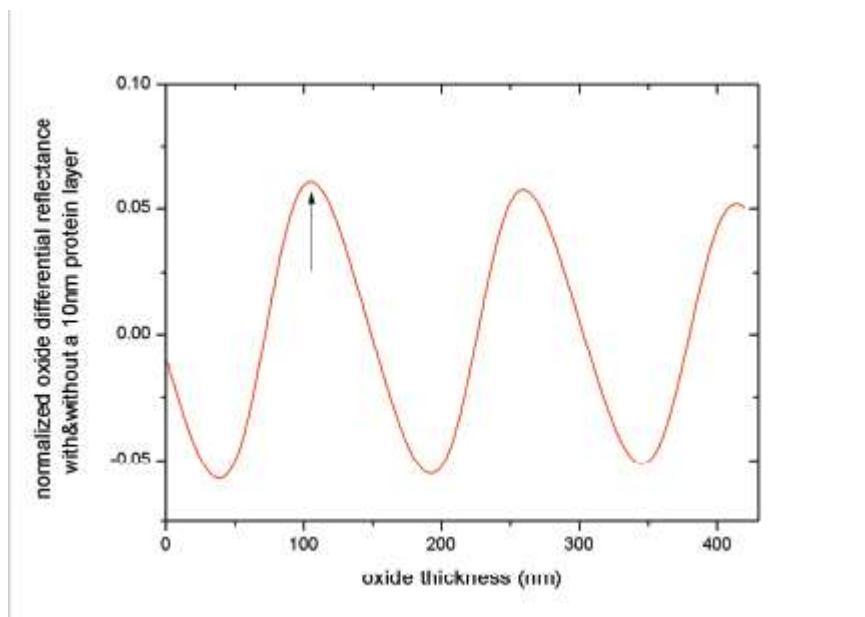
$$R = \frac{(n_0^2 + n_1^2)(n_1^2 + n_2^2) - 4n_0 n_1^2 n_2 + (n_0^2 - n_1^2)(n_1^2 - n_2^2) \cos 2\delta_1}{(n_0^2 + n_1^2)(n_1^2 + n_2^2) + 4n_0 n_1^2 n_2 + (n_0^2 - n_1^2)(n_1^2 - n_2^2) \cos 2\delta_1}$$

όπου $\delta_1 = (2 \pi n_1 d_1) / \lambda_0$. Ως d_1 ορίζουμε το πάχος του υμενίου.

Για δική μας διευκόλυνση υποθέτουμε ότι η πρωτεΐνη και το οξείδιο έχουν τον ίδιο δείκτη ανάκλασης.



Εικόνα 5.4: Συντελεστής ανάκλασης του συστήματος πυρίτιο-διοξείδιο του πυριτίου-νερό, σε συνάρτηση του πάχους του οξειδίου. Οι τιμές βρίσκονται ανάμεσα στην περιοχή φάσματος 425-475nm.



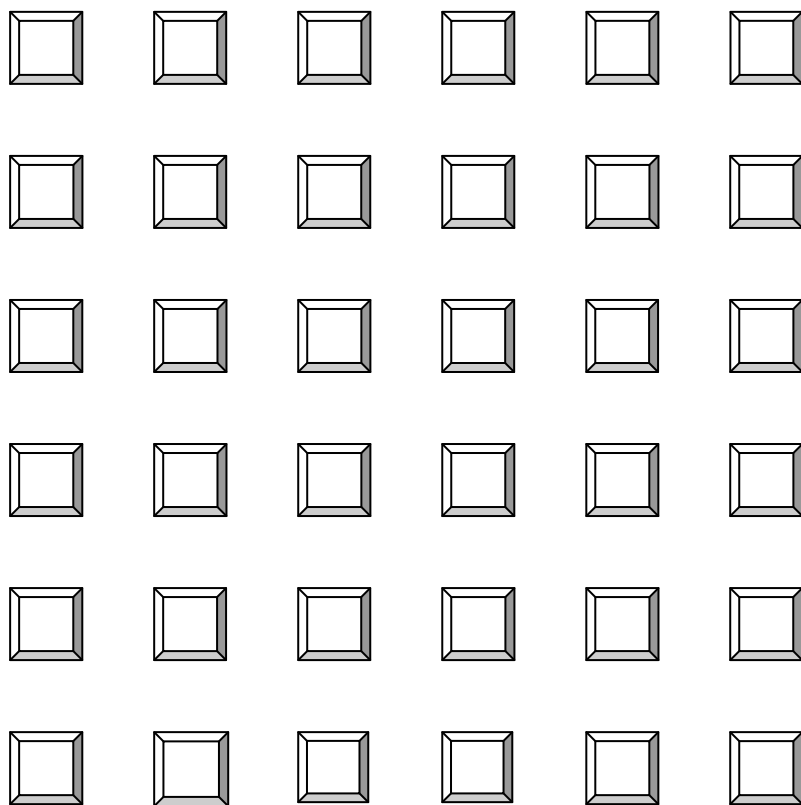
Εικόνα 5.5: Η σχετική ανάκλαση του οξειδίου αυξάνεται εξαιτίας της πρόσδεσης της, 10nm πρωτεΐνης. Οι τιμές είναι στην περιοχή φάσματος 425-475nm.

Από την εικόνα 4.5 βλέπουμε ότι τη μέγιστη ανάκλαση την παίρνουμε για πάχος οξειδίου 100nm, οπότε αυτό ήταν και το πάχος της επίστρωσης.

Το δισκίο στη συνέχεια ψήθηκε στους 120°C για 20 λεπτά κι έπειτα πραγματοποιήσαμε λιθογραφία με φωτοευαίσθητη ρητίνη AZ5214. Η ρητίνη αυτή έχει πολύ καλή σχέση τόσο με το οξείδιο του πυριτίου, όσο και με τις πρωτεΐνες τις οποίες θέλουμε να μελετήσουμε. Ουσιαστικά δρα ως «γέφυρα» μεταξύ του οξειδίου και των πρωτεϊνών και

βοηθά στην πρόσδεσή τους στην επιφάνεια του δισκίου. Η επίστρωση της ρητίνης έγινε με φυγόκεντρη μέθοδο (spin coating) στις 5200rpm και κατόπιν το δισκίο ψήθηκε στους 95 βαθμούς Κελσίου για 5 λεπτά. Η λιθογραφία ύστερα, έγινε με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία για 50 δευτερόλεπτα της μπροστινής επιφάνειας της μάσκας. Ακολουθεί εμφάνιση για ένα περίπου λεπτό έτσι ώστε να αποκαλυφθεί η δομή. Στη συνέχεια επεξεργαστήκαμε το δισκίο με plasma οξυγόνου για να απομακρυνθούν υπολείμματα APTES και ρητίνης. Η εναπομένουσα ρητίνη στο δισκίο, απομακρύνθηκε σε διάλυμα ακετόνης με επεξεργασία υπερήχων για 3 λεπτά.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως, η επικάλυψη αυτή τη φορά γίνεται πάνω σε περιοδικές δομές, σχήματος μικρών τετραγώνων με την ίδια απόσταση μεταξύ τους (1 προς 1), ενώ παλιότερα η επικάλυψη γινόταν σε επιφάνειες που δεν είχαν περιοδικότητα. Ο μετασχηματισμός Fourier που χρησιμοποιήσαμε απαιτεί περιοδικότητα για να εφαρμοστεί κι αυτό το επιτεύχθηκε μέσω της λιθογραφίας με συγκεκριμένη μάσκα, η δομή της οποίας φαίνεται στις ακόλουθες εικόνες. Η δομή ήταν ένα προς ένα (1:1). Δομή 1:1 σημαίνει ότι οι αποστάσεις και οι διαστάσεις μεταξύ των δομών είναι η ίδια. Στη μάσκα που χρησιμοποιήσαμε οι αποστάσεις ήταν 5nm,10nm,20nm. Ακολουθεί η εικόνα 5.6 στην οποία φαίνεται μια δομή 1:1 (ένα προς ένα).



Εικόνα 5.6: Δομή μάσκας 1:1(ένα προς ένα)

5.4 Πειραματική Διάταξη

Η μικρορευστομηχανική διάταξή μας (fluidic), τοποθετήθηκε πάνω στο δισκίο με τις περιοδικές δομές, καλύφθηκε με γυαλί από χαλαζία και με τη χρήση δυο ειδικά διαμορφωμένων πλακών από αλουμίνιο, τη σταθεροποιούμε και σφίγγοντας τις βίδες, διαγώνια, ασκούμε διαδοχική πίεση, μοιράζοντας την τάση πάνω στο γυαλί για να μη σπάσει. Σκοπός μας είναι να στεγανώσουμε τα κανάλια της μικρορευστομηχανικής μας διάταξης, για να κινούνται τα αντιδραστήρια μόνο μέσα σε αυτά. Η πειραματική διάταξη φαίνεται στην εικόνα 5.7 και στην εικόνα 5.8 τοποθετημένη στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 5.7: Η πειραματική διάταξη. Στο εσωτερικό του μικρού τετραγώνου διακρίνεται το fluidic πάνω στο δισκίο. Επίσης φαίνονται και οι σωλήνες απ' όπου εγχέουμε τα αντιδραστήρια.



Εικόνα 5.8: Η κατασκευή αλουμινίου μαζί με τη μικρορευστομηχανική διάταξη και το διαμορφωμένο δισκίο, στο μικροσκόπιο Olympus MX61. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν από ψυχόμενη φωτογραφική μηχανή, 12-bit και αναλύθηκαν μέσω 2-D μετασχηματισμού Fourier, για να απομονωθεί ο παράγοντας της αντίθεσης.

Ελήφθησαν εικόνες από το δισκίδιο πυριτίου με μικροσκόπιο Olympus MX61 και τη βοήθεια της προσαρτημένης σε αυτό 12-bit φωτογραφικής μηχανής, Olympus DP71. Οι φωτογραφίες λαμβάνονταν κάθε 4 δευτερόλεπτα από το ίδιο σημείο και καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Έτσι στο τέλος μπορούσαμε να σχηματίσουμε μια καλή εικόνα για την αντίδραση που λάμβανε χώρα.

5.5 Πειραματική Πορεία

Αφού πραγματοποιηθεί η στεγάνωση του συστήματος, μέσω της σταδιακής σφίξης των βιδών, ακολουθούμε την εξής διαδικασία:

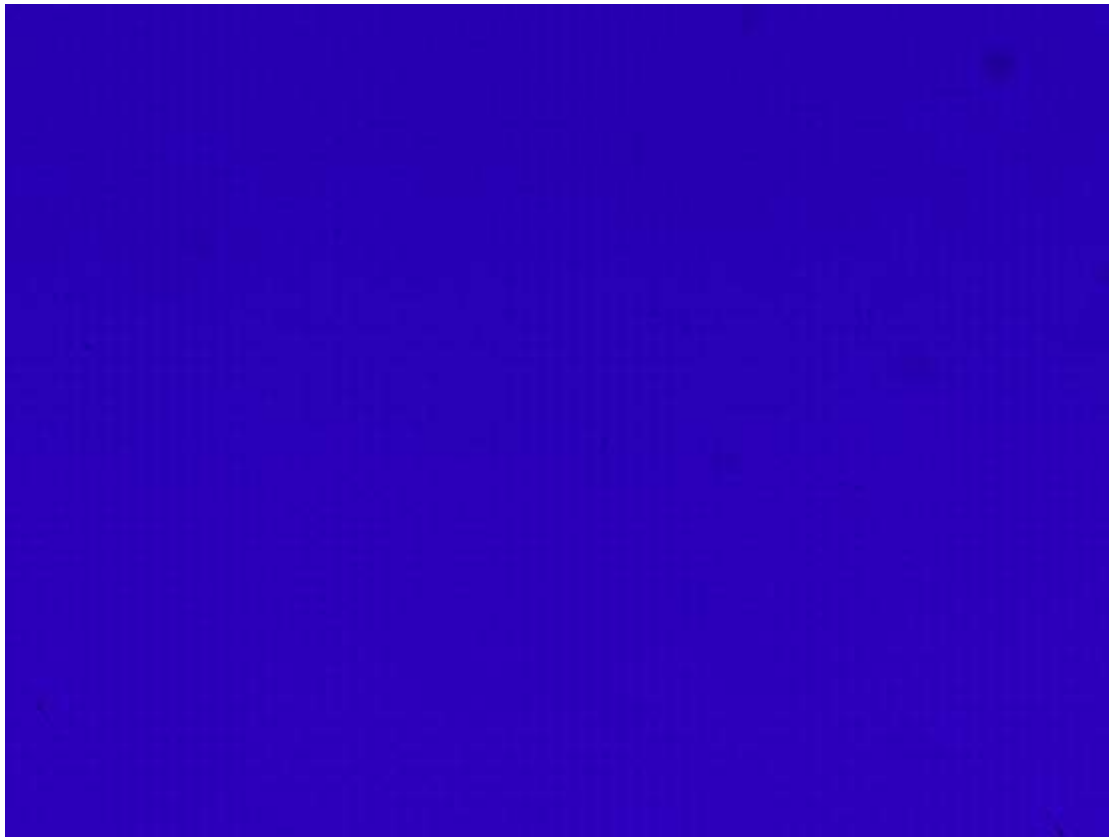
1. Εγχέουμε διάλυμα δέσμησης (blocking), βιοτίνη, και για 5 λεπτά παίρνουμε φωτογραφίες ανά 4 δευτερόλεπτα.
2. Εγχέουμε στρεπταβιδίνη με σκοπό να γίνει η αντίδραση πρόσδεσης, συνεχίζοντας να λαμβάνουμε φωτογραφίες για περίπου 1 ώρα.
3. Επεξεργαζόμαστε τις φωτογραφίες που λαμβάνουμε με τη βοήθεια δισδιάστατου μετασχηματισμού Fourier, μέσω της γλώσσας προγραμματισμού MatLab.

Η ροή με την οποία εγχέαμε τόσο το διάλυμα δέσμησης (blocking), όσο και τη στρεπταβιδίνη γινόταν με σταθερό ρυθμό 60μL/min, με τη βοήθεια ηλεκτρονικής αντλίας ελεγχόμενου ρυθμού έγχυσης. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για διάφορες συγκεντρώσεις στρεπταβιδίνης (0.5nM, 1nM, 2nM, 5nM, 10nM και 20nM). Επίσης, πρέπει να παρατηρήσουμε ότι οι φωτογραφίες ελήφθησαν για μήκη κύματος 425 - 475nm, με τη χρήση ειδικού μπλε φίλτρου και με την ένταση του φωτισμού στο μέγιστο ώστε να έχουμε κορεσμό.

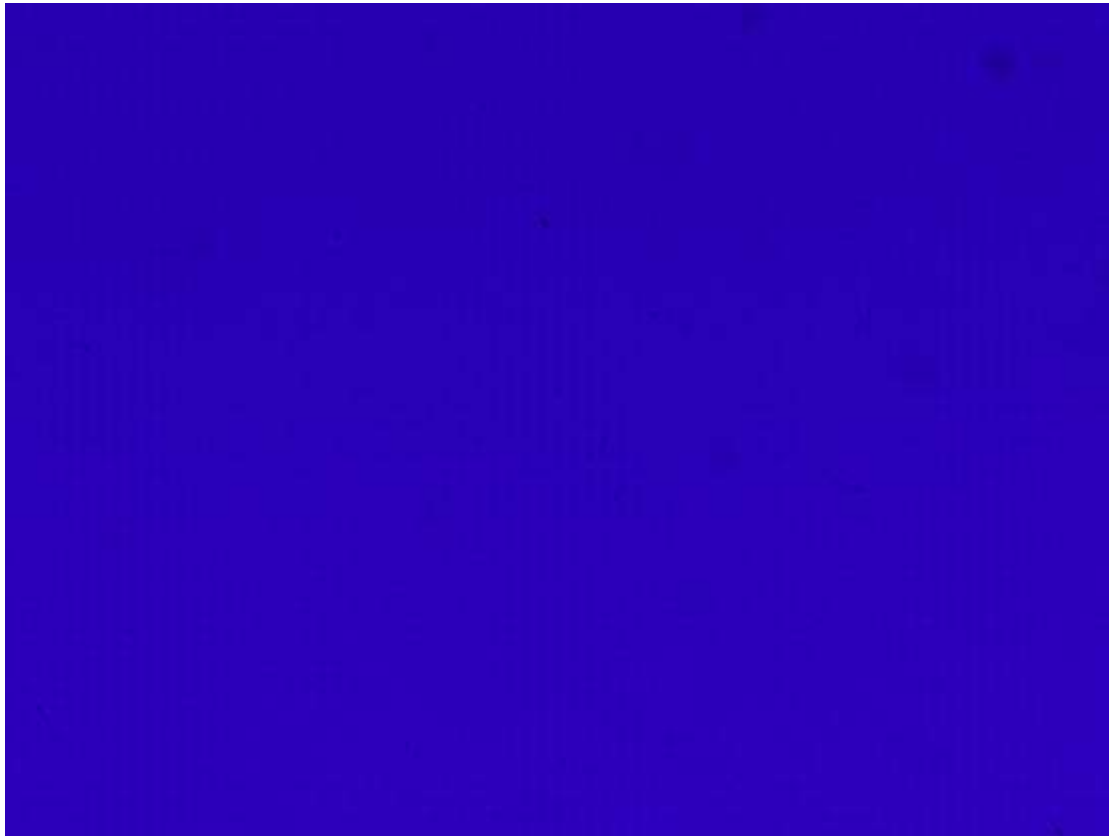
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παραθέτονται φωτογραφίες πριν την έγχυση στρεπταβιδίνης στο σύστημα και μετά. Η αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα μεταφράζεται ως μια ελάχιστη μεταβολή στην εικόνα, σαν θόλωμα. Τουλάχιστον αυτό μπορεί να αντιληφθεί κανείς με γυμνό μάτι και ύστερα από καλή παρατήρηση.

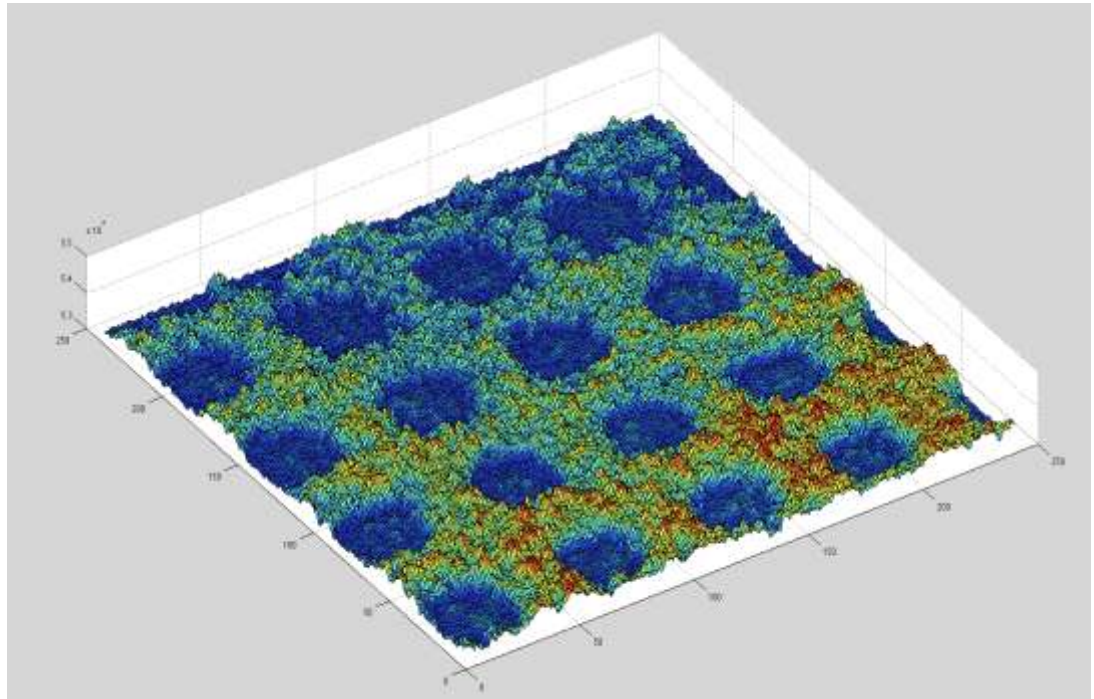


Εικόνα 6.1: Η φωτογραφία με το blocking, πριν την εισαγωγή στρεπταβιδίνης στο σύστημά μας

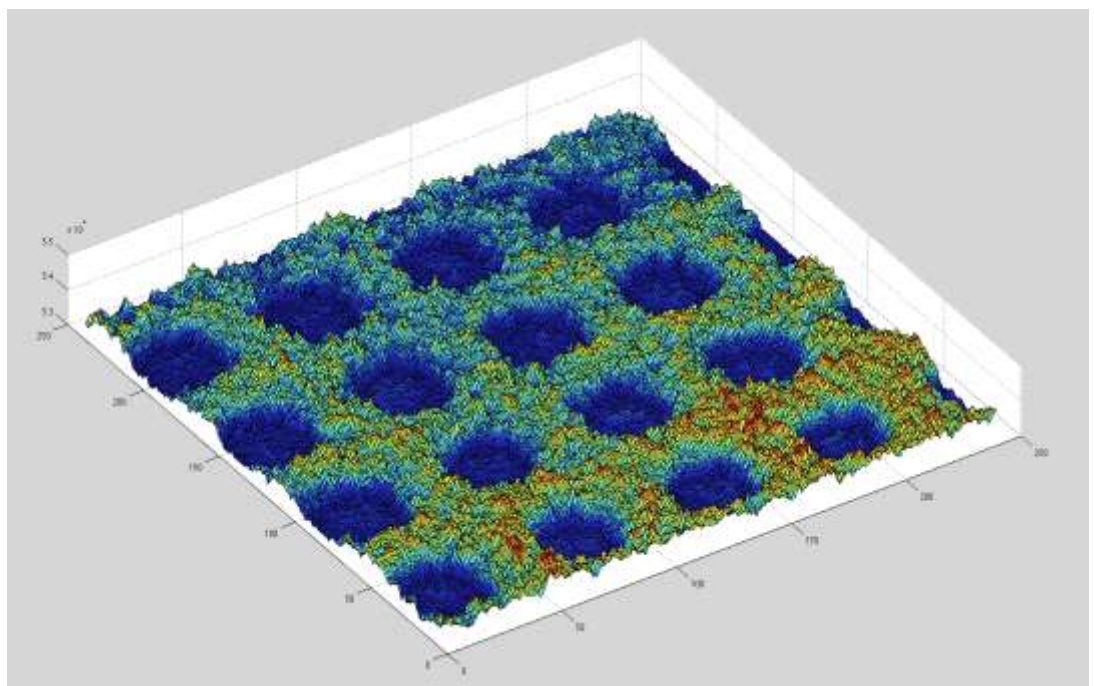


Εικόνα 6.2: Η εικόνα του συστήματός μας, μετά την εισαγωγή στρεπταβιδίνης και αφού έχει γίνει η αντίδραση πρόσδεσης.

Επειδή είναι προφανές πως με γυμνό μάτι είναι εξαιρετικά δύσκολη η παρατήρηση των διαφορών στην ανάκλαση ανάμεσα στις δυο φωτογραφίες, ακολουθούν οι ψηφιακά επεξεργασμένες μορφές τους στις οποίες είναι εμφανής η αλλαγή που έχει επέλθει με τη χημική αντίδραση.

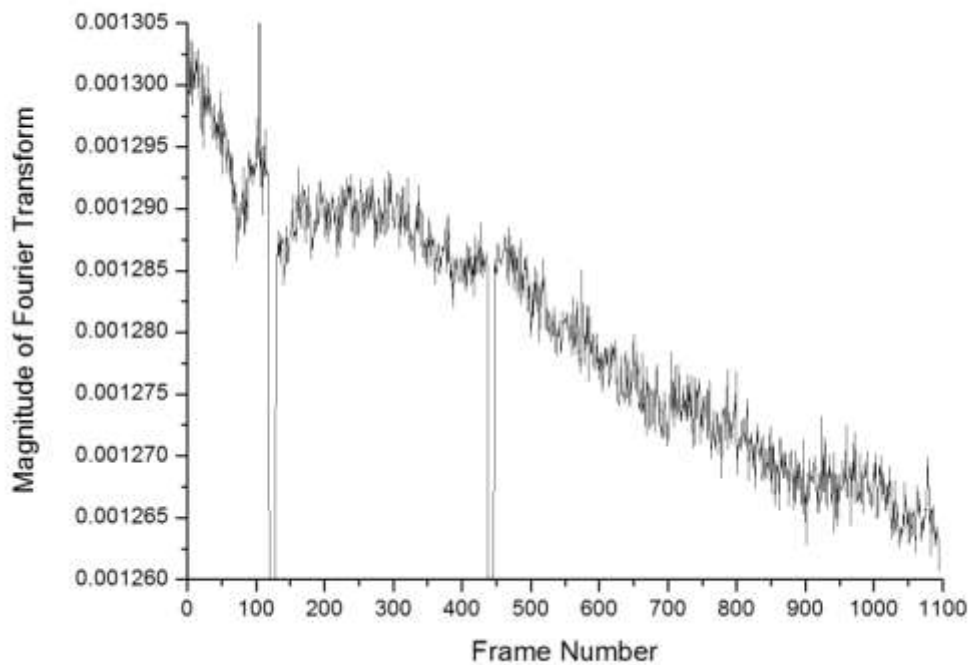


Εικόνα 6.3: Η φωτογραφία με το blocking, πριν την εισαγωγή στρεπταβιδίνης στο σύστημά μας

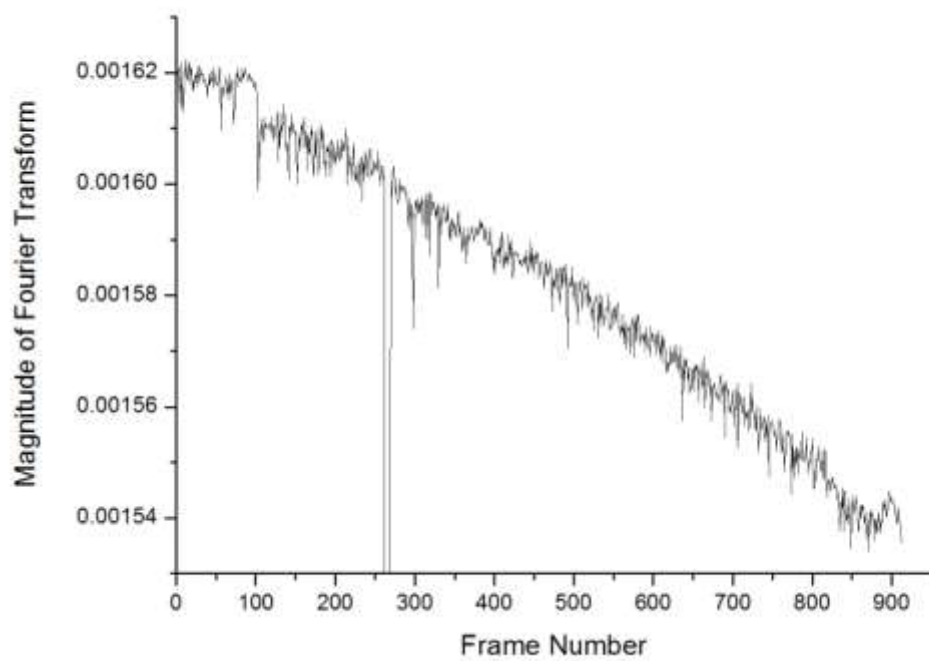


Εικόνα 6.4: Η εικόνα του συστήματός μας, μετά την εισαγωγή στρεπταβιδίνης και αφού έχει γίνει η αντίδραση πρόσδεσης.

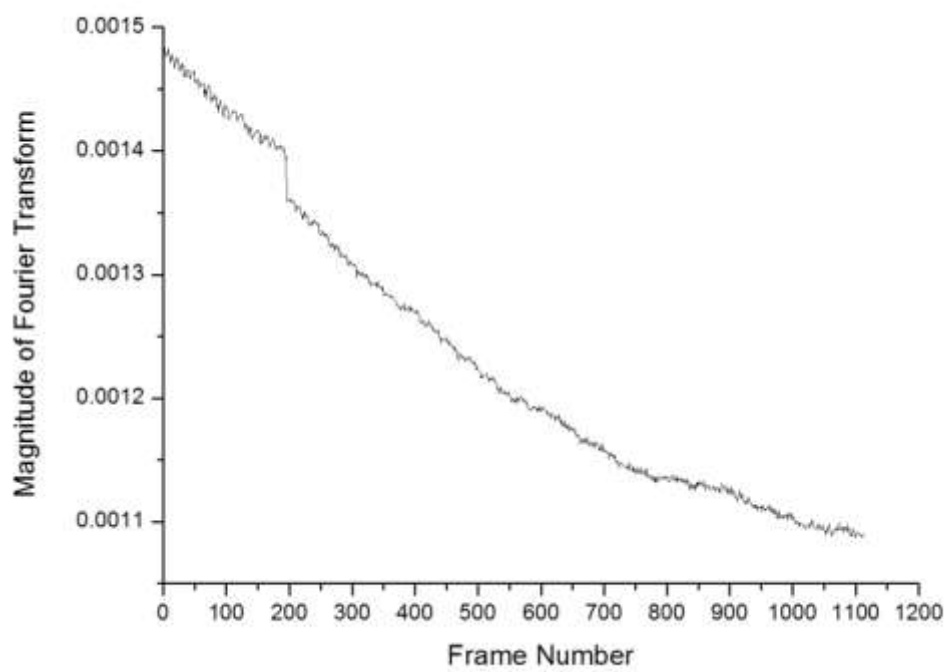
Στη συνέχεια παρατίθενται για κάθε συγκέντρωση, τα αποτελέσματα του μετασχηματισμού Fourier. Στον κάθετο άξονα είναι το μέγεθος του μετασχηματισμού Fourier που έχει απομονωθεί από την εξίσωση Fourier στη γεινίαση του αντίστροφου, της περιοδικότητας του πραγματικού χώρου, ενώ στον οριζόντιο είναι ο αριθμός των φωτογραφιών. Η προσθήκη στρεπταβιδίνης γίνεται στην εικόνα #100, όπου και παρατηρούμε την αρχή της αλλαγής της κλίσης.



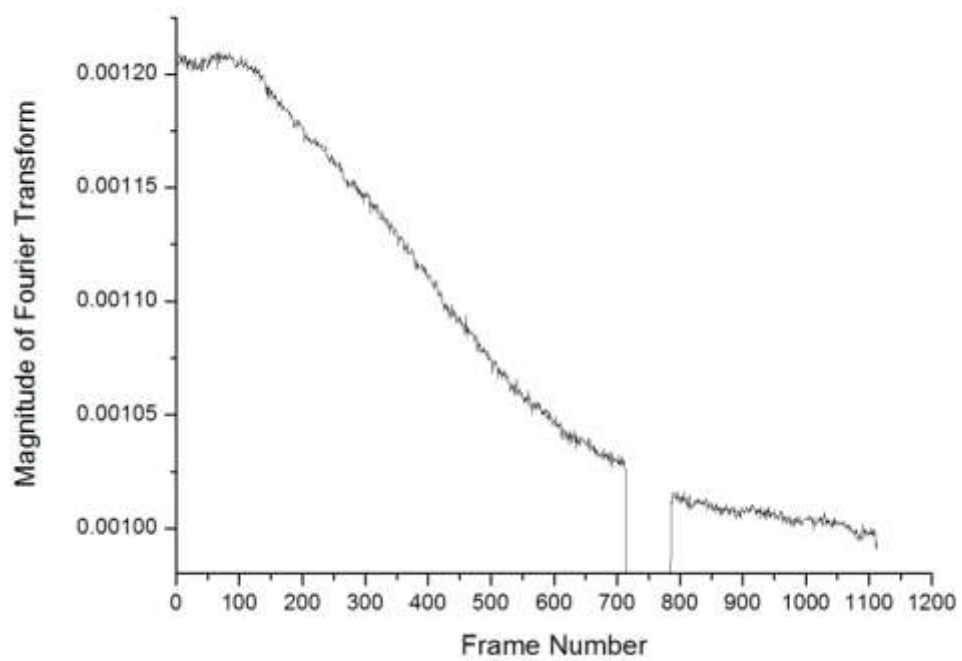
0.5nM



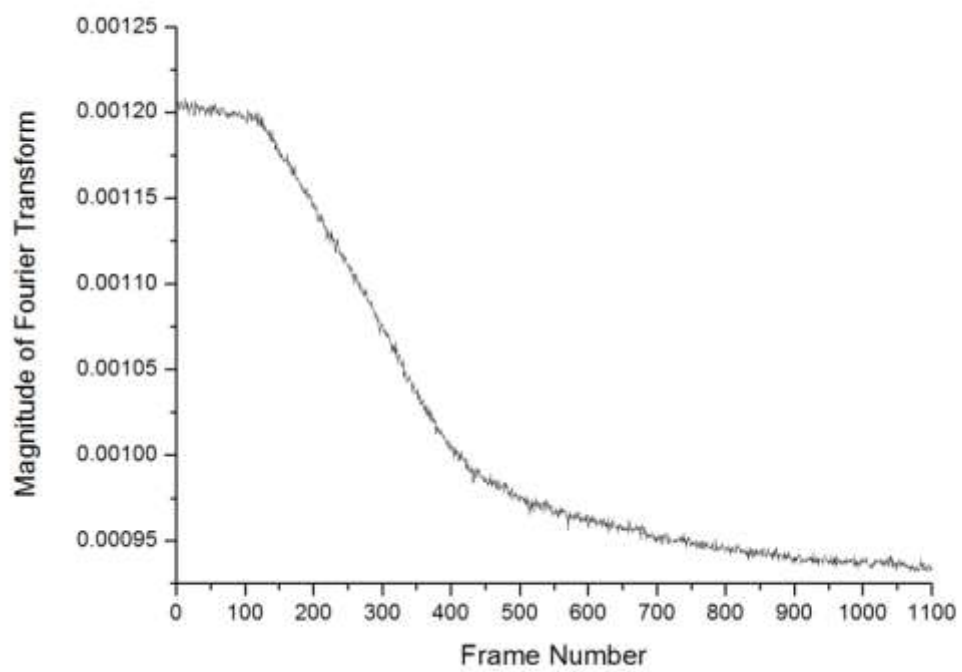
1nM



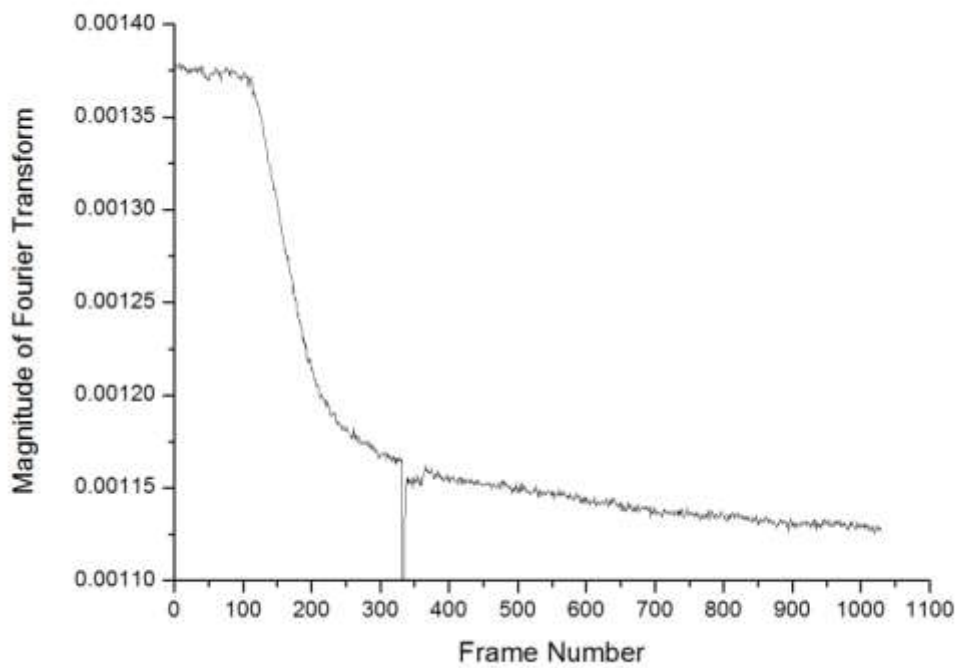
2nM



5nM

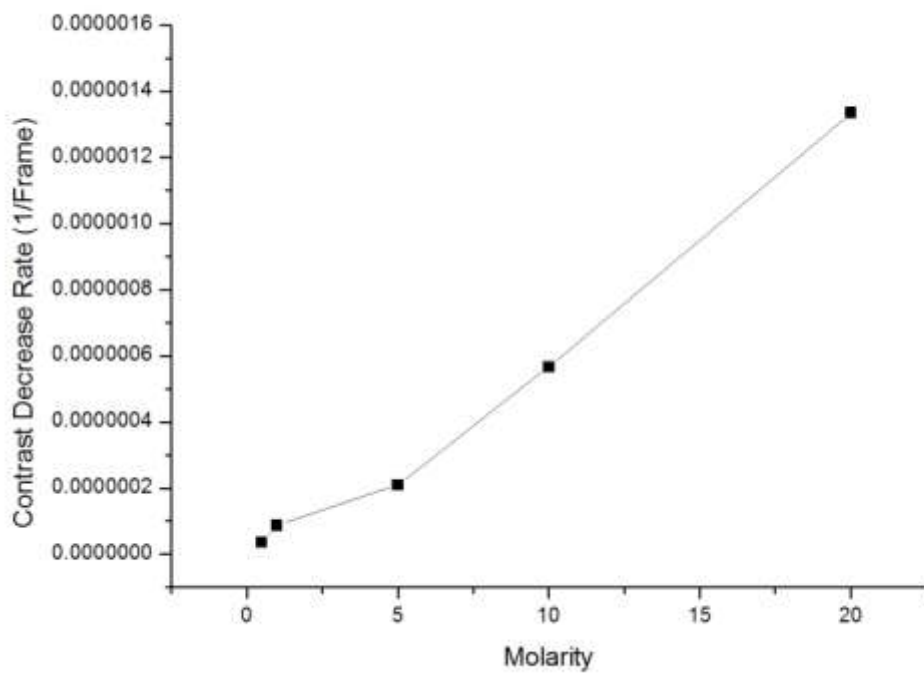


10nM



20nM

Στο επόμενο γράφημα φαίνεται η γραμμική σχέση του ρυθμού της πτώσης της αντίθεσης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση



6.2 Συζήτηση - Συμπεράσματα – Μελλοντικοί Στόχοι

Οι τεχνικές ανίχνευσης που δε βασίζονται στη χρήση ιχνηθετών είναι ιδιαίτερα ελκυστικές για την παρακολούθηση των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων. Αρκετές προσεγγίσεις άμεσης ανίχνευσης έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Η προτεινόμενη μεθοδολογία βασίζεται στην επεξεργασία εικόνων που λαμβάνουμε από μικροσκόπιο και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία μετρήσεων και σχετικά χαμηλό κόστος, μιας και αρκούν ένα μικροσκόπιο, μια φωτογραφική μηχανή και ένας υπολογιστής.

Η αρχή ανίχνευσης στηρίζεται στην παρακολούθηση της μεταβολής της αντίθεσης, η οποία προκαλείται από την αύξηση στο πάχος του πρωτεϊνικού στρώματος κατά τη διάρκεια μιας βιομοριακής αλληλεπίδρασης. Οι κατασκευαστικές διεργασίες που πραγματοποιήθηκαν για την κατασκευή του καναλιού ροής και της επιφάνειας του αισθητήρα είναι απλές διεργασίες πειραματικής προετοιμασίας. Η πειραματική διαδικασία έγχυσης των αντιδραστηρίων στα κανάλια ροής πραγματοποιήθηκε με αυτοματοποιημένο τρόπο, με τη χρήση της ηλεκτρονικής αντλίας ελεγχόμενης ροής. Το κόστος της μεθόδου μειώνεται αν αναλογιστούμε τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και τους μικρούς όγκους των αντιδραστηρίων. Τα τέσσερα κανάλια της διάταξής μας, μας δίνουν τη δυνατότητα παρακολούθησης τεσσάρων βιομοριακών αλληλεπιδράσεων σε διαδοχικούς χρόνους, κάτι το οποίο μας εξοικονομεί χρόνο.

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε ήταν ουσιαστικά μια βελτίωση της παρατήρησης ανοσοαντιδράσεων σε πραγματικό χρόνο, μέσω μικροσκοπίου. Η καινοτομία μας ήταν πως κάναμε χρήση μεθόδων μικροηλεκτρονικής με φωτολιθογραφία για να δημιουργήσουμε περιοδικές δομές στο δισκίο του πυριτίου. Μέχρι τώρα η μέθοδος που εφαρμόζοταν δεν περιελάμβανε περιοδικότητα και οι μεγάλες συγκεντρώσεις ήταν απαραίτητες για την ανίχνευση σήματος. Όμως, με την δημιουργία περιοδικών δομών στο δισκίο, δείξαμε πως ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορούμε να πάρουμε σήμα με εμφανή πτώση της αντίθεσης μπορεί να μελετηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζουμε σε τέτοιου είδους φωτογραφίες είναι και η κυλινδρική παραμόρφωση που οφείλεται στο οπτικό σύστημα φωτογραφικής μηχανής – ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Παρ' όλα αυτά με τη μέθοδό μας μέσω του μετασχηματισμού Fourier, παίρνουμε καθαρές κορυφές και αυτό γιατί ουσιαστικά, σαρώνουμε όλη την επιφάνεια της φωτογραφίας και όχι ένα τμήμα της. Επίσης, είναι σημαντικό να παρατηρήσουμε πως με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, επιτυγχάνουμε να πάρουμε ανάκλαση από την επιφάνεια του δισκίου, αποφεύγοντας τις λοιπές ανακλάσεις που

προκαλούνται για παράδειγμα από το γυαλί. Έτσι, έχουμε μια καθαρή εικόνα των διεργασιών πρόσδεσης που λαμβάνουν χώρα πάνω στην επιφάνεια του δισκίου.

Προφανώς η μέθοδος αυτή επιδέχεται πολλές βελτιώσεις ανάλογα με την εφαρμογή. Συγκεκριμένα ένας από τους μελλοντικούς στόχους μας είναι η βελτίωση του αλγορίθμου έτσι ώστε να μπορούμε να αφαιρούμε το θόρυβο και να έχουμε καθαρό σήμα αλλά και μια νέα διαμόρφωση του δισκίου, σε περισσότερες περιοχές, έτσι ώστε να έχουμε ταυτόχρονη μελέτη διαφορετικών βιομορίων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ο κώδικας που χρησιμοποιήσαμε για την επεξεργασία των εικόνων είναι ο ακόλουθος:

```
for i = 1:1:9  
    basename = 'frame000';    ending = '.tif';  
    filename = [ basename num2str(i) ending ];  
    fprintf('now reading %s \n', filename);  
    x = imread (filename);  
    y = abs(fft2(double(x(1:1:3072, 1:1:3072, 3))));  
    fourier(i, 1) = y(54,54)/y(1,1);  
    dlmwrite( [ filename, '_f.out' ], y(1:1:70,1:1:70), ');');  
end  
  
for i = 10:1:99  
    basename = 'frame00';    ending = '.tif';  
    filename = [ basename num2str(i) ending ];  
    fprintf('now reading %s \n', filename);  
    x = imread (filename);  
    y = abs(fft2(double(x(1:1:3072, 1:1:3072, 3))));  
    fourier(i, 1) = y(54,54)/y(1,1);  
    dlmwrite( [ filename, '_f.out' ], y(1:1:70,1:1:70), ');');  
end  
  
for i = 100:1:900  
    basename = 'frame0';    ending = '.tif';  
    filename = [ basename num2str(i) ending ];  
    fprintf('now reading %s\n', filename);  
    x = imread (filename);  
    y = abs(fft2(double(x(1:1:3072, 1:1:3072, 3))));  
    fourier(i, 1) = y(54,54)/y(1,1);  
    dlmwrite( [ filename, '_f.out' ], y(1:1:70,1:1:70), ');');  
end  
  
for i = 1000:1:1100
```

```
    basename = 'frame'; ending = '.tif';  
    filename = [ basename num2str(i) ending ];  
    fprintf('now reading %s\n', filename);  
    x = imread (filename);  
    y = abs(fft2(double(x(1:1:3072, 1:1:3072, 3))));  
    fourier(i, 1) = y(54,54)/y(1,1);  
    dlmwrite( [ filename, '_f.out' ], y(1:1:70,1:1:70), ';');  
end  
  
dlmwrite('fourier_contrast.out', fourier, ';');
```

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] M. Zavali, P.S. Petrou, S.E. Kakabakos, M. Kitsara, I. Raptis, K. Beltsios and K. Misiakos, Label-free kinetic study of biomolecular interactions by white light reflectance spectroscopy, *Micro Nano Lett.* **1** (2006)
- [2] Σημειώσεις μαθήματος «Βιονανοτεχνολογία για αίσθηση και οπτική απεικόνιση», Δ. Γιόβα, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα 2008
- [3] MatLab Image Processing Toolbox, 1993
- [4] MatLab Library
- [5] Heavens O. S., Optical Properties of Thins Solid Films, Dover Publications, New York, 1991
- [6] Alan V. Oppenheim, Ronald W. Schafer, Discrete- Time Signal Processing, Prentice Hall, 1999
- [7]http://users.uoi.gr/mprodrom/teaching_presentation/3_akinitopoiisi_enzimwn_amperometrikoi_bioaisthithires.pdf
- [8] “Immobilization of Ligand: Method 2 *Avidin-biotin Ligand Immobilization*”, SPREETA, Texas Instruments 2003, 1-6
- [9] Panagiota S. Petrou, Margarita Chatzichristidi, Antonios M. Douvas, Panagiotis Argitis, Konstantinos Misiakos, Sotirios Kakabakos, “A biomolecule friendly photolithographic process for fabrication of protein microarrays on polymeric films coated on silicon chips”, P.S.Petrou et al./Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 1994-2002
- [10] D.Goustouridis, K. Misiakos, P. S. Petrou and S. E. Kakabakos, “Protein patterning by micromachined silicon embossing on polymer surfaces”, Applied Physics Letters, Vol.85, Number 26, (2004)
- [11] William K. Pratt, Digital Image Processing: PIKS Inside, Third Edition, John Wiley & Sons Inc,(2001)
- [12] A. Erhardt-Ferron, Theory and Applications of Digital Image Processing, University of Applied Sciences Offenburg, <http://www.dip-seminar-online.com/>

[13] Κ. Κοτσοβός, «Σχεδιασμός – Μοντελοποίηση και Κατασκευή Φωτοβολταϊκών Στοιχείων Κρυσταλλικού Πυριτίου με Βάση Σημειακής Επαφής», Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Τομέας Ηλεκτρομαγνητικών Εφαρμογών Ηλεκτροοπτικής και Ηλεκτρονικών Υλικών.

[14] Σημειώσεις μαθήματος «Ημιαγώγιμα και Διηλεκτρικά Υλικά», Ε. Σκούρας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 2004

[15] <http://en.wikipedia.org/wiki/Antibodies>

[16] <http://el.science.wikia.com/wiki/Βιοαισθητήρας>

[17] Αριστείδης Νιώτης, «Ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού καρδιακών δεικτών με τη χρήση τριχοειδούς οπτικού ανοσοαισθητήρα», Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας.

[18] http://goodfood-project.org/www/train_Tutorials/Immunocomplex_based_biosensors.pdf

[19] <http://www.dddmag.com>

[20] Δ. Τσουκαλάς, Τεχνολογία Μικροσυστημάτων, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα 2004

[21] James D. Plummer, Michael D. Deal and Peter B. Griffin, Silicon VLSI technology: Fundamentals, Practice and modeling, Prentice Hall, Upper Saddle River, 2000

[22] Lee K.H., Su Y.D., Chen S.J., Tseng F.G., Lee G.B., “Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface Plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay”. Biosens. Bioelectron., 2007, 23, pp.466-472