



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

*Ανάπτυξη συστήματος lab on a chip για την ανίχνευση
βιολογικών δεικτών*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Σταμούλη Αναστασία

Επιβλέπων: Χατζανδρούλης Σταύρος

Αθήνα 2016



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ανάπτυξη συστήματος lab on a chip για την ανίχνευση
βιολογικών δεικτών

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Σταμούλη Αναστασία

Ερευνητικός Επιβλέπων: Χατζανδρούλης Σταύρος

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την
.....

.....

Αναστασία Σταμούλη

© (2016) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	1
Abstract	3
Εισαγωγή	5
Κεφάλαιο 1: Γραφένιο.....	7
1.1 Ο άνθρακας και οι αλλότροπες μορφές του	7
1.2 Οι ιδιότητες του γραφενίου	9
1.3 Τρανζίστορ γραφενίου	10
1.4 Παρασκευή και απομόνωση γραφενίου/Μέθοδοι σύνθεσης.....	11
Κεφάλαιο 2: Ανιχνευτές με βάση το γραφένιο	15
2.1 Τρανζίστορ με βάση το γραφένιο.....	15
2.2 Νανοηλεκτρονικοί βιοαισθητήρες με βάση το γραφένιο αναπτυγμένο με CVD για την ανίχνευση γλυκόζης	16
2.3 Τρανζίστορ με διάφανο, ευέλικτο φιλμ με ανηγμένο οξείδιο γραφενίου	18
2.4 Ανίχνευση ανοσοσφαιρίνης με βάση μη επισημασμένο απταμερές χρησιμοποιώντας FET	20
Κεφάλαιο 3: Μικροροϊκά ενσωματωμένα σε βιοαισθητήρες για ανίχνευση βιολογικών δεικτών	23
3.1 Βιοαισθητήρες.....	24
3.1.1 Κατηγοροποιημένοι βιοαισθητήρες με βάση τον τύπο του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης και τις τεχνικές ακινητοποίησης.	24
3.1.2 Κατηγοροποιημένοι Βιοαισθητήρες με βάση τον τύπο των μετατροπών.....	26
3.2 Μικροροϊκά Συστήματα	28
3.3 Ενσωμάτωση μικροροϊκών συστημάτων στη τεχνολογία των βιοανιχνευτών	29
3.3.1 Βιοανιχνευτές με βάση τα μικροροϊκά συνεχούς ροής	29
3.3.2 Βιοανιχνευτές με μικροροϊκά σταγονιδίων	31
3.3.3 Βιοανιχνευτές με ψηφιακά μικροροϊκά.....	33
Κεφάλαιο 4: Lab on a chip.....	40
Κεφάλαιο 5: Αισθητήρας πυριτίου Si.....	44
5.1 Χημική τροποποίηση υποστρώματος SiO ₂	44
5.2 Εναπόθεση σταγόνων biotin-streptavidin σε υπόστρωμα SiO ₂ με graphene oxide 5mg/ml	47
Κεφάλαιο 6: Ανάπτυξη PCB LoC.....	52
6.1 Σχεδιασμός lab on a chip μέσω του προγράμματος kicad.....	52
6.1.1. Κατασκευή της πρώτης lab –on–chip διάταξης.....	52

6.1.2. Κατασκευή μιας lab-on-chip διάταξης μικρών διαστάσεων για την πραγματοποίηση των πρώτων πειραμάτων	55
6.2 Προετοιμασία του lab on a chip.....	56
6.2.1. Καθαρισμός	56
6.2.2. Λιθογραφία	56
6.2.3. Σφράγιση	58
Κεφάλαιο 7: Χαρακτηρισμός LoC.....	62
7.1 Απόκριση του lab on a chip σε συνεχή ροή με phosphate buffer διαφορετικών pH ...	62
7.2 Απόκριση του lab on a chip σε συνεχή ροή με βιολογικά δείγματα	64
Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα και Μελλοντική εργασία.....	68
8.1 Συμπεράσματα	68
8.2 Μελλοντική Εργασία	70
Βιβλιογραφία	72

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (INN) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος. Το κύριο μέρος της εργασίας αυτής είναι η ανάπτυξη συστήματος lab on a chip για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών. Επίσης, σημαντικό μέρος αποτελεί η ανίχνευση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού (phosphate buffer) μέσω της συσκευής lab on a chip.

Πιο αναλυτικά, το πρώτο κεφάλαιο της μεταπτυχιακής εργασίας αποτελεί μία εισαγωγή στο γραφένιο και στο οξείδιο γραφενίου όπου δίνει απαντήσεις στο πότε ανακαλύφθηκε, τι είναι, τι ιδιότητες έχει, πως παρασκευάζεται, ποια είναι η δομή του και γίνεται αναφορά στα κυρίαρχα είδη υλικών γραφενίου που χρησιμοποιούνται στους ηλεκτρονικούς αισθητήρες. Επίσης, γίνεται αναφορά το οξείδιο γραφενίου και στις διαφορές όσον αφορά τη δομή του ως προς το γραφένιο.

Στη συνέχεια, στο δεύτερο κεφάλαιο, περιγράφονται τα τρανζίστορες γραφενίου τα οποία λειτουργούν ως ανιχνευτές. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται οι νανοηλεκτρονικοί βιοαισθητήρες με βάση το γραφένιο ανεπτυγμένο με χημική εναπόθεση ατμού (CVD), τρανζίστορες με οξείδιο γραφενίου και η ανίχνευση ανοσοσφαιρίνης χρησιμοποιώντας FET.

Στο τρίτο κεφάλαιο, γίνεται αναφορά στα μικροροϊκά συστήματα που ενσωματώνονται σε βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών. Αναλυτικά, παρουσιάζονται οι βιοαισθητήρες και αναφέρονται οι διάφορες κατηγορίες τους. Η πρώτη κατηγορία είναι με βάση τον τύπο του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης και η δεύτερη με βάση τον τύπο των μετατροπέων. Τέλος, γίνεται λόγος για τους βιοανιχνευτές με βάση τα μικροροϊκά συνεχούς ροής, με βάση τα σταγονίδια και με ψηφιακά μικροροϊκά.

Το τέταρτο κεφάλαιο περιλαμβάνει τη χρησιμότητα των lab on a chip κυρίως στον τομέα της ιατρικής και τα στοιχεία από τα οποία αποτελείται. Ενώ, στο τέλος παρουσιάζεται η διάταξη που κατασκευάστηκε από την ερευνητική ομάδα του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας.

Στο πέμπτο κεφάλαιο αναλύεται η χημική τροποποίηση του Si/SiO₂. Συγκεκριμένα, έγιναν προσπάθειες υδροφιλοποίησης του δείγματος με plasma O₂ και plasma O₂ σε συνδυασμό με APTES. Επιπλέον, έγιναν δοκιμές υδροφιλοποίησης αρχικά με plasma O₂ και έπειτα με GOPTS, με plasma O₂ και HDMS(bake/no bake) και τέλος χωρίς τροποποίηση του δείγματος. Στη συνέχεια αυτού το κεφαλαίου, παρατίθενται τα αποτελέσματα της μεταβολής της αντίστασης μετά την προσθήκη της βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης σε στρώμα graphene oxide 0.5% w/v.

Στο έκτο κεφάλαιο σχολιάζεται η διαδικασία δημιουργίας μιας συσκευής lab on a chip μέσω του προγράμματος σχεδίασης kicad. Έπειτα, παρουσιάζεται αναλυτικά η προετοιμασία του καθαρισμού και η διεξαγωγή της μονής και διπλής λιθογραφίας. Στο τελευταίο κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συσκευής lab on a chip μετά την ανίχνευση της βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης από τους βιοαισθητήρες.

Λέξεις-κλειδιά: lab on a chip, αισθητήρες, μικροροϊκά συστήματα

Abstract

This thesis took place in the Institute of Nanoscience and Nanotechnology (INN) of NCSR “Democritos”. The main part of the thesis is the development of lab on a chip system for detecting biomarkers. Also, an important part is the detection of the phosphate buffer via the lab on a chip device.

More specifically, the first chapter of this thesis is an introduction to graphene, handling various questions like how it was discovered, what it is, what properties it has, how it is produced, what is the structure of graphene and there are references about the dominant species of graphene materials used in electronic sensors. Also, the graphene oxide is described, the differences between graphene oxide and graphene are analyzed

In the second chapter, the graphene transistors that function as probes are described. In particular, nanoelectronic biosensors based on CVD grown graphene, graphene oxide based transistors and immunoglobulin detection using FET are indicated.

In the third chapter, there are references about the microfluidic systems that are integrated into biosensors for detecting biomarkers. Biosensors are introduced and their categories are described. The first category is based on the type of biological recognition element and the second one is based on the type of transducers. Finally, there are biosensors based on the microfluidic flow, droplet-based microfluidics and on digital microfluidics.

The fourth chapter depicts the benefits of the lab on a chip in medicine and the elements it is consisted of. In the end, the device that was manufactured by the research group of the Institute is presented.

In the fifth chapter the chemical modification of Si/ SiO₂ is analyzed. Specifically, attempts were made to hydrophilize the sample with plasma O₂ and plasma O₂ in combination with APTES. Moreover, hydrophilizing tests were performed by using initially plasma O₂ and GOPTS, later by using plasma O₂ and HDMS(bake / no bake) and finally without any change in the sample. In the end of the capital, the results of the change in resistance after the addition of biotin and streptavidine in layer graphene oxide 0.5% w/v are presented.

In the sixth chapter, the process of designing a lab on a chip device through design program kicad is outlined. Finally, the preparation of cleaning and implementation of single- and double- lithography are showed in detail. In the last capital, the results of the lab on a chip device after the detection of biotin and streptavidine by biosensors are presented.

Keywords: lab on a chip, biosensors, microfluidics

Εισαγωγή

Λόγω των γρήγορων εξελίξεων τα τελευταία χρόνια, το μικροροϊκό σύστημα έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο για βιολογικές αναλύσεις. Η προετοιμασία δείγματος, ο χειρισμός του δείγματος, ο διαχωρισμός, η αντίδραση και η ανίχνευση μπορούν να ενσωματωθούν σε μία ενιαία πλατφόρμα. Τα μικροροϊκά συστήματα υπόσχονται οφέλη στις βιοχημικές αναλύσεις με υψηλές επιδόσεις, ευελιξία, χρήση μικρών δειγμάτων, φορητότητα και γρήγορη επεξεργασία. Αυτή ήταν μία σημαντική πρόκληση για την κατασκευή ενός μικροροϊκού chip.

Μια εναλλακτική προσέγγιση για την κατασκευή μικροροϊκών συσκευών είναι με τη χρήση μίας πλακέτας τυπωμένου κυκλώματος (printed circuit board, PCB) για ολοκληρωμένο ηλεκτρονικό έλεγχο και μείωση του κόστους. Τα PCBs κατασκευάζονται σε μεγάλες ποσότητες με υψηλή ακρίβεια και εύκολα ενσωματώνονται με λειτουργικά στοιχεία, κάνοντάς την μία ελκυστική πλατφόρμα για ολοκληρωμένα μικροροϊκά.

Οι μικροροϊκές συσκευές χαρακτηρίζονται τυπικά από δομές έχοντας μικρό μέγεθος καθώς τα chips έχουν μέγεθος μερικών εκατοστών. Επιπλέον, οι περισσότερες μικροροϊκές συσκευές απαιτούν πολλές διαφορετικές τεχνολογίες και υλικά όπως ηλεκτρόδια, βαλβίδες, αντλίες, θερμαντήρες, ανιχνευτές.

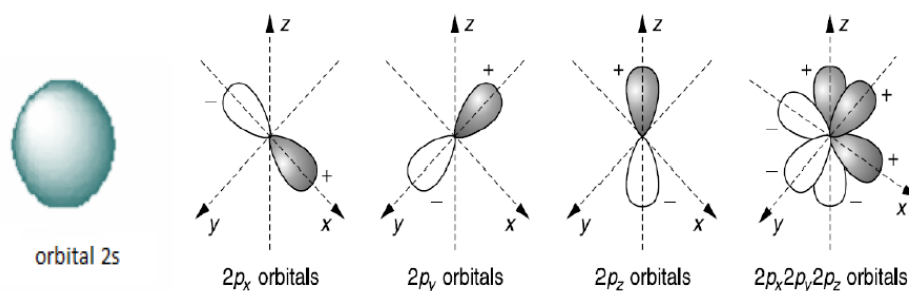
Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την ανίχνευση των βιομορίων είχαν επιστήσει την προσοχή για κλινικές διαγνώσεις και φαρμακαυτικές εφαρμογές κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας. Χρησιμοποιούσαν καινοτόμες συσκευές νανοϋλικών, όπως νανισύρματα πυριτίου και νανοσωλήνες άνθρακα. Αν και τα τρανζίστορ με νανοσωλήνες άνθρακα ήταν ένας από τους υποσχόμενους υποψήφιους για ανίχνευση υπήρχαν εμπόδια όπως ότι μπορούν να ανιχνεύσουν μόνο θετικά φορτισμένα είδη.

Το γραφένιο είναι ένα υλικό το οποίο μπορεί να λύσει τα προβλήματα των CNT-FETs. Το γραφένιο έχει εξαιρετικά υψηλή κινητικότητα φορέων με μεγάλη συγκέντρωση και χημική σταθερότητα. Τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά του είναι πολύ ευαίσθητα στις διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τύπους αισθητήρων.

Κεφάλαιο 1: Γραφένιο

1.1 Ο άνθρακας και οι αλλότροπες μορφές του

Ο άνθρακας είναι πρωταρχικό υλικό για τη ζωή και αποτελεί βάση όλης της οργανικής χημείας. Η ηλεκτρονιακή διάταξη της βασικής κατάστασης του άνθρακα είναι η εξής: $1s^2 2s^2 2p^2$. Το $1s^2$ τροχιακό περιλαμβάνει δύο ισχυρά συνδεδεμένα ηλεκτρόνια, τα οποία καλούνται πυρηνικά ηλεκτρόνια. Επίσης, τέσσερα ηλεκτρόνια καταλαμβάνουν τα $2s^2$, $2p^2$ ατομικά τροχιακά τα οποία είναι πιο ασθενώς συνδεδεμένα. Τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στοιβάδων κατανέμονται στα $2s$, $2p_x$, $2p_y$ και $2p_z$ τροχιακά τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών στα ανθρακικά υλικά. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του ατόμου του άνθρακα είναι η ικανότητα του να συνδέεται με άλλα άτομα άνθρακα σχηματίζοντας αλυσίδες και δακτυλίους. Φαίνεται λοιπόν ότι ο άνθρακας μπορεί να σχηματίσει δύο ισοδύναμους δεσμούς αφού έχει δύο μόνο ελεύθερα ηλεκτρόνια στο τελευταίο τροχιακό του.



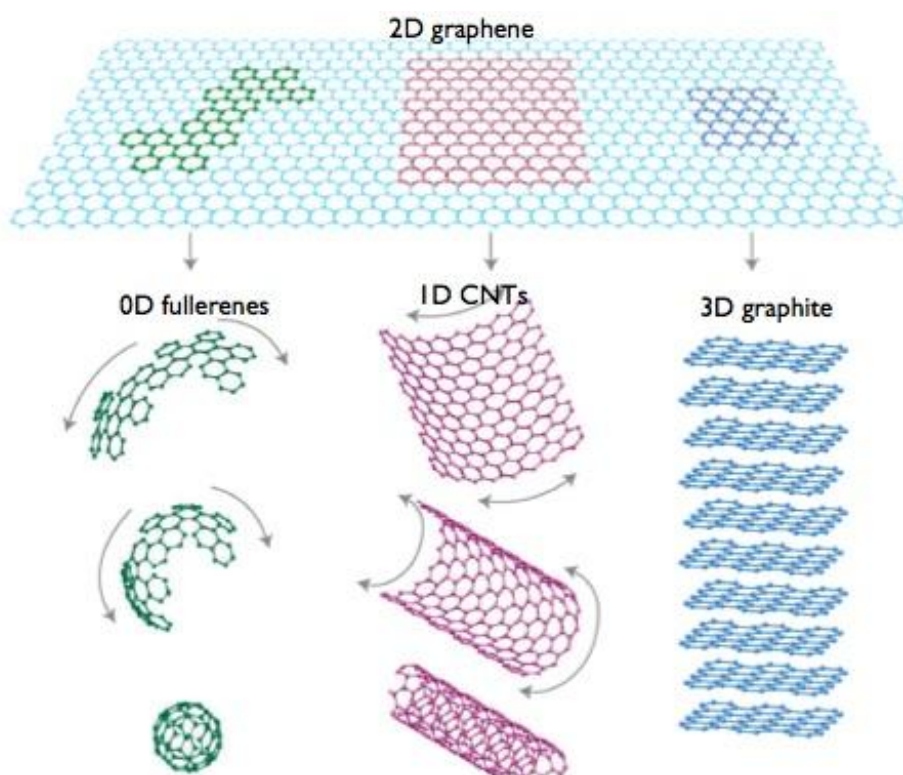
Σχήμα 1: Απεικόνιση των s και p τροχιακών στη στοιβάδα σθένους του άνθρακα. [2]

Λόγω της ευελιξίας των δεσμών, τα συστήματα με βάση τον άνθρακα δείχνουν έναν απεριόριστο αριθμό διαφορετικών δομών με μία μεγάλη ποικιλία φυσικών ιδιοτήτων. Οι φυσικές ιδιότητες, σε μεγάλο βαθμό, είναι αποτέλεσμα των διαστάσεων αυτών των δομών. Οι τέσσερις αλλότροπες μορφές του άνθρακα είναι το διαμάντι, ο γραφίτης, το φουλερένιο και οι νανοσωλήνες άνθρακα.

Μεταξύ των συστημάτων με μόνο άτομα άνθρακα, το γραφένιο, ένα διδιάστατο(2D) αλλότροπο του άνθρακα, παίζει ένα σημαντικό ρόλο και αποτελεί τη βάση για την κατανόηση των ηλεκτρονικών ιδιοτήτων των άλλων αλλότροπων. Αποτελείται από άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δομή κυψελίδας, διαμορφωμένη από εξάγωνα και μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δακτυλίους βενζολίου απογυμνωμένοι από άτομα υδρογόνου. Το ατομικό πάχος του φύλλου γραφενίου το οποίο ισούται με το μέγεθος του ατόμου του άνθρακα, είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε οποιαδήποτε μεταβολή του περιβάλλοντος, κάνοντάς το ιδανικό ως κανάλι σε τρανζίστορ πεδίου, δημιουργώντας μ' αυτό τον τρόπο έναν ηλεκτρονικό αισθητήρα.

Αρχικά, στο διαμάντι τα άτομα άνθρακα συνδέονται μεταξύ τους τετραεδρικά(sp^3 υβριρισμός) με άλλα τέσσερα άτομα άνθρακα. Τα φουλερένια είναι

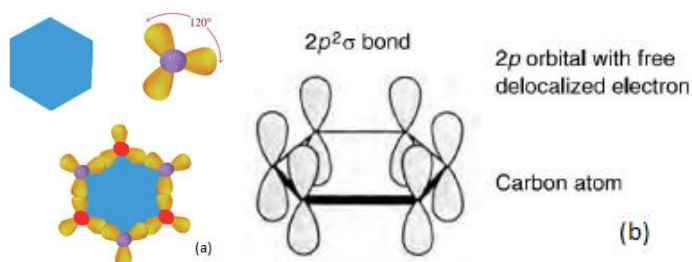
μόρια όπου τα άτομα άνθρακα δημιουργούν μία σφαιρική δομή. Αποτελείται από εξήντα άνθρακες. Όμως, όσον αφορά τη φυσική, τα φουλερένια είναι μηδενικής διάστασης με διακριτές ενεργειακές στάθμες. Επιπλέον, δημιουργούνται από άτομα γραφένιου σε δομή πεντάγωνου και εξάγωνου και μπορεί να θεωρείται ως τυλιγμένο γραφένιο. Οι νανοσωλήνες άνθρακα μπορούν να ληφθούν από «τυλιγμένο» γραφένιο κατά μήκος μιας διεύθυνσης. Ως εκ τούτου αποτελούνται από εξάγωνα και μπορούν να θεωρηθούν δομές μιας διάστασης(1D). Αυτά τα κυλινδρικά μόρια διαθέτουν εξαιρετικές ιδιότητες (μηχανική αντοχή, αγωγοί ή ημιαγωγοί ανάλογα με τη διαμόρφωση της κρυσταλλικής τους δομής) που τα καθιστούν χρήσιμα σε πολλές εφαρμογές στον τομέα της νανοτεχνολογίας, των ηλεκτρονικών, της οπτικής καθώς και σε άλλους τομείς της επιστήμης των υλικών. Ο γραφίτης είναι ένα αλλότροπο του άνθρακα τριών διαστάσεων που έχει πολυστρωματική δομή. Κάθε στρώμα αποτελείται από άτομα άνθρακα συνδεδεμένα με άλλα τρία (sp^2 υβριδισμός) άτομα γραφίτη δημιουργώντας εξαγωνική δομή απέχοντας μεταξύ τους 0.142 nm. Οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ των ατόμων άνθρακα είναι ομοιοπολικοί. Ο γραφίτης σε αντίθεση με το διαμάντι είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού λόγω των απεντοπισμένων τροχιακών μέσα σε κάθε στρώμα.



Σχήμα 2: Απεικόνιση του γραφενίου, του πρωταρχικού υλικού για το σχηματισμό των φουλερενίων, των νανοσωλήνων άνθρακα και του γραφίτη.

Στο γραφένιο, τα $2s$ ατομικά τροχιακά αλληλεπιδρούν με τα $2p_x$ και $2p_y$ σχηματίζοντας τρία sp^2 υβριδισμένα τροχιακά. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό τριών σ δεσμών στους οποίους τα ηλεκτρόνια βρίσκονται εντοπισμένα κατά μήκος του επιπέδου ενώνοντας τα με γειτονικά ανθρακικά άτομα και προσδίδουν στο γραφένιο τις εξαιρετικές μηχανικές του ιδιότητες. Τα $2p_z$ ηλεκτρόνια

σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς, τους π δεσμούς, ενώ το ‘ηλεκτρονιακό νέφος’ κατανέμεται κανονικά στο επίπεδο που ενώνονται τα άτομα άνθρακα. [1][3]



Σχήμα 3: Η sp^2 υβριδική δομή ενός ενιαίου εξαγωνικού μοριακού πλαισίου του γραφίτη.

1.2 Οι ιδιότητες του γραφενίου

Το γραφένιο μεγάλης επιφάνειας είναι ένα ημιμέταλλο με μηδενικό ενεργειακό χάσμα. Οι ζώνες σθένους και αγωγιμότητας κωνικού σχήματος έχουν σημείο τομής το σημείο K της ζώνης Brillouin. Επειδή το ενεργειακό χάσμα είναι μηδενικό, οι συσκευές με κανάλια γραφενίου μεγάλης έκτασης δεν μπορούν να απενεργοποιηθούν με αποτέλεσμα να μην είναι κατάλληλα για λογικές εφαρμογές. Ωστόσο, η δομή ζωνών του γραφενίου μπορεί να τροποποιηθεί και να δημιουργηθεί χάσμα με τρεις τρόπους:

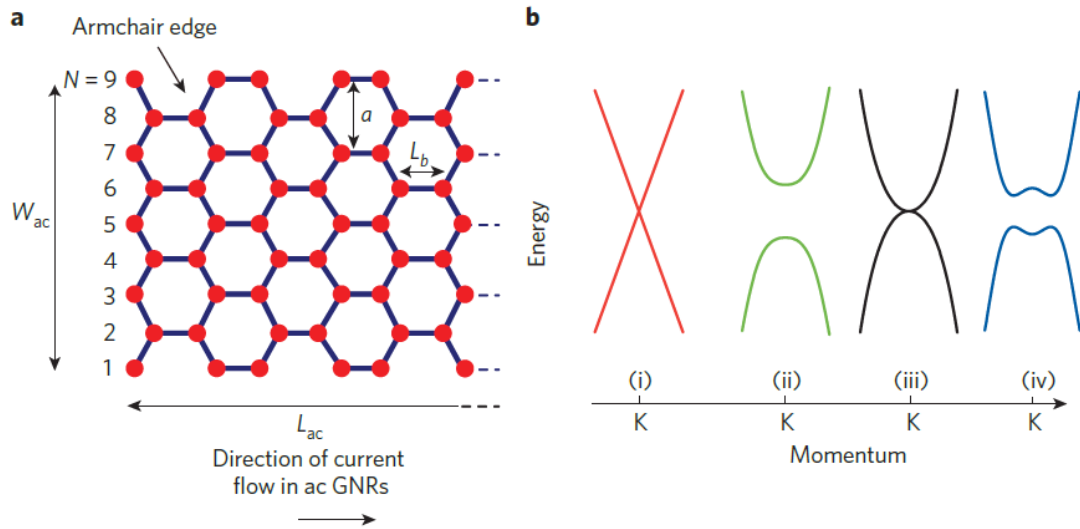
- 1) περιορίζοντας το γραφένιο μεγάλης έκτασης σε μία διάσταση σχηματίζοντας nanoribbons γραφενίου,
- 2) πολώνοντας το bilayer graphene
- 3) εφαρμόζοντας δύναμη στο γραφένιο

Το ενεργειακό χάσμα ενός μονοατομικού επιταξιακού γραφενίου μεγάλης επιφάνειας θεωρείται μηδέν, όμως άλλοι αναφέρουν ότι είναι γύρω στα 0.25 eV. Οι χαρακτηριστικές μεταφορές των MOSFETs επιταξιακού γραφενίου δείχνουν μη απενεργοποίηση το οποίο παραπέμπει σε μηδενικό χάσμα.

Τα armchair nanoribbons και τα zigzag nanoribbons έχουν ενεργειακό χάσμα αντιστρόφως ανάλογο του πλάτους του nanoribbon. Η δημιουργία χάσματος στα nanoribbons έχει επιβεβαιωθεί για πλάτη κάτω του 1nm. Η θεωρία και τα πειράματα απέδειξαν χάσματα πάνω των 200meV για πλάτη κάτω των 20nm. Γενικά, όσο μεγαλύτερο ενεργειακό χάσμα δημιουργηθεί τόσο περισσότερο οι ζώνες σθένους και αγωγιμότητας θα γίνουν παραβολικές (σχήμα κώνου) με αποτέλεσμα τη μείωση της καμπυλότητας γύρω από το σημείο K και αύξηση της μάζας των φορτισμένων φορέων το οποίο μειώνει τη κινητικότητα.

Το bilayer graphene είναι επίσης χωρίς ενεργειακό χάσμα και οι ζώνες σθένους και αγωγιμότητας είναι εξίσου παραβολικές κοντά στο σημείο K. Όμως, αν ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμοστεί κάθετα στο bilayer, ένα χάσμα δημιουργείται και οι ζώνες στο σημείο K παίρνουν το σχήμα μεξικάνικου καπέλου. Έρευνες έχουν δείξει

ότι το μέγεθος του χάσματος εξαρτάται από τη δύναμη του κάθετου πεδίου και φθάνει σε τιμές των 200-250meV για υψηλά πεδία($1-3 \times 10^7 \text{ V cm}^{-1}$).



Σχήμα 4: (a) Σχήμα του armchair (ac) graphene nanoribbon of length L_{ac} and width W_{ac} , (b) Δομή ζωνών γύρω από το σημείο K (i) γραφενίου μεγάλης επιφάνειας (ii) nanoribbons graphene (iii) unbiased bilayer (iv) bilayer graphene με εφαρμοσμένο κάθετο πεδίο

1.3 Τρανζίστορ γραφενίου

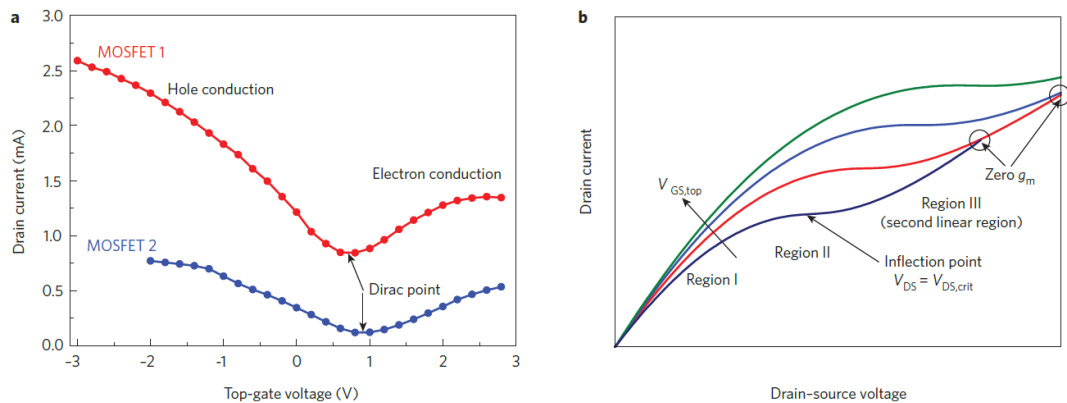
Μία συσκευή γραφενίου ήταν το αποτέλεσμα μιας ερευνητικής ομάδας από το Manchester το 2004. Ένα στρώμα SiO_2 300nm κάτω από το γραφένιο λειτουργεί ως back-gate διηλεκτρικό και ένα ενισχυμένο υπόστρωμα πυριτίου δρα ως back gate, αν και δεν μπορούν να ενσωματωθούν με άλλα στοιχεία. Γι' αυτό δημιουργήθηκαν τα top-gated transistors. Το πρώτο MOSFET γραφενίου με top-gated δημοσιεύτηκε το 2007. [4]

Τα top-gated MOSFETs γραφενίου μπορούν να κατασκευαστούν με αποφλοιώση γραφενίου, με γραφένιο αναπτυγμένο σε μέταλλα όπως το νικέλιο και ο χαλκός, με θερμική αποσύνθεση του SiC για την παραγωγή του λεγόμενου επιταξιακού γραφενίου στο επάνω μέρος των στρωμάτων SiC. Τα SiO_2 , Al_2O_3 και το HfO_2 έχουν χρησιμοποιηθεί ως top-gated διηλεκτρικά. Τα κανάλια αυτών των top-gated τρανζίστορς γραφενίου έχουν γίνει με γραφένιο μεγάλης έκτασης, το οποίο δεν έχει ενεργειακό χάσμα, καθιστώντας το ακατάλληλο για απενεργοποίηση.

Τα παραπάνω τρανζίστορς έχουν μία μοναδική χαρακτηριστική μεταφοράς ρεύματος-τάσης. Η πυκνότητα των φορέων και ο τύπος τους (ηλεκτρόνια ή οπές) στο κανάλι ρυθμίζονται από τις διαφορές ανάμεσα στο κανάλι και στις πύλες. Μεγάλες θετικές τάσεις πύλης προωθούν μία συγκέντρωση ηλεκτρονίων στο κανάλι (n-type κανάλι), και η μεγάλη αρνητική τάση πύλης οδηγεί σε κανάλι p-type. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργεί δύο μέρη στις χαρακτηριστικές μεταφοράς διαχωρισμένες

από το σημείο Dirac. Η θέση του σημείου Dirac εξαρτάται από τη διαφορά ανάμεσα στις αρχές λειτουργίας της πύλης και του γραφενίου, τον τύπο και την πυκνότητα των φορτίων στις διεπιφάνειες στο πάνω και κάτω μέρος του καναλιού και από οποιαδήποτε ενίσχυση του γραφενίου. [4]

Οι χαρακτηριστικές εξόδου των πολλών MOSFETs γραφενίου είτε είναι γραμμικές χωρίς κορεσμό είτε παρουσιάζουν ασθενή κορεσμό. Ωστόσο, μερικά MOSFETs γραφενίου έχουν μία ασυνήθιστη συμπεριφορά κορεσμού η οποία περιλαμβάνει μία δεύτερη γραμμική περιοχή. Όπως φαίνεται παρακάτω στο σχήμα, για μικρές τιμές της V_{DS} , το τρανζίστορ λειτουργεί στη γραμμική περιοχή και το κανάλι είναι n-type. Όσο η V_{DS} αυξάνει, το ρεύμα αρχίζει να κορέννεται μέχρι το σημείο $V_{DS}=V_{DS,CRIT}$. Όταν η V_{DS} ξεπεράσει τη $V_{DS,CRIT}$, ο τύπος αγωγιμότητας του καναλιού αλλάζει από n-type σε p-type και το τρανζίστορ εισέρχεται στη δεύτερη γραμμική περιοχή. Για μεγάλες τιμές της V_{DS} , οι χαρακτηριστικές εξόδου για διαφορετικές τάσεις πύλης τέμνονται, οδηγώντας σε μηδενική ή ακόμη και αρνητική διαγωγιμότητα, η οποία είναι μία ανεπιθύμητη συνθήκη. Τέτοια συμπεριφορά εμφανίζουν συσκευές που έχουν ως κανάλια υλικά με μηδενικό ενεργειακό χάσμα και δεν συμβαίνει σε FETs με ημιαγώγιμα κανάλια.



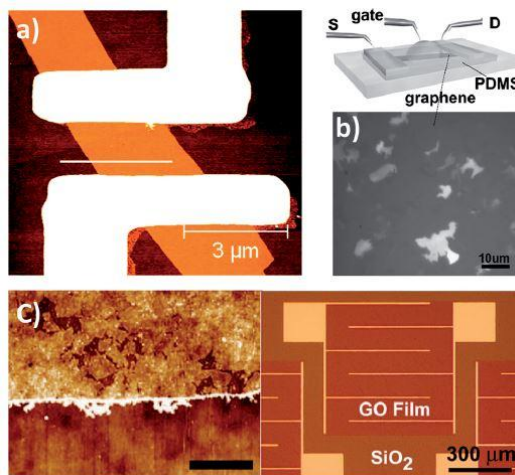
Σχήμα 5: (a) Χαρακτηριστικές μεταφοράς των δύο MOSFETs με κανάλια μεγάλης επιφάνειας γραφενίου, (b) Χαρακτηριστικές εξόδου (ρεύμα απαγωγού, I_D , συναρτήσει της V_{DS} ενός MOSFET με ένα κανάλι γραφενίου μεγάλης επιφάνειας, για διαφορετικές τιμές της τάσης της πύλης, $V_{GS,top}$.

1.4 Παρασκευή και απομόνωση γραφενίου/Μέθοδοι σύνθεσης

Το γραφένιο ατομικού πάχους, όπως προαναφέρθηκε, είναι ένα διδιάστατο υλικό. Το πλέγμα του αποτελείται από εξάγωνα με ένα άτομο άνθρακα σε κάθε γωνία. Η απόσταση μεταξύ των ατόμων είναι 0.142nm και η σταθερά του πλέγματος, a , είναι 0.246nm. Οι πρώτες αναφορές για το υλικό αυτό εμφανίστηκαν δεκαετίες πριν, πριν ακόμη επινοηθεί το όνομα «γραφένιο». [5]

Τα τρία κυρίαρχα είδη υλικών γραφενίου τα οποία χρησιμοποιούνται στους ηλεκτρονικούς αισθητήρες είναι το pristine graphene τροποποιημένο από τη μέθοδο

μηχανικής αποφλοΐωσης, το γραφένιο αναπτυγμένο με τη μέθοδο CVD, το reduced graphene oxide (rGO) προερχόμενο από τη χημική αποφλοΐωση του γραφίτη και η θερμική αποσύνθεση του SiC για να παράχθει επιταξιακό γραφένιο πάνω στα στρώματα SiC.



Σχήμα 6: Τα διαφορετικά είδη γραφενίου χρησιμοποιώντας τα στους ηλεκτρονικούς αισθητήρες. (a) εικόνα AFM του GFET με βάση το pristine graphene, συνδεδεμένο με ηλεκτρόδια Au/Ti (b) οπτική εικόνα μικροσκοπίου του CVD-graphene και σχηματική απεικόνιση FET με πύλη υδατικό διάλυμα (c) εικόνα AFM του φιλμ rGO και οπτική εικόνα μικροσκοπίου ενός ηλεκτρικά απομονωμένης συσκευής rGO με επαφές Au/Ti

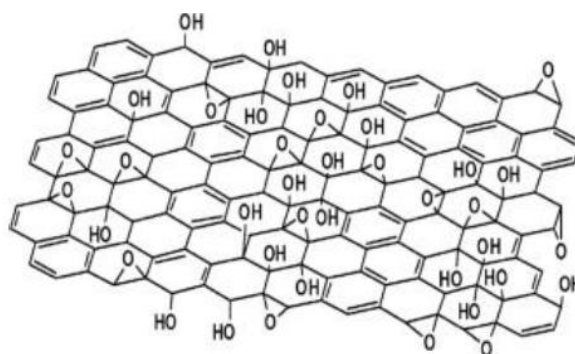
Το pristine graphene χωρίς κάποια τροποποίηση είναι αδιάλυτο σε οποιοδήποτε διάλυμα. Ο μόνος τρόπος για να παραχθεί ένα κανάλι με pristine graphene είναι η άμεση εναπόθεση φύλλων γραφενίου πάνω στο υπόστρωμα μέσω της μηχανικής διάσπασης, γνωστή ως μέθοδο "scotch-tape". Αυτό το είδος γραφενίου είναι μη ελεγχόμενο σε σχήμα, μέγεθος και θέση καθιστώντας το κατάλληλο μόνο για θεωρητικές μελέτες. [5]

Η τεχνική που ακολουθούν οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες για την απομόνωση γραφενίου είναι η μηχανική αποφλοΐωση. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, κρύσταλλος γραφίτη τοποθετείται ανάμεσα σε κολλητικό φιλμ, που διπλώνεται ώστε να βρίσκεται εντός συγκολλητικών επιφανειών. Οι επιφάνειες αυτές έρχονται σε επαφή. Κατά την αποκόλλησή τους, ο γραφίτης αρχίζει να διαχωρίζεται. Αυτό επαναλαμβάνεται πολλές φορές και έτσι επιτυγχάνεται ο προοδευτικός διαχωρισμός γραφιτικών επιπέδων. Η διαδικασία σταματάει όταν ο γραφίτης χάσει τη λάμψη του, το οποίο αποδεικνύει την ύπαρξη του γραφίτη σε πολύ χαμηλά γραφιτικά επίπεδα. Το μέρος αυτό του συγκολλητικού φιλμ επικολλάται με προσοχή πάνω σε καθαρή επιφάνεια υποστρώματος οξειδίου του πυριτίου συγκεκριμένου πάχους. Παραμένει για 10min ενώ ταυτόχρονα αφαιρείται με προσοχή ο αέρας μεταξύ του φιλμ και του υποστρώματος, και στο τέλος αφαιρείται το φιλμ.[3]

Μία διαδεδομένη τεχνική παρασκευής ενός ή μερικών φύλλων γραφενίου είναι η χημική εναπόθεση ατμού (Chemical Vapor Deposition, CVD) υδρογονανθράκων σε μεταλλικό υπόστρωμα όπως το Ni, Ru, Cu.[23] Η ανάπτυξη του γραφενίου με τεχνική CVD δίνει τη δυνατότητα παρασκευής γραφενίου μεγάλης έκτασης. Η υψηλή αγωγιμότητα και διαπερατότητα κάνει το CVD-graphene κατάλληλο για ευέλικτα ηλεκτροδία σε οπτοηλεκτρικές εφαρμογές.

Η προετοιμασία του GO είναι εντελώς διαφορετική από αυτή του γραφενίου. Υπάρχει δυνατότητα το GO να συντεθεί χημικά οξειδώνοντας το γραφίτη σε συνθήκες ισχυρού οξέος. Σε αντίθεση με το γραφένιο, το GO είναι καλά διασκορπισμένο στο νερό. Αυτό συμβαίνει λόγω των πολλών ομάδων υδροξυλίου (-OH) που υπάρχουν στην επιφάνεια του GO. Ένα συντετιθέμενο GO έχει τη δομή φύλλου πάχους περίπου 1nm με τραχιά επιφάνεια το οποίο προσδιορίστηκε με μικρόσκόπιο ατομικής δύναμης AFM. Το GO είναι πολύ μεγάλο υλικό συγκρινόμενο με τα υλικά της κλίμακας του μορίου. Είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο μεγάλα κομμάτια GO μπορούν να επιπλέουν στο νερό.

Στο GO η οξείδωση δεν είναι καθολική με αποτέλεσμα να υπάρχουν και περιοχές οξειδωμένες και μη. Με βάση τα παραπάνω, η συνολική εικόνα που εμφανίζει το οξείδιο του γραφενίου είναι αυτή ενός επιπέδου το οποίο αποτελείται από περιοχές ηλεκτρικά αγωγίμες και από περιοχές που συμπεριφέρονται ως μονωτές. Το GO συμπεριφέρεται μακροσκοπικά ως μονωτής. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι απομάκρυνσης των οξυγονούχων ομάδων. Σε κάθε περίπτωση όμως το rGO που προκύπτει έχει διαφορετική ηλεκτρική αγωγιμότητα, ανάλογα με τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του. Οι μέθοδοι αναγωγής, δηλαδή απομάκρυνσης των οξυγονούχων ομάδων από τον κρύσταλλο του οξειδίου του γραφενίου, ποικίλουν. Οι σημαντικότερες είναι η αναγωγή μέσω θέρμανσης (Thermal Reduction), καθώς επίσης και η χημική αναγωγή μέσω ενός χημικού αντιδραστηρίου (Chemical Reduction), όπως το υδροξυλίο του νατρίου (NaOH), το υδροξυλίο του καλίου (KOH), η Υδραζίνη (N₂H₄) κ.α. Η απομάκρυνση των οξυγονούχων ομάδων από τον κρύσταλλο του οξειδίου του γραφενίου μέσω θέρμανσης, ονομάζεται θερμική αναγωγή. Η θέρμανση του οξειδίου του γραφίτη σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 2000 °C, οδηγούσε στην αποφλοίωση του. [7][8]



Σχήμα 7: Το οξείδιο του γραφενίου (GO)

Κεφάλαιο 2: Ανιχνευτές με βάση το γραφένιο

2.1 Τρανζίστορς με βάση το γραφένιο

Η ερευνητική ομάδα του He αναφέρθηκε στα τρανζίστορς κατασκευασμένα με γραφένιο. [11] Η ανίχνευση χημικών και βιολογικών μορίων με υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα είναι σημαντική όχι μόνο για το μεγάλο εύρος των ερευνητικών πεδίων αλλά επίσης για τις ποικίλες πρακτικές εφαρμογές όπως η διάγνωση των ασθενειών και η περιθάλψη. Οι ηλεκτρονικοί αισθητήρες με βάση τα τρανζίστορς πεδίου προτιμώνται λόγω της υψηλής ευαισθησίας, της απλής διάταξης της συσκευής, του χαμηλού κόστους, της σμίκρυνσης της συσκευής και της ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο.

Η πραγματοποίηση της ηλεκτρονικής ανίχνευσης βασίζεται στην αλλαγή της αγωγιμότητας των ημιαγωγικών καναλιών FET απορροφώντας στοχευμένα μόρια. Η ιδέα ανίχνευσης με FETs υλοποιήθηκε χρησιμοποιώντας bulk υλικά, όπως οξειδία μετάλλου ευαίσθητα στα αέρια ή πολυμερικές μεμβράνες ευαίσθητες στην ανίχνευση ιόντων, ως κανάλια. Ωστόσο, τα bulk κανάλια, περιόριζαν την αλληλεπίδραση των στοχευμένων μορίων και του καναλιού μόνο στην επιφάνεια του καναλιού, με αποτέλεσμα τη χαμηλή ευαισθησία των ανιχνευτών FET. Τα ημιαγωγικά νανοϋλικά είναι η ιδανική λύση για την αύξηση της επίδοσης των ανιχνευτών FET. Τα νανοσύρματα μονοκρυσταλλικού πυριτίου μιας διάστασης (SiNWs) είναι ένα τυπικό παράδειγμα. Τα υψηλά χαρακτηριστικά ενεργοποίησης (ON/OFF $>10^7$) είναι σημαντικός παράγοντας για την εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία των ηλεκτρονικών αισθητήρων με βάση αυτό το υλικό. Ένα επιπλέον παράδειγμα είναι οι μονοδιάστατοι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs). Ατομικοί ημιαγωγά νανοσωλήνες άνθρακα, λεπτά φιλμ νανοσωλήνων άνθρακα και συστοιχίες νανοσωλήνων έχουν εφαρμοστεί ως κανάλια στους υψηλής απόδοσης ηλεκτρονικούς αισθητήρες. Το πρόσφατα αναπτυσσόμενο διδιάστατο υλικό, το γραφένιο, έχει προσελκύσει αυξημένη προσοχή λόγω του μεγάλου εύρους των ηλεκτρονικών του εφαρμογών σε διάφανα ηλεκτρόδια και ως υλικό καναλιού για FETs. Εκτός των εξαιρετικών ηλεκτρονικών του ιδιοτήτων, το γραφένιο προσφέρει υψηλή ευελιξία και βιοσυμβατότητα, μεγάλη επιφάνεια και χημική λειτουργία συγκρινόμενο με τους νανοσωλήνες άνθρακα, καθιστώντας το ως ιδανική πλατφόρμα ανίχνευσης. Όμως, το πιο σημαντικό είναι το ατομικό του πάχος το οποίο σημαίνει ότι όλα τα άτομα άνθρακα αλληλεπιδρούν άμεσα με τον αναλύτη. [11]

Ένα τυπικό FET αποτελείται από ημιαγωγικό κανάλι ανάμεσα σε δύο μεταλλικά ηλεκτρόδια, το ηλεκτρόδιο της πηγής και του απαγωγού, μέσω των οποίων το ρεύμα εγχέεται και συλλέγεται. Η αγωγιμότητα του καναλιού τροποποιείται μεταβάλλοντας το δυναμικό πύλης μέσω του λεπτού διηλεκτρικού στρώματος, 300nm SiO₂. Παραδείγματος χάριν, σε ένα τρανζίστορ πεδίου MOSFET p-type, το αρνητικό δυναμικό πύλης οδηγεί σε συσσώρευση οπών(φορείς πλειονότητας), με αποτέλεσμα την αύξηση της αγωγιμότητας του καναλιού, ενώ το θετικό δυναμικό πύλης οδηγεί σε μείωση των οπών και ως εκ τούτου στη μείωση της αγωγιμότητας. Στην περίπτωση του ηλεκτρονικού αισθητήρα, η απορρόφηση των μορίων στην

επιφάνεια του ημιαγωγικού καναλιού είτε αλλάζει το τοπικό δυναμικό της επιφάνειας είτε άμεσα ενισχύει το κανάλι, με αποτέλεσμα την αλλαγή της αγωγιμότητας του FET. [5]

2.2 Νανοηλεκτρονικοί βιοαισθητήρες με βάση το γραφένιο αναπτυγμένο με CVD για την ανίχνευση γλυκόζης

Ο Yinxi Huang αναφέρθηκε στους νανοηλεκτρονικούς βιοαισθητήρες κατασκευασμένους με γραφένιο αναπτυγμένο με CVD για την ανίχνευση γλυκόζης. Οι βιοαισθητήρες με βάση το γραφένιο πλεονεκτούν των υπολοίπων λόγω της μεγάλης περιοχής ανίχνευσης, των δυνατοτήτων για νέους μηχανισμούς ανίχνευσης και της ευκολίας παρασκευής του. Σ' αυτή τη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν συσκευές με γραφένιο αναπτυγμένο με CVD τροποποιημένο με ένζυμο οξειδάσης για ανίχνευση της γλυκόζης και της glutamate σε πραγματικό χρόνο.[11]

2.2.1. Προετοιμασία του φιλμ γραφενίου

Φιλμς γραφενίου μεγάλης έκτασης αναπτύχθηκαν σε φιλμ Ni (~ 500nm πάχος, εναποτιθέμενα σε στρώμα SiO₂/Si στους 1000 °C με χημική εναπόθεση ατμού (CVD) του άνθρακα χρησιμοποιώντας μίγμα μεθανίου και υδρογόνου. Το αναπτυγμένο φιλμ γραφενίου στο φιλμ Ni επιστρώθηκε με poly(methyl methacrylate) (PMMA) διαλυμένο σε χλωροβενζόλιο, στη συνέχεια ακολούθησε ψήσιμο στους 120 °C για 20 min. Το φιλμ Ni κάτω από το φιλμ γραφενίου εγχαράσσεται από διάλυμα HCl (HCl: H₂O=1:10) για περίοδο 8 ωρών για να ελευθερώσει το PMMA/φιλμ γραφενίου μέσα στο διάλυμα. Το PMMA/φιλμ γραφενίου μεταφέρεται στο υπόστρωμα quartz. Μετά το στέγνωμα με αέρα, μία μικρή ποσότητα του διαλύματος PMMA/ χλωροβενζόλιο εγχύθηκε πάνω στο PMMA/ φιλμ γραφενίου για να διαλυθεί το PMMA. Τέλος, το PMMA/ φιλμ γραφενίου εμβαπτίζεται μέσα σε ακετόνη για να αφαιρεθεί το PMMA και στη συνέχεια ακολουθεί ανόπτηση στους 450 °C για 20 λεπτά.

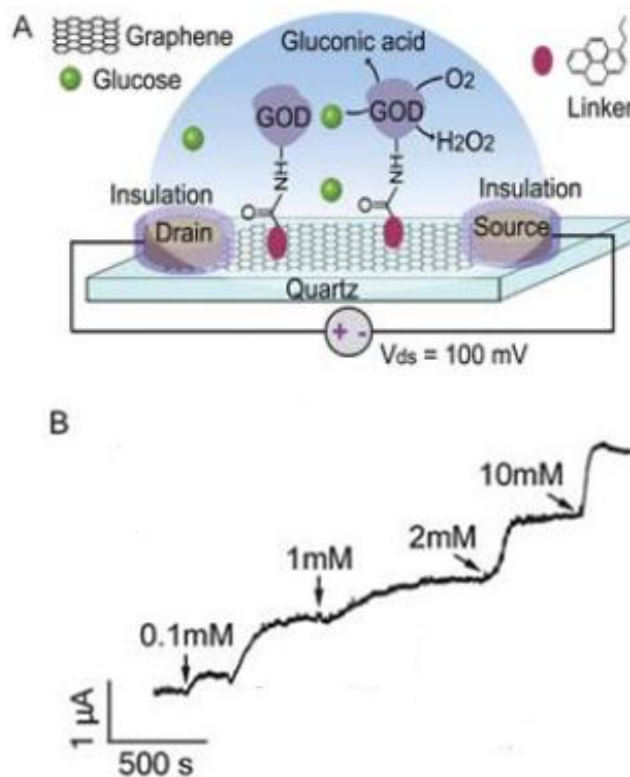
2.2.2 Ηλεκτρικές Μετρήσεις

Όλες οι μετρήσεις έγιναν πολώνοντας τις συσκευές γραφενίου στα 100mV. Η τάση της πύλης εφαρμόστηκε μέσω ενός ηλεκτροδίου Ag/AgCl στο διάλυμα PBS(10mM, pH 7.2). Στα πειράματα βιοανίχνευσης, το ρεύμα ανάμεσα στην πηγή και στον απαγωγό (I_{DS}) του FET γραφενίου παρακολούθηθηκε με συνεχή τάση πύλης V_g=0V. Τα ηλεκτρόδια πηγής και απαγωγού δημιουργήθηκαν στις δύο αντίθετες άκρες του γραφενίου (~2x4mm²) χρησιμοποιώντας silver paint και χρησιμοποιήθηκε σιλκόνη για να απομονώσει τα δύο ηλεκτρόδια και να ορίσει το θάλαμο του διαλύματος ανάμεσα στα ηλεκτρόδια.

Το ένζυμο της οξειδάσης της γλυκόζης (GOD) ή glutamic dehydrogenase (GluD) ακινητοποιήθηκε πάνω στο φιλμ γραφενίου μέσω ενός μορίου σύνδεσης (linker molecule) (1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester) του οποίου το ένα άκρο

προσελκύει την επιφάνεια του γραφενίου μέσω της αλληλεπίδρασης π-π με μία ομάδα πυρενίου και το άλλο άκρο αντιδρά με την αμινομάδα στο ένζυμο μέσω ενός δεσμού αμιδίου.

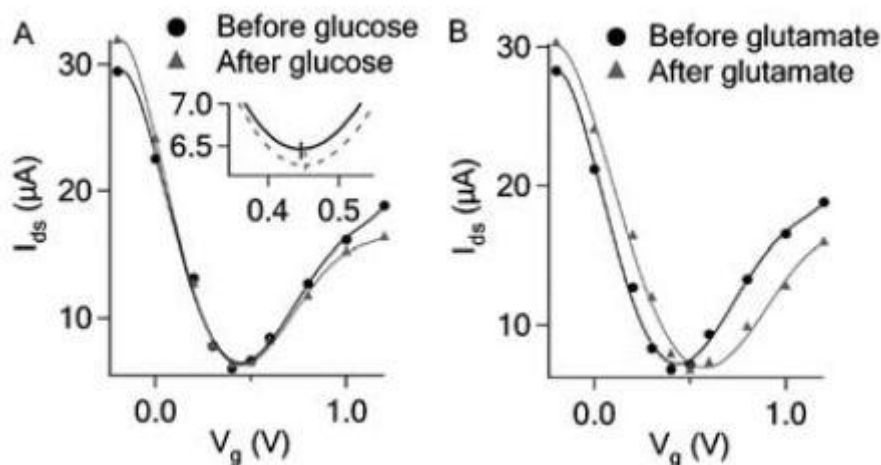
Στα πειράματα βιοανίχνευσης, το FET γραφενίου λειτουργεί στην περιοχή τύπου p. Η τάση διαλύματος V_g ήταν 0V και το ρεύμα I_{DS} συνεχώς παρακολουθείται με $V_{ds}=100mV$. Παρατηρείται αύξηση του ρεύματος του I_{ds} όταν προστίθεται γλυκόζη στο διάλυμα PBS (10 mM, pH 7.2) για να φθάσει στην τελική συγκέντρωση των 0.1mM. Επιπλέον, το ρεύμα I_{ds} αυξήθηκε περισσότερο όσο αυξανόταν η γλυκόζη για να φθάσει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η απόκριση του γραφενίου τείνει να κορεστεί για συγκεντρώσεις γλυκόζης >10mM, ίσως λόγω της περιορισμένης πυκνότητας των GODs στο φιλμ γραφενίου και λόγω του περιορισμένου ρυθμού αντίδρασης του GOD.



Σχήμα 7: (a) η σχηματική απεικόνιση του FET γραφενίου τροποποιημένο με GOD (b) οι αποκρίσεις ρεύματος με τη προσθήκη της γλυκόζης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η πάνω γραφική παράσταση δείχνει ότι το GOD FET χωρίς γραφένιο δεν ανταποκρίνεται σε γλυκόζη 10mM.

Η οξειδάση της γλυκόζης και της glutamate οδήγησε σε αύξηση της αγωγιμότητας του γραφενίου. Αυτή η αύξηση δεν είναι λόγω της άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων που παράγονται από την αντίδραση οξείδωσης με αποτέλεσμα την αρνητική μετατόπιση του σημείου Dirac της καμπύλης μεταφοράς. Οι καμπύλες μεταφοράς και στις δύο περιπτώσεις δείχνουν ότι η αγωγιμότητα της συσκευής, όταν $V_g=0V$, αυξάνει. Η προσθήκη της glutamate προκάλεσε μετατόπιση της καμπύλης μεταφοράς προς τα δεξιά, υποδεικνύοντας την επίδραση της ενίσχυσης με οπές (p-

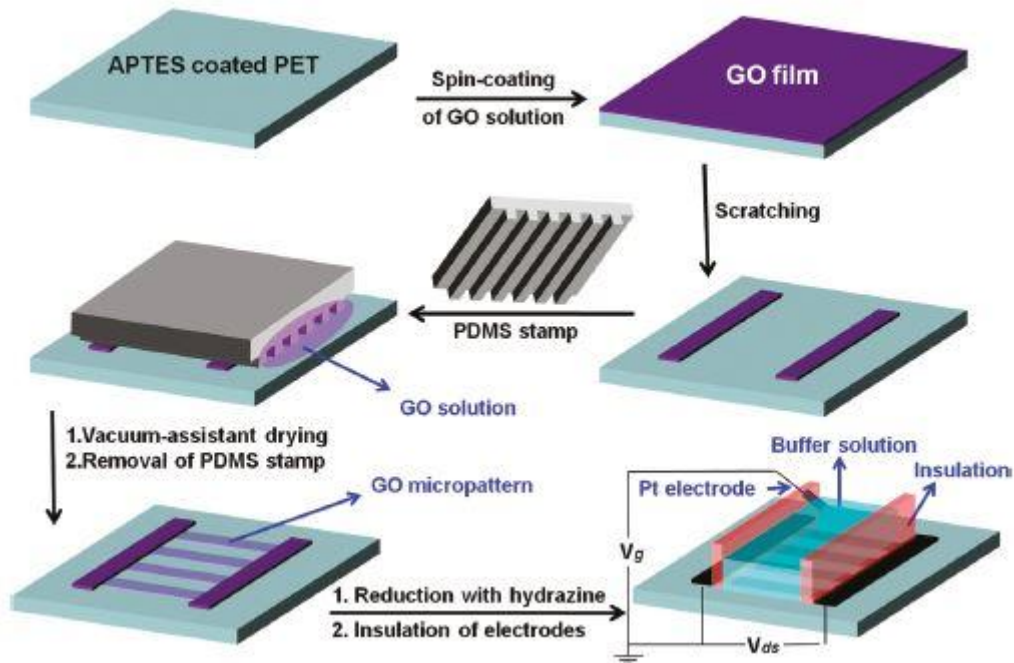
doping). Επίσης, η προσθήκη της γλυκόζης προκάλεσε μία μικρή μετατόπιση προς τα δεξιά της καμπύλης μεταφοράς. Αυτή η τόσο μικρή επίδραση της ενίσχυσης με οπές ίσως εξηγεί τη χαμηλότερη ανίχνευση της γλυκόζης συγκρινόμενη με αυτή της glutamate.



Σχήμα 7: (a) οι καμπύλες μεταφοράς πριν και μετά την προσθήκη γλυκόζης(10mM) στο FET γραφενίου τροποποιημένο με GOD. (b) οι καμπύλες μεταφοράς πριν και μετά τη προσθήκη glutamate(1mM) στο FET γραφενίου τροποποιημένο με GluD.

2.3 Τρανζίστορς με διάφανο, ευέλικτο φιλμ με ανηγμένο οξείδιο γραφενίου

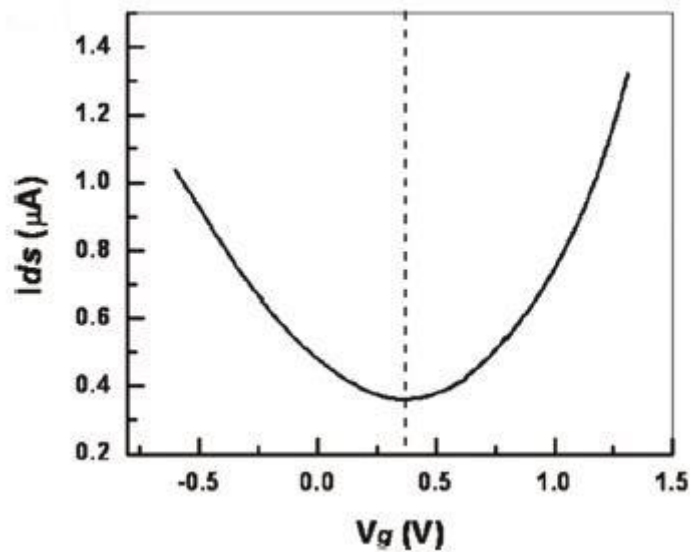
Ο He ανέφερε ότι λόγω του πάχους, των ηλεκτρικών ιδιοτήτων, της διαφάνειας του, το γραφένιο είναι κατάλληλο ως κανάλι και ως ηλεκτρόδιο σε ποικίλες ηλεκτρονικές συσκευές. Σ' αυτή τη περίπτωση, κατασκευάστηκαν τρανζίστορς με λεπτά φύλλα rGO τα οποία μελετήθηκαν σε εφαρμογές βιοανίχνευσης. Ο ηλεκτρονικός αισθητήρας είναι ευέλικτος με υψηλή διαφάνεια, εμφανίζοντας καλή ευαισθησία στην ανίχνευση πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα όπως η αβιδίνη χρησιμοποιώντας βιοτινυλιωμένο all-rGO αισθητήρα. Δημοσίευσαν μια απλή μέθοδο για την κατασκευή των ευέλικτων και διάφανων all rGO TFTs(τρανζίστορς λεπτών φύλλων) σε υποστρώματα PET. Το παχύ φιλμ rGO(>9nm) στο PET, το οποίο δημιουργήθηκε με τη μέθοδο της επίστρωσης, χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδια. Τα λεπτά φιλμς rGO (2-4nm) χρησιμοποιούνται ως ενεργά κανάλια. [20]



Σχήμα 8: Σχηματική διαδικασία κατασκευής των all-rGO TFT

Το παραπάνω σχήμα δείχνει πως κατασκευάστηκε το all-rGO TFT. Αρχικά, το διάλυμα οξειδίου του γραφενίου (GO) επιστρώθηκε πάνω σε ένα υπόστρωμα PET τροποποιημένο με 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). Η τροποποίηση του APTES μπορεί να ενισχύσει την απορρόφηση των φύλλων GO στο PET. Τότε, χρησιμοποιήθηκε ένα κοφτερό πλαστικό tip για να εγχαράξει το film GO ώστε να κατασκευαστούν δύο διαφορετικά pads GO. Έπειτα, μέσω υδραζίνης τα φιλμ GO στα υποστρώματα PET μειώθηκαν για να αποκτηθούν rGO films. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε σιλικόνη η οποία απομόνωσε τα δύο ηλεκτρόδια rGO και δημιουργήθηκαν τα ηλεκτρόδια απαγωγού και πηγής, σε συνδυασμό δημιουργίας του θαλάμου αποτελούμενος από το ρυθμιστικό διάλυμα ως electrolyte-gating. Το μήκος των ηλεκτροδίων από rGO και η απόσταση μεταξύ τους ισούται με 10 και 5mm, ορίζοντας το εύρος και το μήκος του αγωγίμου θαλάμου, αντίστοιχα. Τα ηλεκτρόδια rGO πάχους 9 nm επιλέχθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητική αγωγιμότητα ($<2M\Omega$) και διαφάνεια ($>75\%$).

Το παρακάτω σχήμα δείχνει μία γραφική παράσταση του ρεύματος απαγωγού-πηγής (I_{ds}) συναρτήσει της τάσης της πύλης (V_g) στο κατασκευασμένο τρανζίστορ λεπτών φύλλων έχοντας ως είσοδο ηλεκτρολύτη μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα PSB (pH 7.2).



Σχήμα 9: Μία τυπική καμπύλη I_{DS} - V_G σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα PBS στους $V_{DS}=400mV$.

Τα all-rGO TFTs έδειξαν εξαιρετική απόκριση, ευελιξία και διαφάνεια, τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν σε συσκευές ηλεκτρονικής ανίχνευσης. Ως απόδειξη της διαδικασίας, εφάρμοσε τα all-rGO TFTs για να ανιχνεύσει σε πραγματικό χρόνο τη μη ειδική απορρόφηση της αρνητικά φορτισμένης ιονεκτικής στο ρυθμιστικό διάλυμα όπου παρατηρήθηκε μείωση του ρεύματος και θετική μετατόπιση του σημείου Dirac. Επίσης, η διάταξη χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της θετικά φορτισμένης βιοτίνης-αβιδίνης σε πραγματικό χρόνο μέσω του βιοτινυλιωμένου καναλιού rGO. Η δέσμευση της αβιδίνης μέσω της ισχυρής αλληλεπίδρασης βιοτίνης-αβιδίνης στο κανάλι rGO προκάλεσε την αύξηση του ρεύματος και κατ' επέκταση αρνητική μετατόπιση του σημείου Dirac.

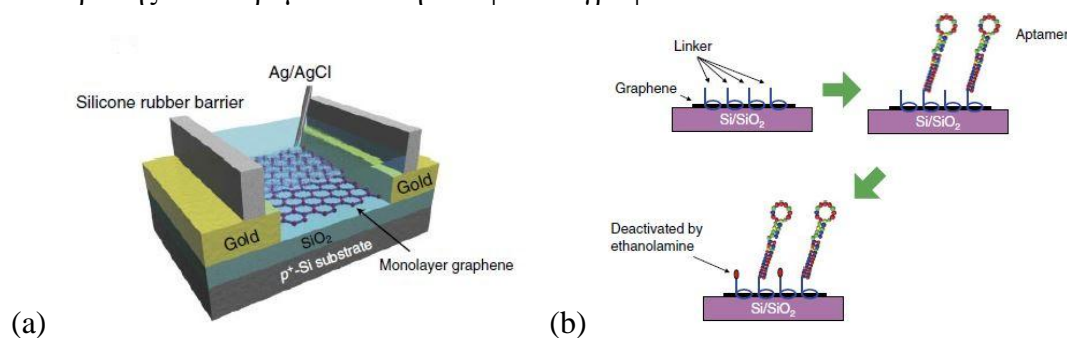
2.4 Ανίχνευση ανοσοσφαιρίνης με βάση μη επισημασμένο απταμερές χρησιμοποιώντας FET

Ο Yasuhide Ohno δημοσίευσε την ανίχνευση συγκεκριμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας G-FETs τροποποιημένα με απταμερές. Απταμερή της ανοσοσφαιρίνης E (IgE) ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνεια γραφενίου με 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester ως μόριο σύνδεσης με την ανοσοσφαιρίνη IgE. Η IgE είναι στοχευμένη πρωτεΐνη, ένα αντίσωμα που βρέθηκε μόνο στα θηλαστικά.

Στην ανίχνευση για να αποκτηθεί υψηλότερη ευαισθησία, χρησιμοποίησαν μονοστρωματικά φύλλα γραφενίου ως κανάλι των FETs. Τα μονοστρωματικά φύλλα γραφενίου αποκτήθηκαν από μικρομηχανική αποφλοίωση. Τα ηλεκτρόδια πηγής και απαγωγού από χρυσό σχηματίστηκαν από λιθογραφία ηλεκτρονικής δέσμης. Η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων ισούται προσεγγιστικά με 3 μm. Ένα ηλεκτρόδιο

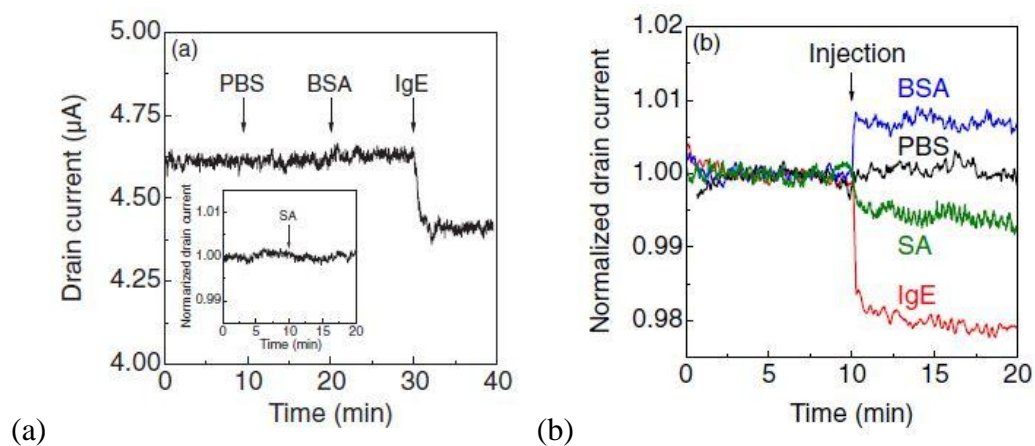
αναφοράς Ag/AgCl χρησιμοποιήθηκε ως top-gate ηλεκτρόδιο για να ελαχιστοποιήσει τις περιβαλλοντικές επιδράσεις.

Η διαδικασία ακινητοποίησης απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα. Αρχικά, ένα G-FET εμβαπτίστηκε για 1h σε θερμοκρασία δωματίου σε ένα διάλυμα μεθανόλης των 5 mM 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester, το οποίο λειτουργεί ως linker το οποίο αλληλεπιδρά ισχυρά με την επιφάνεια γραφενίου. Μετά την πλύση του linker με μεθανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικό (phosphate-buffered solution) PBS με pH 6.8, στο G-FET εμβαπτίστηκε ένα διάλυμα 1nM απαμερών ανοσοσφαιρίνης σε PBS για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, στο PBS προστέθηκε 100 mM διάλυμα αιθανολαμίνης στην περιοχή του καναλιού του G-FET για 1h για να απενεργοποιήσει και να εμποδίσει τις αναπομείνασες ομάδες αντίδρασης που παρέμειναν στην επιφάνεια γραφενίου.



Σχήμα 10: (a) Σχηματική απεικόνιση της διάταξης, (b) Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης απαμερών IgE στην επιφάνεια γραφενίου.

Επίσης, εξέτασαν τα χαρακτηριστικά της ανίχνευσης των τροποποιημένων G-FETs με απαμερές, χρησιμοποιώντας μη ενεργοποιημένα G-FETs για σύγκριση. Το παρακάτω σχήμα 11a δείχνει την χρονική εξάρτηση του ρεύματος ενός τροποποιημένου G-FET με τάση $V_D=50$ mV και τάση top-gate $V_{TG}=0V$ σε PBS σε pH 6.8. Μετά από 10 και 20 λεπτά, μόνο το PBS χωρίς πρωτεΐνη και η μη στοχευμένη πρωτεΐνη των 30 nM BSA προστέθηκε στο PBS, αντίστοιχα. Τα στοχευμένα μόρια της IgE (30nM) εισήχθησαν μετά από 30 λεπτά. Όταν η στοχευμένη πρωτεΐνη εισήχθη στο κανάλι γραφενίου, το ρεύμα ξαφνικά μειώθηκε. Από την άλλη πλευρά, μέχρι την προσθήκη του PBS και της BSA, η αγωγιμότητα του GFET παρέμεινε σταθερή. Το σχήμα 11b δείχνει τη χρονική εξάρτηση του κανονικοποιημένου ρεύματος I_D για G-FETs χωρίς τροποποιημένο κανάλι γραφενίου. Μετά από 10 λεπτά, 10 mM PBS, 30 nM BSA, 100 nM SA και 30 nM IgE εισήχθησαν στο κανάλι. Το ρεύμα μειώθηκε μετά την προσθήκη των IgE και SA. Αυξήθηκε όταν προστέθηκε BSA και έμεινε σταθερό μετά το PBS. Η διαφορά στην αλλαγή του ρεύματος οφείλεται στη διαφορά των φορτίων των πρωτεϊνών. Σε pH 6.8, η IgE και SA είναι θετικά φορτισμένες και η BSA έχει αρνητικό φορτίο. Σ' αυτή την περίπτωση, οι φορείς του καναλιού γραφενίου είναι οπές και το ρεύμα μειώνεται (αυξάνεται) με την προσέλκυση θετικά (αρνητικά) φορτισμένων IgE και SA(BSA) στο κανάλι γραφενίου χωρίς τροποποίηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο τα στοχευμένα μόρια μπορούν να ανιχνευθούν σε τροποποιημένα G-FETs απαμερές.



Σχήμα 11: (a) Χρονική απόκριση του I_D για τροποποιημένο G-FET με απταμερές. Μετά από 10,20,30 min, το PBS, η μη στοχευμένη πρωτεΐνη BSA, και η στοχευμένη πρωτεΐνη της IgE προστέθηκαν, αντίστοιχα. Στα 10 min, η θετικά φορτισμένη SA προστέθηκε. (b) Χρονική απόκριση του κανονικοποιημένου ρεύματος I_D για G-FET χωρίς τροποποίηση. Μετά από 10 min, οι PBS, BSA, SA και IgE προστέθηκαν. [12]

Κεφάλαιο 3: Μικροροϊκά ενσωματωμένα σε βιοαισθητήρες για ανίχνευση βιολογικών δεικτών

Ένας βιοαισθητήρας ορίζεται ως μία συσκευή ανάλυσης ενός βιολογικού στοιχείου το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο πάνω σε αυτό. Στη συνέχεια συνδέεται με έναν ανιχνευτή για να αναγνωρίσει την παρουσία ενός ή περισσότερων αναλυτών σε ένα δείγμα. Τα τελευταία χρόνια, όλο και συχνότερη είναι η ενσωμάτωση των βιοαισθητήρων με τα μικροροϊκά κανάλια το οποίο συντελεί στη δημιουργία μικροσκοπικών πλατφορμών με πολλές δυνατότητες όπως η χρήση μικρότερου όγκου του δείγματος, η μείωση του χρόνου της διαδικασίας, η ανάλυση χαμηλού κόστους κ.τ.λ. Στα μικροροϊκά συστήματα, τα ρευστά που χρησιμοποιούνται είναι της τάξης των μικρο- και νανο-λίτρων [14]. Οι πρόσφατες εξελίξεις στα μικροροϊκά έχουν βοηθήσει τους ερευνητές να υιοθετήσουν μερικές από αυτές τις πλατφόρμες για διαγνώσεις point-of care (POC) [13].

Οι διαγνώσεις POC είναι αναλυτικές πλατφόρμες εξέτασης οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε ιατρικά εργαστήρια όσο και σε φορητό εξοπλισμό. Αυτές οι συσκευές μπορούν να ικανοποιήσουν την αυξανόμενη ζήτηση του ιατρικού τομέα για πλήρως αυτοματοποιημένα εργαλεία τα οποία παρέχουν γρήγορη διάγνωση.

Οι μικροροϊκές συσκευές έχουν τη δυνατότητα να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στις διαγνώσεις. Η ανάπτυξη στα μικροροϊκά, στις συστοιχίες, στους αισθητήρες και στα νανοϋλικά έχουν προκαλέσει την ανάπτυξη των οργάνων "lab-on-a-chip". Τα μικροροϊκά συστήματα αποτελούν μία εξαιρετική τεχνολογία λόγω της ικανότητάς τους να χειρίζονται μικρούς όγκους ρευστών μέσα σε συγκεκριμένες διαστάσεις.

Μερικά από τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των μικροροϊκών συσκευών για POC διαγνώσεις είναι το χαρτί, το γυαλί, το πυρίτιο, τα πλαστικά και τα πολυανθρακικά άλατα. Ο Nie ανέπτυξε POC συσκευές για την ανίχνευση γλυκόζης, χοληστερόλης, λακτόζης και αλκοόλ στο αίμα ή στα ούρα χρησιμοποιώντας χρωματογραφικό χαρτί [14]. Το πυρίτιο και το γυαλί χρησιμοποιούνται στην κατασκευή lab-on-chip λόγω της επιφανειακής σταθερότητας, της συμβατότητας των διαλυμάτων, της ευκολίας στην κατασκευή και των καλών οπτικών ιδιοτήτων οι οποίες μπορούν να διευκολύνουν την ενσωμάτωση των ηλεκτρονικών on-chip στο μικροροϊκό δίκτυο. Ωστόσο, το πυρίτιο και το γυαλί είναι ακριβά και η εγχάραξή τους είναι χρονοβόρα. Τα πολυμερή με βελτιωμένες οπτικές, θερμικές και μηχανικές ιδιότητες προτιμώνται για το σχεδιασμό και την κατασκευή καινοτόμων μικροροϊκών συσκευών [15]. Οι πρόσφατες προσπάθειες εστίασαν στην κατασκευή των μικροροϊκών συσκευών χρησιμοποιώντας PDMS λόγω την εξαιρετικών οπτικών δυνατοτήτων, της διαφάνειας (230-1000 nm) και της απόκρισης στο υπέρυθρο φάσμα. Το PDMS είναι το πλέον κατάλληλο υλικό για την κατασκευή

μικροροϊκών λόγω της ευκολίας χρήσης, της ευκαμψίας και του χαμηλού κόστους. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν μερικά μειονεκτήματα στις εφαρμογές των μικροροϊκών διότι η επιφάνεια του είναι υδρόφοβη αφού περιέχει ομάδες CH_3 . Για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, η επιφάνεια του PDMS τροποποιείται χρησιμοποιώντας αέρα/ οξυγόνο/ plasma αργού για να παραχθούν υδρόφιλες ομάδες σιλανίου (SiOH) στην επιφάνεια του.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι μικροροϊκών συστημάτων και βιοαισθητήρων με βάση τα μικροροϊκά συστήματα. Υπάρχουν τρεις τάξεις μικροροϊκών: (i) της συνεχούς ροής, (ii) με βάση τις σταγόνες και (iii) τα ψηφιακά μικροροϊκά. Οι μικροροϊκές συσκευές συνεχούς ροής αποτελούνται από μόνιμα εγχαραγμένα *microchannels* και περιφερειακές συσκευές, όπως οι μικροαντλίες και οι μικροβαλβίδες [16], οι οποίες χρησιμοποιούνται για να χειριστούν τη ροή του ρευστού σ' αυτές τις συσκευές. Τα μικροροϊκά συστήματα με βάση τις σταγόνες βασίζονται στη δημιουργία σταγονιδίων στα *microchannels* χρησιμοποιώντας δύο ή περισσότερα ρευστά. Τα ψηφιακά μικροροϊκά συστήματα, ωστόσο, είναι διαφορετικά καθώς παρέχουν κίνηση και έλεγχο των διακριτών σταγονιδίων σε μία συστοιχία.

3.1 Βιοαισθητήρες

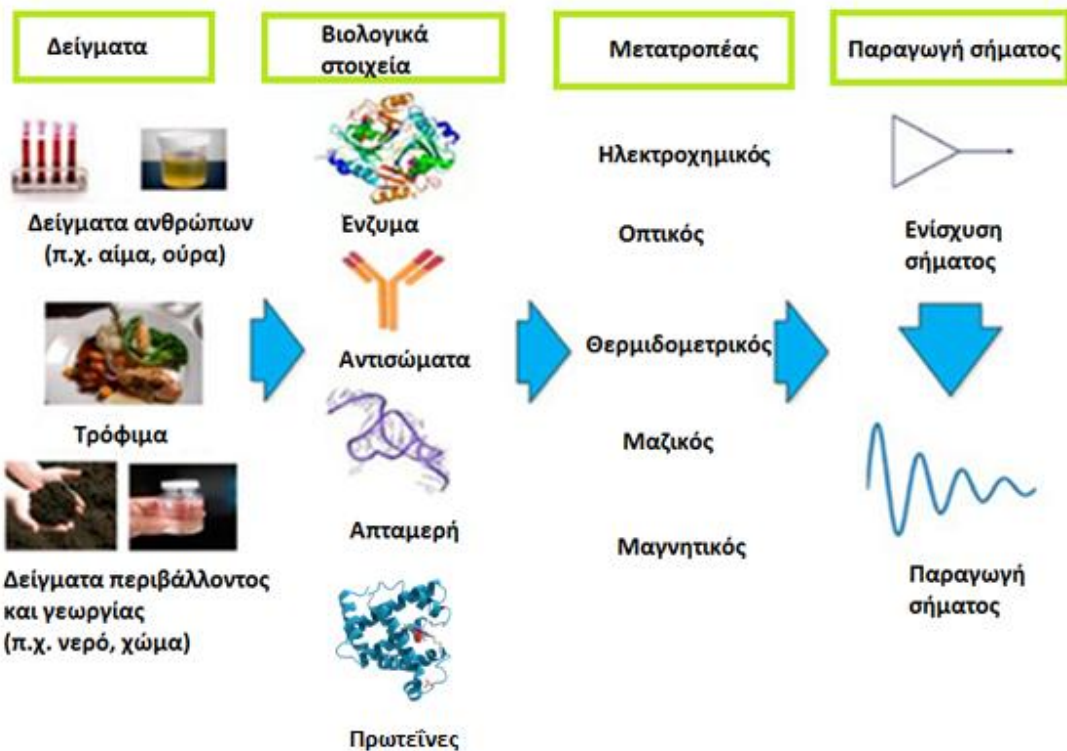
Τις προηγούμενες δύο δεκαετίες, έχει σημειωθεί μεγάλη ανάπτυξη και ενδιαφέρον στην τεχνολογία και στην έρευνα των βιοαισθητήρων. Σύμφωνα με το *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* ένας βιοαισθητήρας ορίστηκε ως "μία συσκευή ανίχνευσης, η οποία είναι ικανή να παρέχει πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης". Αυτό κάνει την τεχνολογία ανίχνευσης ένα ισχυρό εργαλείο ικανό να ανιχνεύει βιολογικά ή χημικά μόρια. Τα δύο σημαντικά σημεία που διακρίνουν τους βιοαισθητήρες είναι ο τύπος του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης ανίχνευσης και οι μετατροπείς.

3.1.1 Κατηγοροποιημένοι βιοαισθητήρες με βάση τον τύπο του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης και τις τεχνικές ακινητοποίησης.

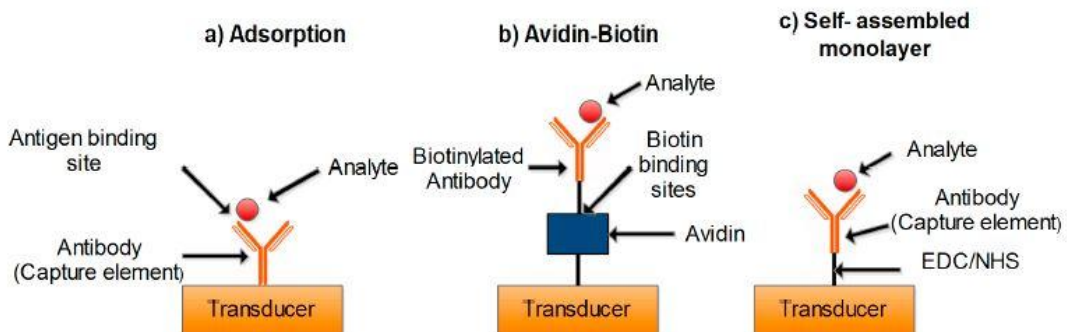
Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης προσφέρει την επιλεκτικότητα και την ειδικότητα που επιτρέπει στο βιοαισθητήρα να ανταποκρίνεται σε ένα ειδικό στόχο ή σε μία ομάδα αναλυτών, μειώνοντας την πιθανότητα ανίχνευσης ανεπιθύμητων ουσιών. Η επιλογή του βιολογικού στοιχείου εξαρτάται από το στοιχείο προς ανίχνευση (π.χ. αντισώματα και απταμερή είναι καταλληλότερα για την ανίχνευση βακτηρίων ή παθογόνων και τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για καταλυτικές αντιδράσεις).

Γενικά, τα βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης ακινητοποιούνται χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους όπως απορρόφηση, ομοιοπολική ένωση,

παγίδευση. Η ακινητοποίηση μέσω ομοιοπολικής ένωσης είναι η συνηθέστερη και προτιμητέα μέθοδος λόγω της σταθερότητας και της μη αναστρεψιμότητας, η οποία εμποδίζει τη διαρροή των βιολογικών στοιχείων από την επιφάνεια στήριξης.



Σχήμα 12: Απεικόνιση των διαφορετικών μερών ενός βιοαισθητήρων περιλαμβάνοντας βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης, μετατροπείς και ανιχνευτές.



Σχήμα 13: Απεικόνιση της συνηθέστερων και κοινών μεθόδων ακινητοποίησης.

3.1.1.1 Βιοαισθητήρες με βάση τα ένζυμα

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να καταλύουν χημικές αντιδράσεις, δηλαδή να επιταχύνουν τις αντιδράσεις, με ένα ρυθμό απορρόφησης που κυμαίνεται από 10^5 έως 10^7 μεγαλύτερο από τον ρυθμό των αντιδράσεων χωρίς καταλύτη. Οι βιοαισθητήρες ενζύμων παρέχουν μία ισχυρή πλατφόρμα για τις POC διαγνώσεις. Σε ένα τέτοιο βιοαισθητήρα, τα ένζυμα ακινητοποιούνται πάνω σε έναν κατάλληλο αισθητήρα ο οποίος παράγει ένα ειδικό σήμα κατά την αντίδραση με ένα

συγκεκριμένο αναλύτη. Ο κύριος σκοπός είναι να μετατρέψει μια αντίδραση σε ένα κατάλληλο αναλυτικό σήμα (ηλεκτροχημικό, θερμοδομετρία). Για παράδειγμα, η οξειδάση της γλυκόζης είναι ένα ένζυμο οξειδοαναγωγάσης το οποίο μεταφέρει ηλεκτρόνια από τη γλυκόζη σε μόριο οξυγόνου. Ο πρώτος βιοανιχνευτής γλυκόζης προτάθηκε το 1962 και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν πολλές συσκευές για την ηλεκτροχημική ανίχνευση της γλυκόζης. Πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της νανοτεχνολογίας και της μηχανικής έχουν ακινητοποιήσει ένζυμα πάνω σε νανοσωματίδια και νανοδομές. Ο Yu κατασκεύασε ένα μικροροϊκό chip πάνω στο οποίο τα ένζυμα ακινητοποιήθηκαν σε νανοσωληνες άνθρακα μονού τοιχώματος στο PDMS κανάλι. Ένα από τα πλεονεκτήματα της χρήσης των ενζύμων ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης είναι η υψηλή επιλεκτικότητά τους σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα ή σε μία κατηγορία στρωμάτων. Το δεύτερο πλεονέκτημα είναι ότι τα ένζυμα μπορούν να παραγάγουν ιόντα, πρωτόνια, θερμότητα, φως, και/ή ηλεκτρόνια [14].

3.1.1.2. Βιοαισθητήρες με βάση τα αντισώματα

Πρόσφατα, τα αντισώματα έχουν εφαρμοστεί ευρέως ως στοιχεία αναγνώρισης στους βιοανιχνευτές στα περισσότερα συστήματα ανίχνευσης. Ένα από τα πλεονεκτήματα του βιοαισθητήρα με βάση τα αντισώματα είναι ότι ο αναλύτης του ενδιαφέροντος δεν χρειάζεται να καθαριστεί πριν την ανίχνευση [16].

3.1.1.3. Βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή

Τις προηγούμενες τρεις δεκαετίες, η έρευνα στα απταμερή έχει αναπτυχθεί δραματικά και γίνεται ένα από τα πιο σημαντικά βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης συγκρινόμενα με τα αντισώματα. Τα απταμερή ορίζονται ως πολυμερή αμινοξέων ή μονόκλωνο νουκλεϊκού οξέος τα οποία έχουν υψηλή επιλεκτικότητα, ειδικότητα προς ένα στόχο-αναλύτη ο οποίος κυμαίνεται από μικρά μόρια έως ολόκληρα κύτταρα.

Τα απταμερή έχουν την ικανότητα να προσδένονται με τους ειδικούς τους linkers και μπορούν να ανιχνευτούν για ένα μεγάλο εύρος αναλυτών όπως τα παθογόνα, οι τοξίνες, οι πρωτεΐνες και ολόκληρα κύτταρα. Μερικά από τα πλεονεκτήματα των απταμερών ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης είναι η σταθερότητα τους, η οικονομική και ραγδαία σύνθεση τους και η ικανότητά τους να μπορούν να τροποποιηθούν με επισήμανση.

3.1.2 Κατηγοροποιημένοι Βιοαισθητήρες με βάση τον τύπο των μετατροπέων

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διαφορετικά είδη ανάλογα το είδος του μετατροπέα που χρησιμοποιείται. Ο μετατροπέας «μεταφράζει»

την αλληλεπίδραση βιομορίου-αναλύτη μέσα από ένα μετρούμενο οπτικό ή ηλεκτρικό σήμα. Ένα μεγάλο εύρος μετατροπέων έχει αναπτυχθεί και εφαρμοστεί, ωστόσο, οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι είναι (α) οι ηλεκτροχημικοί, (β) οι οπτικοί, (γ) οι πιεζοηλεκτρικοί και (δ) οι μαγνητικοί μετατροπείς.

3.1.2.1 Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες

Πρόσφατα, οι περισσότεροι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία βασίζονται στην ηλεκτροχημική ανίχνευση. Η υψηλή ευαισθησία, οι χαμηλές απαιτήσεις ενέργειας και το χαμηλό κόστος κάνουν την ηλεκτροχημική ανίχνευση πολύ συμβατή για την ανάπτυξη των βιοαισθητήρων.

3.1.2.2. Οπτικοί Βιοαισθητήρες

Η οπτική βιοανίχνευση είναι μία αναλυτική τεχνική ανίχνευσης, η οποία έχει ευρεία εφαρμογή στο πεδίο των ιατρικών διαγνώσεων, των αναλύσεων τροφίμων, στο πεδίο του περιβάλλοντος, στην ανακάλυψη φαρμάκων. Οι οπτικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύουν την οπτική αλλαγή λόγω της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στον στόχο ενδιαφέροντος και στο βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης μεταφέροντας το σήμα σε μία μέτρηση η οποία σχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα. Έχουν πολλά πλεονεκτήματα, κάνοντας την οπτική ανίχνευση μία από τις κυριότερες μεθόδους στο πεδίο των βιοαισθητήρων. Μερικά από τα πλεονεκτήματα είναι το χαμηλό όριο ανίχνευσης και ότι έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν μεγάλη ποικιλία αναλυτών ή πολλαπλούς ανιχνευτές ταυτόχρονα με γρήγορο σήμα παρακολούθησης και ανάλυση.

3.1.2.3. Θερμιδομετρικοί Βιοαισθητήρες

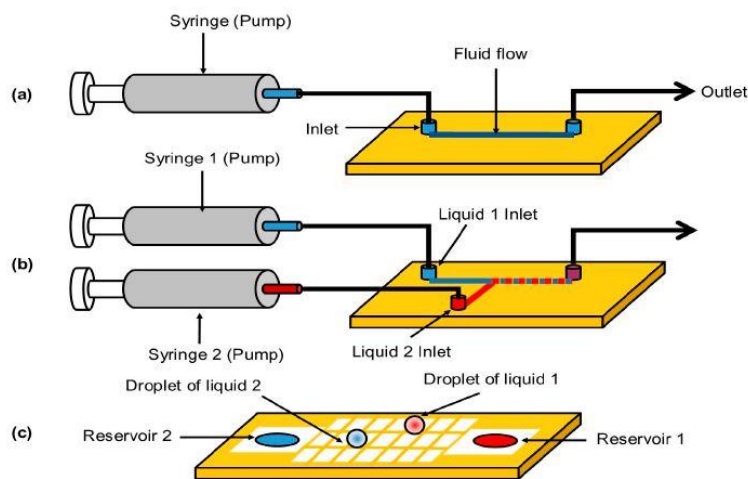
Οι περισσότερες από τις τεχνικές θερμιδομετρικής ανίχνευσης περιλαμβάνουν την παρακολούθηση των παραγόμενων προϊόντων που προκύπτουν από την αντίδραση ανάμεσα στον αναλύτη ενδιαφέροντος και στο βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης. Το προϊόν, το οποίο μπορεί να αναγνωριστεί με γυμνό μάτι ή με τη χρήση ενός οπτικού εργαλείου ανίχνευσης, είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση του αναλύτη.

3.1.2.4. Μαγνητικοί Αισθητήρες

Τα βιομόρια δεν έχουν μαγνητικές ιδιότητες, ως εκ τούτου, η προσθήκη των μαγνητικών μικρό/νανοσφαιριδίων στα δείγματα βιομορίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαχωρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν ένα γνωστό αναλύτη μέσα σε ένα δεδομένο δείγμα. Ένας αριθμός μαγνητικών πλατφορμών έχει χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύει έναν αριθμό στόχων όπως οι πρωτεΐνες, τα καρκινικά κύτταρα, ένζυμα και παθογόνα.

3.2 Μικροροϊκά Συστήματα

Πολλές μικροροϊκές συσκευές έχουν αναπτυχθεί για διαφορετικές βιολογικές και χημικές εφαρμογές. Οι περισσότερες μικροροϊκές συσκευές βασίζονται σε συστήματα συνεχούς ροής όπου τα κανάλια είναι της τάξης του μικρόμετρου. Αυτά τα microchannels κατασκευάζονται κυρίως χρησιμοποιώντας μεθόδους λιθογραφίας. Στη πρώτη γενιά των μικροροϊκών με βάση τα σταγονίδια χρησιμοποιήθηκε η συνεχή ροή δύο ή περισσότερων ρευστών διασταυρωμένα σε μία σύνδεση-T για να δημιουργήσει ξεχωριστές σταγόνες οι οποίες απομονώθηκαν η μία από την άλλη μέσω ενός υγρού. Για περαιτέρω μείωση της κατανάλωσης όγκου, μία νέα γενιά μικροροϊκών συστημάτων με βάση τα σταγονίδια, τα οποία καλούνται ψηφιακά μικροροϊκά (DMF), εισήχθη στις αρχές του 2000. Αντί να έχουν συνεχή ροή σταγονιδίων στα microchannels, τα DMF συστήματα δημιουργούν σταγονίδια σε μία σειρά από ηλεκτροστατικά ενεργά ηλεκτρόδια. Τα τελευταία χρόνια, αυτά τα συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλές εφαρμογές βιοανίχνευσης καθώς επιτρέπουν την παράλληλη διαδικασία των πολλαπλών δειγμάτων στο ίδιο chip. Παρακάτω παριστάνονται τα τρία είδη μικροροϊκών συστημάτων που αναφέρθηκαν.



Σχήμα 14: Απεικόνιση των μικροροϊκών (α) συνεχούς ροής, (β) με βάση τα σταγονίδια, (γ) ψηφιακών.

Η κατασκευή και η σχεδίαση των μικροροϊκών πλατφόρμων για βιοανίχνευτές χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά τις διαστάσεις, τα υλικά και τη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την κατασκευή ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη βιοσυμβατότητα της συσκευής. Το γυαλί και το πυρίτιο είναι τα υλικά που χρησιμοποιούνται περισσότερο για την κατασκευή και σχεδιασμό αυτών των πλατφορμών. Το χαμηλό κόστος των πολυμερών όπως το PMMA και το PDMS έχουν άριστες χημικές, φυσικές και μηχανικές ιδιότητες και έχουν μετατραπεί σε πιο δημοφιλή υλικά για το σχεδιασμό των μικροροϊκών συσκευών.

3.3 Ενσωμάτωση μικροροϊκών συστημάτων στη τεχνολογία των βιοανιχνευτών

Πρόσφατα, η σημαντική απαίτηση και προσπάθεια για συγχώνευση των βιοανιχνευτών στην τεχνολογία lab-on-chip (LOC) χρησιμοποιώντας μικροροϊκά συστήματα έχει υλοποιηθεί προσφέροντας πολλά οφέλη στην τεχνολογία βιοαισθητήρων. Η ενσωμάτωση αυτή προσφέρει μία ολοκληρωμένη εναλλακτική λύση μικρών διαστάσεων επιτυγχάνει σημαντική μείωση στο δείγμα, στα αντιδρώντα και στη κατανάλωση ενέργειας. Επιπλέον, μπορεί να μειωθεί το κόστος και να αυξηθεί η επιλεκτικότητα και το όριο ευαισθησίας ανίχνευσης συγκρινόμενο με τις κανονικές μεθόδους ανίχνευσης.

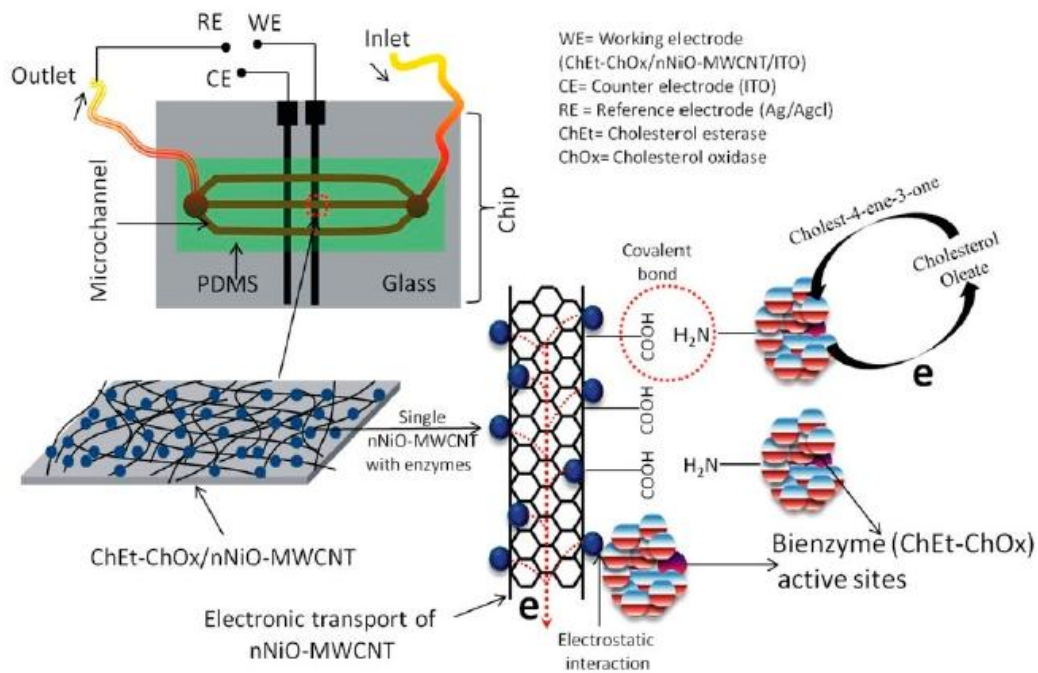
Λόγω του μικρού μεγέθους των μικροσυστημάτων, ένας μικροροϊκός βιοανιχνευτής μπορεί να εκτελέσει μία πλήρη ανάλυση περιλαμβάνοντας συνεχή δειγματοληψία, διαχωρισμό του δείγματος, ανάμειξη. Επίσης, προσφέρουν ενισχυμένη αναλυτική απόδοση, ανίχνευση πραγματικού χρόνου, γρήγορους ρυθμούς αντίδρασης και φορητότητα, κάνοντας την ανίχνευση κατάλληλη για point of care (POC) εφαρμογές. Στη συνέχεια, θα αναφερθούν παραδείγματα βιοαισθητήρων με διαφορετικά είδη μικροροϊκών συστημάτων, χρησιμοποιώντας το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης ως στρώμα ανίχνευσης στο βιοαισθητήρα.

3.3.1 Βιοανιχνευτές με βάση τα μικροροϊκά συνεχούς ροής

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, τα μικροροϊκά συνεχούς ροής έχουν παρουσιάσει βελτίωση. Ακολουθούν παραδείγματα βιοαισθητήρων με μικροροϊκά συνεχούς ροής χρησιμοποιώντας διαφορετικά βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης.

3.3.1.1. Βιοαισθητήρες με βάση τα ένζυμα και μικροροϊκά συνεχούς ροής

Αρκετά παραδείγματα εφαρμογών στην τεχνολογία βιοανιχνευτών έχουν δημοσιευτεί και αποδειχθεί στο παρελθόν. Για παράδειγμα, ο Ali έκανε ενσωμάτωση ενός βιοαισθητήρα με νανοσύνθετα τα οποία ενεργοποιούνται με βιοένζυμα. Κατασκεύασαν μία επιτυχή διάταξη και ενσωμάτωση ενός καινοτόμου biochip με μικροροϊκά χρησιμοποιώντας νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και νανοσωματίδια οξειδίου του νικελίου (nNiO). Χρησιμοποιήθηκε φωτολιθογραφική τεχνική για να ενσωματώσει το νανοσύνθετο με τα PDMS microchannels. Η επιφάνεια του νανοσύνθετου-microchannels ενεργοποιήθηκε με δύο ένζυμα περιλαμβάνοντας οξειδάση χοληστερόλης (ChOx) και εστεράση χοληστερόλης (ChEt). Το chip κατασκευάστηκε για να μετρά την χρονοαμπερομετρική αλλαγή παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της χοληστερόλης.



Σχήμα 15: Απεικόνιση του βιοαισθητήρα με μικροροϊκό από νανοσύνθετα ενεργοποιημένα με βιοένζυμα για την ανίχνευση χοληστερόλης.

3.3.1.2. Βιοαισθητήρες με βάση αντισώματα και μικροροϊκά συνεχούς ροής

Ένα παράδειγμα για την ενσωμάτωση μιας μικροροϊκής συσκευής συνεχούς ροής και βιοαισθητήρα χρησιμοποιώντας αντισώματα ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης υλοποιήθηκε από το Lee για την ανίχνευση καρκίνου του στήθους. Αυτοί κατάφεραν να αναπτύξουν ένα αυτοματοποιημένο μικροροϊκό βιοαισθητήρα lab on a chip με πολλαπλά κανάλια για την ανίχνευση μιας σειράς δειγμάτων. Επιτύγχαναν υψηλή ειδικότητα και επιλεκτικότητα ανιχνεύοντας ακριβή ποσά διαλύματος ανοσοσφαιρίνης IgG χρησιμοποιώντας μικροαντλίες και μικροβαλβίδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μικροροϊκή πλατφόρμα ανίχνευσε επιτυχώς μόνο τη παρουσία της ανοσοσφαιρίνης IgG στα δείγματα. Το καινοτόμο ολοκληρωμένο σύστημα παρέχει υψηλή επιλεκτικότητα και άριστη ευαισθησία μετατρέποντας την ως μία γρήγορη και χαμηλού κόστους πλατφόρμα για την ανίχνευση βιολογικών δειγμάτων και αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης με πρωτεΐνη.

3.3.1.3. Βιοαισθητήρες με βάση απταμερή και μικροροϊκά συνεχούς ροής

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα που καθιστούν τα απταμερή προτιμότερα βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης σε σχέση με τα αντισώματα. Αυτά τα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν την απλότητα στη δομή τους και την ικανότητα να σχεδιαστούν με ένα τρόπο ώστε να αποδώσουν ένα οπτικό ή ηλεκτρικό σήμα, χωρίς τη χρήση επισήμανσης ή στάδια πλυσίματος, μειώνοντας το κόστος και το χρόνο. Ένα παράδειγμα για έναν αισθητήρα με βάση ένα απταμερές αναπτύχθηκε από το

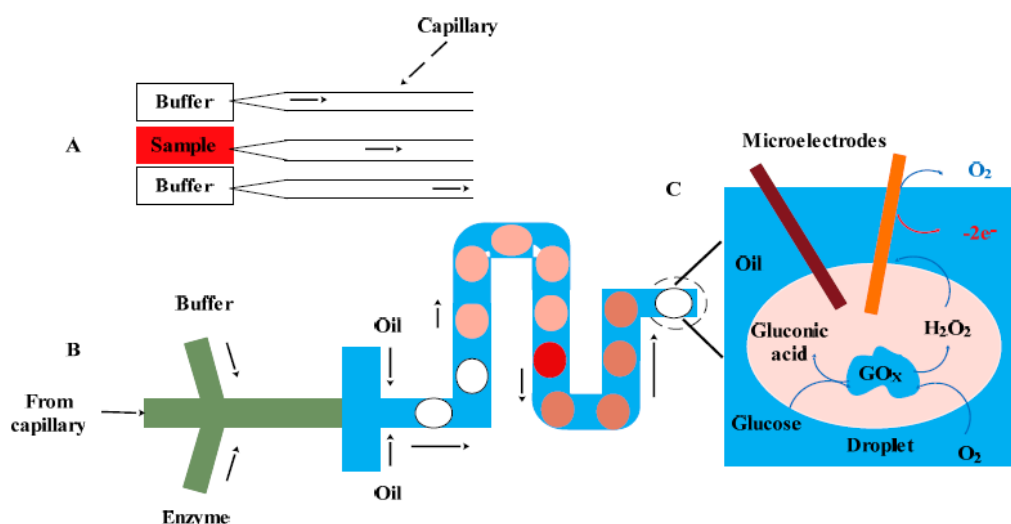
Zhou για συνεχή ανίχνευση ζωντανών κυττάρων. Για την συσκευή χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα γυαλιού με ηλεκτρόδια χρυσού και δύο στρώματα PDMS. Τα δύο στρώματα PDMS σχεδιάστηκαν έτσι ώστε το πρώτο να περιλαμβάνει τα microchannels και τα ημικύκλια microcups, και το δεύτερο στρώμα κυρίως χρησιμοποιείται για χειρισμό.

3.3.2 Βιοανιχνευτές με μικροροϊκά σταγονιδίων

Τα μικροροϊκά σταγονιδίων είναι ένα από τα πιο σημαντικά συστήματα που ενσωματώνονται στην τεχνολογία των βιοανιχνευτών. Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκαν ως μία πλατφόρμα για ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών, της βιοϊατρικής, της ασφάλειας με μία καλύτερη φορητότητα και χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας. Ακολουθούν παραδείγματα με μικροροϊκά σταγονιδίων χρησιμοποιώντας διαφορετικά στοιχεία αναγνώρισης.

3.3.2.1 Βιοαισθητήρες με βάση τα ένζυμα και μικροροϊκά σταγονιδίων

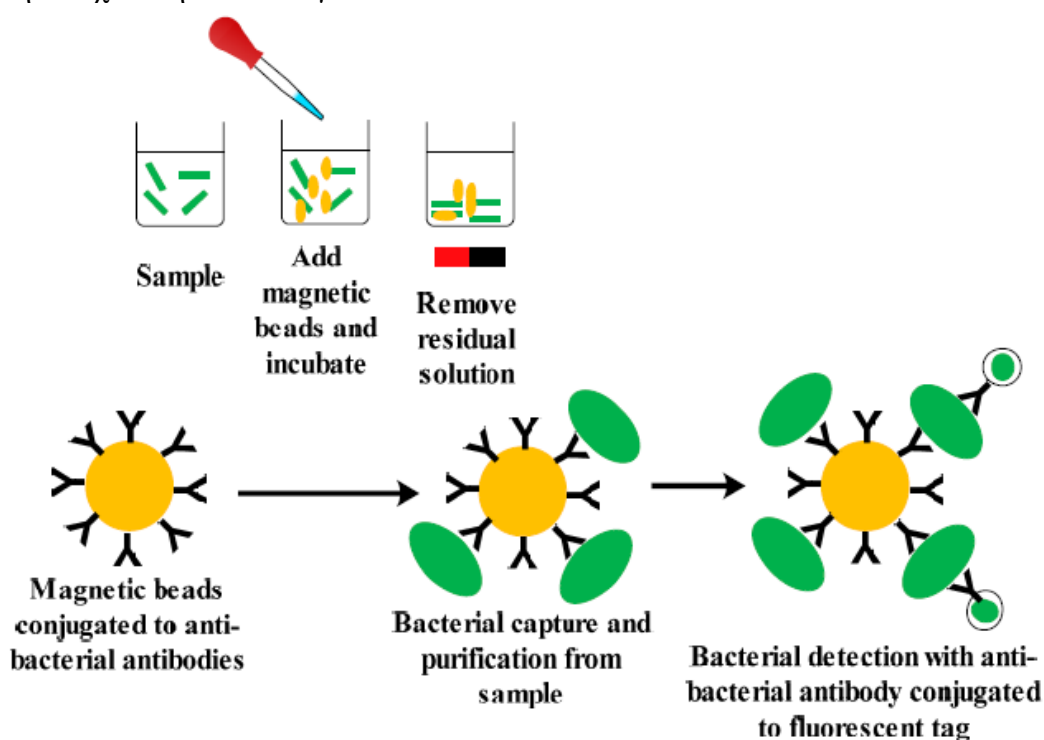
Ένα παράδειγμα μικροροϊκού ηλεκτροχημικού αισθητήρα για την ανίχνευση γλυκόζης αποδείχθηκε από τον Gu. Ηλεκτροχημική φασματοσκοπία αντίστασης χρησιμοποιήθηκε για να μετρήσουν την αλλαγή στο ηλεκτροχημικό ρεύμα λόγω της οξείδωσης της β-D-glucose. Το ηλεκτροχημικό σύστημα βιοανίχνευσης παρέχει μία υψηλή ευαισθησία και ένα χαμηλού κόστους αισθητήρα γλυκόζης.



Σχήμα 16: Απεικόνιση του (a) ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα με βάση τα σταγονίδια, (b) ηλεκτροχημικός αισθητήρας με βάση τα σταγονίδια, και (c) έλεγχος της γλυκόζης στο σταγονίδιο.

3.3.2.2. Βιοαισθητήρες με βάση τα αντισώματα και μικροροϊκά σταγονιδίων

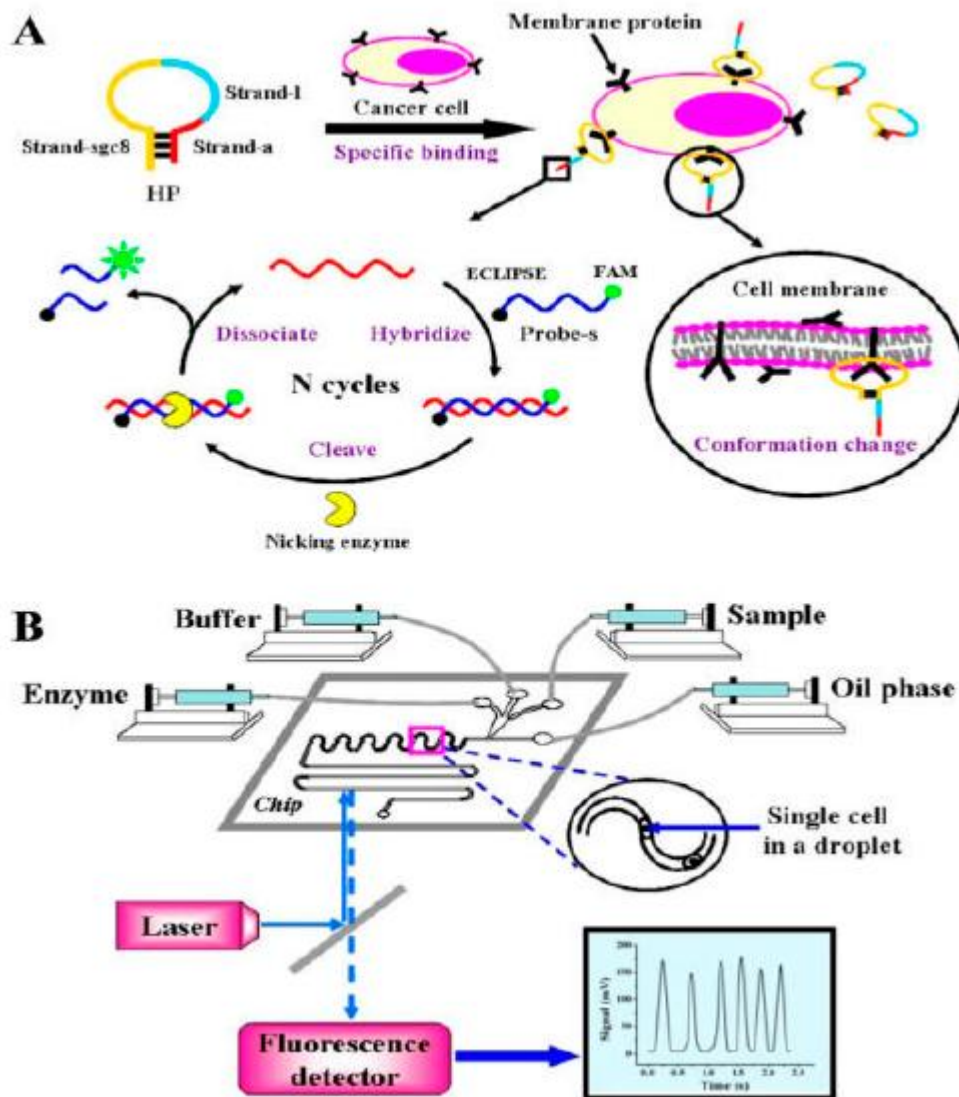
Ένας νέος μικροροϊκός βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε από τον Golberg, χρησιμοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια συζευγμένα με αντισώματα ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης τα οποία είναι ειδικά για την σύλληψη και ανίχνευση του βακτηρίου E.Coli στο πόσιμο νερό. Αρχικά, τα αντισώματα anti-E.Coli συζευγμένα με μαγνητικά σφαιρίδια χρησιμοποιήθηκαν για να αιχμαλωτίσουν επιλεκτικά και να απομονώσουν το βακτήριο E.Coli από το νερό. Τα απομονωμένα βακτήρια ενθυλακώνονται με επισημασμένα αντισώματα anti-E.Coli στα σφαιρίδια και αναλύονται χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο φθορισμού. Η διαδικασία ανίχνευσης απαιτεί μόνο 8 ώρες από την συλλογή δείγματος, τη προ-συγκέντρωση, την σύλληψη και την ανίχνευση. Το σύστημα έδειξε μία καλή δυναμική ως προς την ανάπτυξη αυτών των μικροροϊκών βιοαισθητήρων για την παρακολούθηση των παθογόνων στο πόσιμο νερό συγκρινόμενο με τις συμβατές μεθόδους οι οποίες απαιτούν 2-4 ημέρες για την ανίχνευση των παθογόνων.



Σχήμα 16: Απεικόνιση του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα σφαιριδίων για την ανίχνευση του βακτηρίου E.Coli χρησιμοποιώντας σφαιρικά σφαιρίδια συζευγμένα με αντισώματα ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης.

3.3.2.3. Βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή και μικροροϊκά σταγονίδια

Η ανίχνευση της πρωτεΐνης PTK7 των μονών ζωντανών κυττάρων αποδείχθηκε χρησιμοποιώντας μικροροϊκά σταγονίδια απταμερών. Τα σταγονίδια λειτουργούν ως ανεξάρτητοι μικροαντιδραστήρες όπου η αντίδραση ενίσχυσης φθορισμού έλαβε χώρα μεταξύ του απταμερούς και του ενζύμου, επιτρέποντας μία ανίχνευση υψηλής απόδοσης.



Σχήμα 17: (a) Απεικόνιση της ανίχνευσης της πρωτεΐνης σε ζωντανά κύτταρα χρησιμοποιώντας απταμερές και ένζυμο ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης, (b) απεικόνιση του υπόλοιπου μικροροϊκού συστήματος σταγονιδίων.

3.3.3 Βιοανιχνευτές με ψηφιακά μικροροϊκά

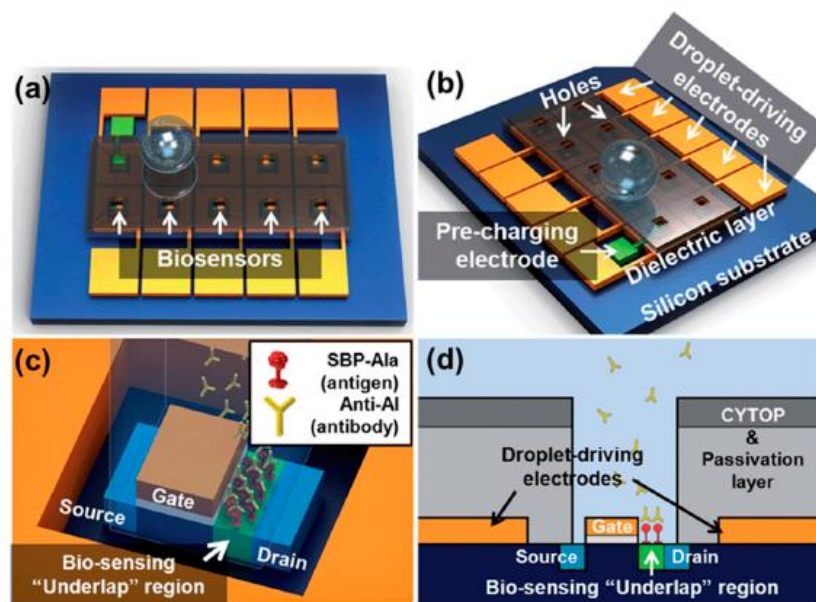
Τα ψηφιακά μικροροϊκά είναι ένας τύπος της πλατφόρμας, συμβατός με ένα ευρύ φάσμα μεθόδων ανίχνευσης (όπως η οπτική και ηλεκτροχημική ανίχνευση) και εξαλείφει τη χρήση των συμβατών αντλιών, βαλβίδων ή καναλιών. Ενσωματώνοντας τους βιοαισθητήρες με τις ψηφιακές μικροροϊκές πλατφόρμες έχει ενισχυθεί η λειτουργία διαφορετικών ροϊκών εργασιών όπως η μεταφορά, η ανάμειξη, ο διαχωρισμός. Παρακάτω θα αναφερθούν παραδείγματα βιοαισθητήρων ψηφιακών μικροροϊκών χρησιμοποιώντας διαφορετικά βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης.

3.3.3.1. Ενσωματωμένα ψηφιακά μικροροϊκά σε βιοαισθητήρες με βάση τα ένζυμα

Η ενσωμάτωση του συστήματος μετρήσεων οπτικής απορρόφησης με ψηφιακά μικροροϊκά για την ανίχνευση μεταβολιτών χρησιμοποιώντας οξειδάση της γλυκόζης ως βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης έχει δημοσιευτεί από τον Stinivasan.

3.3.3.2. Ενσωματωμένα ψηφιακά μικροροϊκά σε βιοαισθητήρες με βάση τα αντισώματα

Η ενσωμάτωση ενός βιοαισθητήρα FET σε μία τεχνολογία ψηφιακού μικροροϊκού χρησιμοποιώντας αντισώματα ως βιολογικά στοιχεία αναγνώρισης δημοσιεύτηκαν από τον Choi. Ανέπτυξαν ένα νέο βιοαισθητήρα με βάση ένα ψηφιακό μικροροϊκό FET για πραγματικού χρόνου ανίχνευση των αντισωμάτων της γρίπης των πτηνών (anti-AI). Η συσκευή λειτουργεί βάσει της μέτρησης του ρεύματος από το βιοαισθητήρα FET χωρίς τη χρήση επισημάνσεων. Η ηλεκτροδιαβροχή πάνω σε διηλεκτρικό (electrowetting on dielectric, EWOD) [17], δηλαδή η τροποποίηση της ικανότητας διαβροχής μιας επιφάνειας με την εφαρμογή τάσης χρησιμοποιήθηκε για να μεταφερθεί η σταγόνα που περιέχει τον αναλύτη anti-AI από την είσοδο στην περιοχή ανίχνευσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία μείωση στο ρεύμα μέχρι τη σύνδεση του στοχευμένου αντιγόνου με τα ειδικά αντισώματα anti-AI.



Σχήμα 18: Απεικόνιση του αναπτυγμένου βιοαισθητήρα με ψηφιακό μικροροϊκό (a) η κάτοψη (b) πλευρική όψη (c) απεικόνιση σε μεγέθυνση (d) η διατομή

3.3.3.3. Ενσωματωμένα ψηφιακά μικροροϊκά σε βιοαισθητήρες με βάση τα απταμερή

Τα απταμερή σε σύζευξη με αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί στους βιοαισθητήρες με ψηφιακά μικροροϊκά. Μία σταγόνα με φθορίζον επισημασμένο απταμερές ανοσοσφαιρίνης IgE και μαγνητικά νανοσωματίδια επικαλυμμένα με αντισώματα anti IgE συγχωνεύτηκαν με μία δεύτερη σταγόνα περιέχοντας μη επισημασμένη IgE. Το μίγμα δέχτηκε μεγάλη δύναμη από ένα μόνιμο μαγνήτη για να κρατά τα μαγνητικά σφαιρίδια. Οι σταγόνες του ρυθμιστικού διαλύματος περάστηκαν πάνω από τα σφαιρίδια για να απομακρύνει τα μη δεσμευμένα σφαιρίδια [16].

Ο Kazuaki Furukawa δημιούργησε ένα σύστημα ανίχνευσης πρωτεΐνης στην επιφάνεια του GO. Το GO στερεώνεται σε ένα στερεό υπόστρωμα μέσω χημικής τροποποίησης. Πιο συγκεκριμένα, το GO τοποθετείται στο στερεό υπόστρωμα μέσω της επίστρωσης με περιστροφή του υδάτινου διαλύματος GO σε μία υδρόφιλη επιφάνεια όπως ένα στρώμα πυριτίου (Si) με διοξείδιο πυριτίου (SiO_2) (SiO_2/Si) και quartz. Η πυκνότητα των φύλλων GO μπορούν να ελεγχθούν από τη συγκέντρωση του διαλύματος και τις συνθήκες της επίστρωσης.

Το γραφένιο εμφανίζει καλές ηλεκτρονικές ιδιότητες με πολύ υψηλές κινητικότητες μεταφοράς φορτίου, παρακινώντας τις ερευνητικές ομάδες να εφαρμόσουν την αγωγιμότητά του για ποικίλες ανιχνεύσεις βιομορίων όπως η γλυκόζη, οι πρωτεΐνες, το DNA ως βιοηλεκτρονική συσκευή. Η άλλη κατεύθυνση που προκάλεσε μεγάλο ενδιαφέρον είναι η εφαρμογή του γραφενίου σε βιοανίχνευση με φθορισμό [18].

Το Deoxyribonucleic acid (DNA) είναι ένα πολυμερές αποτελούμενο από τέσσερις βάσεις και σχηματίζει μία δομή διπλής έλικας με το συμπληρωματικό DNA. Το DNA καλείται συνήθως και απταμερές και μπορεί να συνδεθεί με ένα μόριο πρωτεΐνης για να σχηματίσει μία σύνθετη δομή. Οι βιοαισθητήρες οι οποίοι χρησιμοποιούν τα απταμερή συνήθως αναφέρονται ως ανοσοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται στην ανοσοχημική αντίδραση περιλαμβάνοντας το αντιγόνο και το αντίσωμα ως στοιχείο αναγνώρισης, το οποίο έρχεται χωρικά σε επαφή με την επιφάνεια του ανιχνευτή, δημιουργώντας μία υψηλά ειδική αντίδραση, κάνοντας την ανοσοδοκιμασία μία υψηλά επαναληπτική και συγκεκριμένης μορφής αντίδραση, κατάλληλη για εφαρμογές βιοανίχνευσης. Ωστόσο, τα βιολογικά στοιχεία όπως τα αντισώματα είναι ακριβά και οι συμβατές ανοσοδοκιμασίες είναι γνωστό ότι είναι χρονοβόρες. Η ανίχνευση έγινε χρησιμοποιώντας ανοσοαισθητήρα GO με στερεό υπόστρωμα και όχι σε υδατικό διάλυμα όπως συνηθίζεται.

Το μοναδικό χαρακτηριστικό του συστήματος είναι ότι ο ανοσοαισθητήρας GO σταθεροποιήθηκε σε ένα στερεό υπόστρωμα. Αυτό απαιτεί την εισαγωγή μιας μικροροϊκής συσκευής στον ανοσοαισθητήρα GO και να επεκταθεί η τεχνολογία σε εφαρμογές με on chip συσκευές. Αυτό έχει ως προϋπόθεση ο ανοσοαισθητήρας GO να εξοπλιστεί με microchannels.

Αυτές οι εφαρμογές ανίχνευσης απαιτούν πάντα υψηλή ευαισθησία. Θεωρείται αναμενόμενο ότι η υψηλότερη ευαισθησία επιτυγχάνεται με τη χρήση πυκνών επικαλυμμένων υποστρωμάτων με GO παρά με απομονωμένο GO [20].

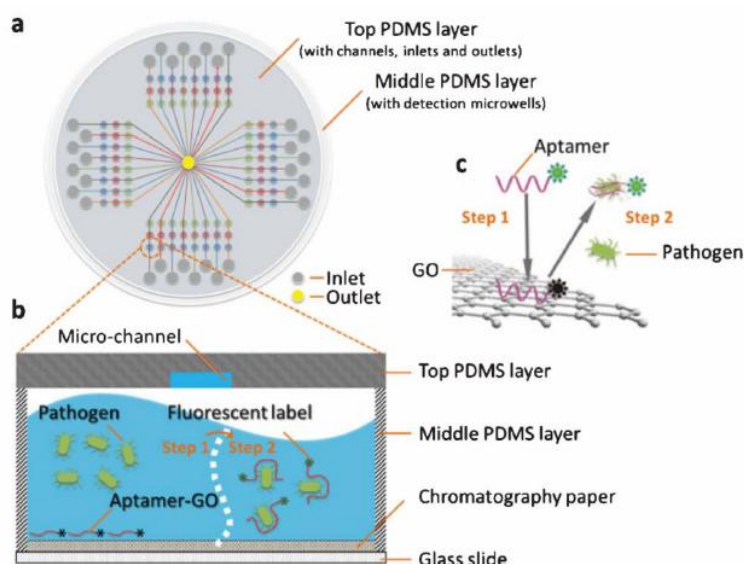
Επιπλέον, η ανάπτυξη στην τεχνολογία των μικροροϊκών έδωσαν την ευκαιρία να ενσωματώσουν τη φωτονική και τα μικροροϊκά στη μικροκλίμακα, με αποτέλεσμα ένα νέο πεδίο έρευνας που ονομάζεται optofluidics. Τα στοιχεία optofluidics μπορούν συνήθως να χρησιμοποιηθούν για να χειριστούν το φως μέσα στο microchannel που πρόσφατα κατασκευάστηκαν.

Στη συνέχεια, οι μικροσυστοιχίες είναι ένα ισχυρό εργαλείο για παράλληλη έρευνα και παράλληλη ανίχνευση βιομορίων όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Οι μικροσυστοιχίες είναι μικροσκοπικές πλευρές οι οποίες περιέχουν σειρές από ακινητοποιημένα βιομόρια τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν από ένα στόχο επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία. Η σύνδεση ανάμεσα στον ανιχνευτή και στον επισημασμένο στόχο μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να ανιχνευθεί από τη μέτρηση της αύξησης της πυκνότητας φθορισμού. Η μικροσυστοιχία, επιπλέον, παρέχει μία ευκαιρία για ανίχνευση πραγματικού χρόνου των χιλιάδων μορίων με αποτέλεσμα να εφαρμόζεται σε διαγνώσεις και στην ανακάλυψη φαρμάκων. Ο Sochol ανέπτυξε μία μικροροϊκή πλατφόρμα η οποία χρησιμοποιεί μία συστοιχία μικροσφαιριδίων για να αυξήσει τον παραλληλισμό μιας αντίδρασης.

Τέλος, οι μη επεμβατικοί βιοαισθητήρες έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον στην ανάπτυξη των βιοαισθητήρων μικρών διαστάσεων λόγω της ανώδυνης, συνεχούς παρακολούθησης του ασθενή. Ο πόνος, ο ερεθισμός και οι πιθανότητες λοίμωξης εξακολουθούν να αποτελούν ανησυχίες για τη μη επεμβατική προσέγγιση. Έχει κατασκευαστεί μη επεμβατικός βιοαισθητήρας για την παρακολούθηση της γλυκόζης και μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης μεταβάλλοντας την αντίσταση. Ο Krait ανέπτυξε ένα μη επεμβατικό αισθητήρα για να ανιχνεύει στοιχεία του αίματος όπως την αιμοσφαιρίνη, τον κορεσμό οξυγόνου και τους παλμούς. Αυτός ο αισθητήρας βασίζεται στη μέτρηση του συντελεστή απορρόφησης του αίματος, ο οποίος διαφέρει ανάλογα με το μήκος κύματος [14].

Επίσης, άλλα παραδείγματα χρησιμοποιώντας ως στοιχείο ανίχνευσης τα απταμερή αναφέρονται παρακάτω. Ο Peng Zuο ανέφερε ένα PDMS/paper/glass μικροροϊκό σύστημα ενσωματωμένο με νανοαισθητήρες graphene oxide με απταμερές για την ανίχνευση παθογόνων. Στη περίπτωση αυτή, έγινε προσπάθεια ανίχνευσης γαλακτοβάκιλλου οξύφιλου (*Lactobacillus acidophilus*). Επίσης, αυτή η τεχνική ανίχνευσε επιτυχώς την ασθένεια του σταφυλόκοκκου (*Staphylococcus aureus*) και για την *Salmonella enterica*. Ενσωμάτωσαν τον βιοαισθητήρα οξειδίου του γραφενίου (GO) με απταμερές στο chip, χρησιμοποιώντας την ευαίσθητη στρατηγική ενεργοποίησης που βασίζεται στο φθορισμό του GO όταν απορροφήσει και αποβάλλει τα φθορίζοντα απταμερή.

Το σχήμα που ακολουθεί δείχνει την σταδιακή ανίχνευση παθογόνων χρησιμοποιώντας GO με απταμερή σε ένα μικροροϊκό σύστημα. Το GO είναι ένα διδιάστατο νανοϋλικό με ένα εξαιρετική ακινησία απόσβεσης φθορισμού εξαρτώμενη από την απόσταση, δηλαδή τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων νουκλεοτιδίων και του φύλλου GO. Ο φθορισμός αποσβένεται όταν τα επισημασμένα με φθορισμό απταμερή απορροφώνται από την επιφάνεια GO (φθορισμός "OFF"). Εκτός από τις πολύπλοκες διαδικασίες τροποποίησης της επιφάνειας για την ακινητοποίηση απταμερών, χρησιμοποιείται μία απλή στρατηγική για να ενσωματώσει το βιοαισθητήρα GO με απταμερή σε ένα μικροροϊκό biochip μέσω ενός χαρτιού χρωματογραφίας το οποίο λειτουργεί ως 3D υπόστρωμα για το νανο-αισθητήρα. Το μικροροϊκό σύστημα αποτελείται από δύο PDMS στρώματα ως άνω και ενδιάμεσο στρώμα και μία γυάλινη πλάκα ως στρώμα βάσης. Το άνω στρώμα PDMS σχεδιάστηκε για τη προμήθεια αντιδραστηρίων. Έχει 32 microchannels, είσοδο και μία δεξαμενή αποβλήτων στο κέντρο. Το ενδιάμεσο στρώμα, λέγεται στρώμα επώασης, έχει τέσσερα 3x8 microwells όπου η επώαση και η ανίχνευση διεξάγονται.

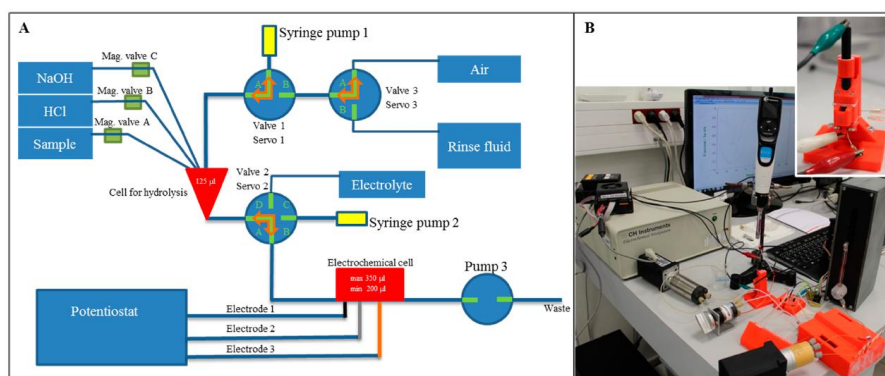


Σχήμα 21: (a) Η διάταξη του μικροροϊκού microchip, (b) και (c) η απεικόνιση της ανίχνευσης βάσει της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο GO, των απταμερών και των παθογόνων.

Έχει αναπτυχθεί μία απλή, γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων χρησιμοποιώντας ένα PDMS/paper hybrid μικροροϊκό σύστημα ενσωματωμένο με βιοανιχνευτές GO. Χρησιμοποιήθηκε το *L. acidophilus* ως βακτήριο για να αναπτύξει τη μικροροϊκή πλατφόρμα. Επιτυχώς, αυτή η μέθοδος επεκτάθηκε για την ανίχνευση δύο ακόμη παθογόνων των *S. aureus* and *S. enterica*. Αυτό το μικροροϊκό σύστημα έχει το πλεονέκτημα όπως ότι είναι απλό στη χρήση καθώς η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών απαιτεί ένα βιοαισθητήρα GO με απταμερή. Η διαδικασία είναι γρήγορη γιατί απαιτεί μόνο 10 λεπτά για να είναι έτοιμο το μικροροϊκό biochip για να χρησιμοποιηθεί. [21].

Η Jana Vlachova χρησιμοποίησε τροποποιημένο οξείδιο γραφενίου για να αναπτύξει μία απλή και υψηλής ευαισθησίας μέθοδο για την ανίχνευση της αδενίνης σε ένα υδρολυμένο δείγμα miRNA. Το τροποποιημένο οξείδιο γραφενίου διαλύθηκε αρχικά σε διμεθυλοφορμαμίδιο και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από Nafion. Το μείγμα εναποτέθηκε πάνω σε ένα υαλώδες υπόστρωμα άνθρακα. Η παραπάνω τροποποίηση επιτρέπει την ανίχνευση της αδενίνης σε ένα δείγμα miRNA και είναι δυνατό να ανιχνεύει και άλλες νουκλεϊκές βάσεις. Επιπλέον, η υδρόλυση και η ηλεκτροχημική ανίχνευση διεξήχθη μέσα στο μικροροϊκό chip.

Η σύνδεση της διαδικασίας υδρόλυσης και της ηλεκτροχημικής ανίχνευσης των νουκλεοβάσεων ήταν μία πρόκληση και ως εκ τούτου σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε ένα μικροροϊκό σύστημα. Αυτό το μικροροϊκό σύστημα αποτελείται από δύο βασικά μέρη: το πρώτο ήταν για την υδρόλυση και το δεύτερο για την ηλεκτροχημική ανίχνευση. Το σύστημα ροής πραγματοποιήθηκε από πλαστικά σωληνάκια (tubes). Η κίνηση των ρευστών έγιναν χρησιμοποιώντας τρεις σύριγγες, τρεις βαλβίδες και τρεις μαγνητικές βαλβίδες. Το μικροροϊκό chip τυπώθηκε από έναν 3D εκτυπωτή και ως υλικό κατασκευής επιλέχθηκε το ακρυλονιτρίλιο βουταδιένιο στυρένιο (acrylonitrile butadiene styrene) λόγω της θερμικής και χημικής σταθερότητας.



Σχήμα 22: (a) Το σχήμα του μικροροϊκού συστήματος αποτελούμενο από τα μέρη της υδρόλυσης και της ανίχνευσης. (b) Εικόνα του μικροροϊκού συστήματος και λεπτομερής εικόνα του chip με ενσωματωμένα ηλεκτρόδια.

Το πρώτο μέρος του συστήματος σχεδιάστηκε για τη διαδικασία της υδρόλυσης περιέχοντας τρεις εισόδους και μία έξοδο στο δεύτερο μέρος του συστήματος. Ο θάλαμος αποτελείται από τρία βασικά μέρη: το κάλυμμα, το κύριο μέρος και τους θερμαντήρες. Ο θάλαμος υδρόλυσης είναι κωνικού σχήματος όγκου 125µL για την όσο δυνατό μεγαλύτερη εκροή. Στο κύριο μέρος, υπάρχουν αισθητήρες (του οποίου η αντίσταση είναι γραμμικά εξαρτώμενη από τις αλλαγές της θερμοκρασίας). Αυτοί οι τρεις αισθητήρες τοποθετήθηκαν σε διαφορετική ακτίνα από το κέντρο, όπου τοποθετείται το δείγμα. Στο επίπεδο της κάλυψης υπάρχουν οπές και

η είσοδος στο θάλαμο υδρόλυσης. Ο θερμαντήρας έχει τετράγωνο σχήμα όπου στο κέντρο του υπάρχει ένας χώρος για το κύριο μέρος και το μέρος του καλύμματος. Το μέρος αυτό του συστήματος σχεδιάστηκε για την υδρόλυση του δείγματος η οποία ελέγχεται από μία μονάδα που ρυθμίζει τη θερμοκρασία στο chip στην απαιτούμενη θερμοκρασία των 100 °C.

Το δεύτερο μέρος του chip σχεδιάστηκε για ηλεκτροχημική ανίχνευση. Υπάρχουν δύο είσοδοι και μία έξοδο. Τα κύρια μέρη της ανίχνευσης είναι ο holder, ο χώρος ανίχνευσης και η κάλυψη με πίεση. Ο holder κρατά το χώρο ανίχνευσης σε γωνία 10° από το οριζόντιο επίπεδο στο οποίο βρισκόταν και περιέχει οπές οι οποίες πιέζουν όλα τα μέρη ταυτόχρονα για να παραμένουν σταθερά. Τέλος, ο χώρος ανίχνευσης περιέχει τέσσερις οπές και ένα θάλαμο ανίχνευσης. Για την ανίχνευση, ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο οξειδίου του γραφενίου χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο λειτουργίας με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης συγκρινόμενη με αυτή του μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου. Αυτό το μοντέλο παρέχει στο χρήστη τη δυνατότητα ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων.

Κεφάλαιο 4: Lab on a chip

Η τεχνολογία lab on a chip εστιάζει στην ανάπτυξη συσκευών υβριδισμού, οι οποίες ενσωματώνουν τα ροϊκά και ηλεκτρονικά στοιχεία στο ίδιο chip. Έχουν επικεντρωθεί κυρίως στη δοκιμή και το χειρισμό υγρών δειγμάτων. Η τεχνολογία lab on a chip δίνει έμφαση στην ενσωμάτωση, στη δυνατότητα προγραμματισμού του chip, στην αύξηση της ευαισθησίας, στην ελάχιστη κατανάλωση αντιδραστηρίων και στην αποτελεσματική ανίχνευση του δείγματος. Η λειτουργία του lab on a chip περιλαμβάνει το χειρισμό του δείγματος, την ανάμειξη, το φιλτράρισμα, την ανάλυση και τον έλεγχο. Μία τυπική lab on a chip συσκευή περιέχει microchannels, τα οποία επιτρέπουν στα υγρά δείγματα να ρέουν μέσα στο chip, αλλά επίσης ενσωματώνει μετρώντας, ανιχνεύοντας και ενεργοποιώντας στοιχεία όπως μικροβαλβίδες, μικροροϊκά mixers, μικροηλεκτρόδια, θερμικά στοιχεία ή οπτικές συσκευές.

Οι συσκευές lab on a chip έχουν προσελκύσει την προσοχή στις μέρες μας, καθώς μέσω αυτών αναπτύσσονται οι συσκευές για point of care θεραπείες. Αυτή η τεχνολογία επιτρέπει την ανάπτυξη της επόμενης γενιάς των φορητών βιοηλεκτρικών συσκευών. Μερικά από τα πλεονεκτήματα των συσκευών αυτών είναι το μικρό μέγεθος, η φορητότητα, ο αυτοματοποιημένος χειρισμός του δείγματος, ο χαμηλός ηλεκτρονικός θόρυβος και η περιορισμένη κατανάλωση ενέργειας. Λόγω του μικρού μεγέθους τους, οι συσκευές lab on a chip επιτρέπουν την ακριβή μεταφορά ρευστών με τη χρήση ηλεκτροκινητικών μεθόδων ή μέσω μικροαντλιών, τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των δειγμάτων καθώς και την ακριβή μέτρηση των δειγμάτων.

Η κλινική ιατρική ωφείλεται σε σημαντικό βαθμό στην τεχνολογία lab on a chip καθώς συνέβαλλαν στις δοκιμές φαρμάκων, στις εξετάσεις για παρακολούθηση πανδημιών, στην παρακολούθηση γλυκόζης, στον έλεγχο του διαβήτη, στη διάγνωση ασθενειών και σε πολλές ακόμη δοκιμές. Συγκεκριμένα, η ηλεκτρική ανίχνευση εξαρτάται από τις ιδιότητες των μορίων των υγρών δειγμάτων. Για παράδειγμα, τα επίπεδα του διοξειδίου του άνθρακα, του οξυγόνου και οι τιμές του pH μπορούν να μετρηθούν ηλεκτροχημικά. Όμως, οι περισσότερες αναλυτικές ή οπτικές τεχνικές απαιτούν επισήμανση μέσω φθορισμού. Οι περισσότερες μέθοδοι διαχωρισμού των συστημάτων lab on a chip είναι προσεγγίσεις σμίκρυνσης των μεγαλύτερων συστημάτων. Ο διαχωρισμός των βιομορίων, των κυττάρων ή των νανοσωματιδίων γίνεται μέσω μεθόδων που βασίζονται στο φορτίο και στο μέγεθος των δειγμάτων.

Η γονιδιακή έρευνα απαιτεί ανάλυση, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ροϊκών chips, τις μικροσυστοιχίες, οι οποίες είναι ανοιχτές επίπεδες διατάξεις που η κάθε μία περιέχει χιλιάδες ολιγονουκλεοτίδια, ομοιοπολικά συνδεδεμένα σε γυαλί ή υπόστρωμα πυριτίου. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια λειτουργούν ως ανιχνευτές, έρχονται σε επαφή με τα DNA σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Η μέθοδος ανίχνευσης στα chips με μικροσυστοιχίες βασίζεται σε ανάλυση χρησιμοποιώντας φθορίζουσες επισήμανσεις.

Οι πρώτες ροϊκές συσκευές κατασκευάστηκαν με υποστρώματα πυριτίου (Si) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ένα υλικό το γυαλί (SiO₂), παρουσιάζοντας καλύτερη ηλεκτρική μόνωση και ανθεκτικότητα. Οι σύγχρονες συσκευές lab on a chip είναι υβριδικές καθώς συνδυάζουν γυαλί, πυρίτιο και ποικίλα πολυμερή όπως το ακρυλικό, τον πολυεστέρα, το πολυανθρακικό και τα θερμοπλαστικά όπως το PDMS. Το πυρίτιο, το γυαλί ή τα πολυμερή είναι κατάλληλα για την κατασκευή μικροροϊκών στοιχείων. Μέταλλα όπως ο χρυσός, το ασήμι ή το τιτάνιο χρησιμοποιούνται για αγωγίμα τμήματα, το διοξείδιο πυριτίου, το νιτρίδιο πυριτίου και το νιτρίδιο τιτανίου είναι για τη μόνωση. Η τυπική διαδικασία των ροϊκών chips σε πυρίτιο ή υποστρώματα γυαλιού αποτελείται από:

α) την εναπόθεση μεταλλικών ή διηλεκτρικών στρωμάτων σε πλάκες πυριτίου ή γυαλιού
β) σχηματισμό αυτών των στρωμάτων μέσω λιθογραφίας προκειμένου να μεταφέρουν σε αυτά περιγράμματα microchannels, αγωγίμων ή μονωμένων περιοχών
γ) χημική εγχάραξη που αφαιρεί το ανεπιθύμητο υλικό και αποκαλύπτει τις δομές.

Τα πολυμερή έχουν πολλά διεπιφανειακά και δομικά χαρακτηριστικά, όμως υστερούν στις οπτικές ιδιότητες σε σύγκριση με το γυαλί. Ιδιότητες, όπως η χαμηλότερη διαπερατότητα του φωτός και η υψηλότερη εκπομπή φθορισμού αλλά υπερτερεί έχοντας καλύτερη θερμική αγωγιμότητα. Το PDMS παρέχει ευελιξία, υδροφοβικότητα και πολύ σταθερή σφράγιση εφαρμόζοντας ομοιόμορφη μηχανική πίεση. Επιπλέον, έχει τη δυνατότητα να σφραγίζει επιφάνειες που περιέχουν γυαλί, πυρίτιο, νιτρίδιο πυριτίου, πολυεθυλένιο, υαλώδη άνθρακα, φθοράνθρακες και μέταλλα. Συγκρίνοντας το γυαλί με το PDMS, το δεύτερο έχει χαμηλότερη θερμική αγωγιμότητα και μεγαλύτερη υδροφοβικότητα καθιστώντας το ως ικανό υλικό για τη δημιουργία μικροροϊκών καναλιών.

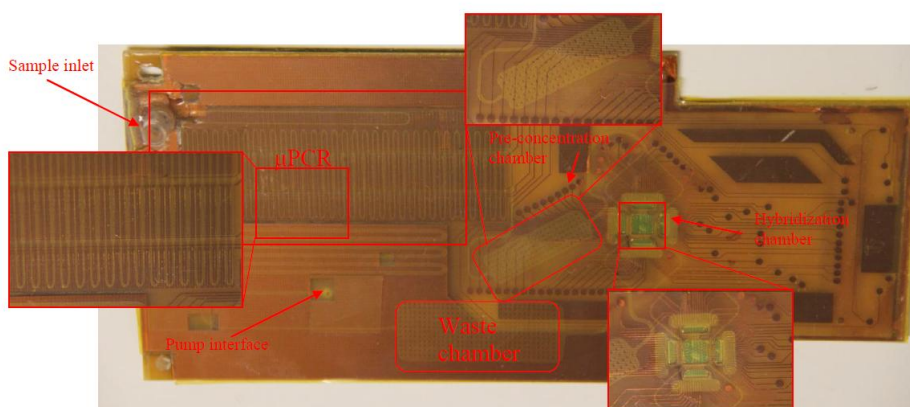
Τα μέταλλα σαν τον χρυσό, την πλατίνα, το τιτάνιο, ή τα μεταλλοειδή films όπως το οξείδιο ινδίου-κασσιτέρου (ITO), είναι κατάλληλα για τη δημιουργία μικροηλεκτροδίων. Ο χρυσός και ο άργυρος είναι βιοσυμβατά, χημικά αδρανή και κατάλληλα μέταλλα για να έρχονται σε επαφή με βιοχημικά διαλύματα. Τα συγκεκριμένα μέταλλα χρησιμοποιούνται ευρέως από τους κατασκευαστές μικροηλεκτροδίων, λόγω των δύο σημαντικών τους ιδιοτήτων: α) της άριστης αγωγιμότητας, η οποία επιτρέπει τη μετάδοση ηλεκτρικών σημάτων χωρίς παραμορφώσεις, και β) της βιοσυμβατότητας, η οποία επιτρέπει την άμεση επαφή των ηλεκτροδίων με τα βιοχημικά διαλύματα χωρίς συγκολλήσεις και προσροφήσεις [22].

Η D. Moschou ανέπτυξε μία συσκευή LoC που αποτελείται από μία ολοκληρωμένη μονάδα με μικροθερμαντήρες με αντίσταση και μία συστοιχία βιοαισθητήρων για τη διάγνωση ασθενειών. Το LoC χτίστηκε πάνω σε μία πλατφόρμα τυπωμένου κυκλώματος, πολλαπλασιάζοντας τα δείγματα DNA και την ανίχνευσή τους στο chip. Το μικροροϊκό δίκτυο συνεχούς ροής, σχεδιασμένο πάνω στο PCB, εκτελεί τριάντα θερμικούς κύκλους με θερμαινόμενες ζώνες σε σταθερές

θερμοκρασίες των 90 °C, 77°C, 60 °C. Μετά τον πολλαπλασιασμό του DNA, το προϊόν οδηγείται στο θάλαμο όπου ο βιοαισθητήρας με βάση του Si ανιχνεύει το δείγμα.

Όλες οι ηλεκτρικές συνδέσεις για τον αισθητήρα και τα απαιτούμενα θερμικά στοιχεία για το σύστημα μPCR σχηματίζονται σε ένα PCB στρώμα χαλκού. Το μικροροϊκό σύστημα σχηματίζεται στο επάνω μέρος του στρώματος χαλκού στο φωτοευαίσθητο πολυμίδιο. Ο αισθητήρας τοποθετείται και σφραγίζεται πάνω στο PCB υπόστρωμα, σχηματίζοντας ένα θάλαμο όπου το DNA ανιχνεύεται μέσω υβριδισμού. Κάθε ένα από τα στοιχεία LoC(μPCR και η συστοιχία του αισθητήρα), κατασκευάστηκε και δοκιμάστηκε ξεχωριστά.

Έπειτα από τις ανεξάρτητες δοκιμές, τα δύο στοιχεία ενσωματώθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα. Το μικροροϊκό δίκτυο σχεδιάστηκε για να οδηγήσει το δείγμα που περιέχει DNA, αρχικά, μέσω του μέρους μPCR όπου το DNA πολλαπλασιάστηκε. Στη συνέχεια, μεταφέρεται μέσω των μικροροϊκών καναλιών στη συστοιχία των βιοαισθητήρων όπου λάμβάνει μέρος η ανίχνευση. Ο αισθητήρας τοποθετείται σε ένα θάλαμο (για υβριδισμό του DNA) ο οποίος περιλαμβάνει δύο εισόδους και δύο εξόδους του μικροροϊκού για να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη μεταφορά του δείγματος και η πλήρης κάλυψη της περιοχής του θαλάμου.



Σχήμα 23: Απεικόνιση του κατασκευασμένου LoC

Παρατηρείται ότι η είσοδος του δείγματος είναι στην αριστερή πλευρά της συσκευής. Το δείγμα, αρχικά πηγαίνει μέσω του μPCR συστήματος, όπου το DNA πολλαπλασιάζεται και συγκεντρώνεται σε έναν ενδιάμεσο θάλαμο. Στη συνέχεια, αντλείται μέσα στο θάλαμο υβριδισμού που σχηματίζεται πάνω στον αισθητήρα. Τελικά, το δείγμα οδηγείται σε ένα θάλαμο αποβλήτων στο τέλος του μικροροϊκού κυκλώματος [23].

Κεφάλαιο 5: Αισθητήρας πυριτίου Si

5.1 Χημική τροποποίηση υποστρώματος SiO₂

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι διαδικασίες παρασκευής ως προς τη μελέτη της χημικής τροποποίησης του υποστρώματος SiO₂. Τα ολοκληρωμένα κυκλώματα κατασκευάζονται πάνω σε υπόβαθρα μονοκρυσταλλικού πυριτίου (single-crystal silicon) πολύ υψηλής καθαρότητας και κρυσταλλικής τελειότητας. Χρησιμοποιείται μονοκρυσταλλικό πυρίτιο αντί του πολυκρυσταλλικού επειδή το πρώτο δε διαθέτει ατέλειες οι οποίες περιορίζουν τους χρόνους ζωής των φορέων μειονότητας. Επίσης, το πυρίτιο κυριάρχησε έναντι του γερμάνιου που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην κατασκευή συσκευών στερεάς κατάστασης λόγω των μικρότερων ρευμάτων διαρροής επαφής που παρουσιάζει σε σχέση με το γερμάνιο. Αυτό οφείλεται στο μεγαλύτερο ενεργειακό χάσμα του πυριτίου (1.1 eV) έναντι αυτού του γερμάνιου (0.66eV). Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες αιτίες για την κυριαρχία του πυριτίου έναντι του γερμάνιου όπως α) το γεγονός ότι οι συσκευές πυριτίου μπορούν να λειτουργήσουν μέχρι τη θερμοκρασία των 150 °C έναντι των 100 °C των συσκευών γερμάνιου και β) οι εξαιρετικές ιδιότητες του θερμικού διοξειδίου του πυριτίου για εφαρμογές επίπεδης τεχνολογίας σε αντίθεση με το ακατάλληλο οξείδιο του γερμάνιου το οποίο δεν είναι σταθερό ως διηλεκτρικό. Η ύπαρξη σταθερού διηλεκτρικού αποτελεί κύρια παράμετρο στο σχεδιασμό ενός συστήματος επεξεργασίας πληροφορίας (π.χ. τρανζίστορ, αισθητήρες, διατάξεις μνήμης, κ.α.) [24],[25]

Το πυρίτιο είναι μοναδικό ανάμεσα στα ημιαγώγιμα υλικά και αυτό διότι η επιφάνεια του μπορεί εύκολα να επικαλυφθεί με ένα στρώμα οξειδίου. Η διεπιφάνεια μεταξύ Si και SiO₂ είναι πιθανώς η πιο προσεκτικά μελετημένη από όλες τις υλικές διεπιφάνειες και ότι οι ηλεκτρικές και μηχανικές της ιδιότητες είναι σχεδόν τέλειες. Τα στρώματα SiO₂ αναπτύσσονται εύκολα θερμικά πάνω στο πυρίτιο ή εναποτίθενται πάνω σε πολλές επιφάνειες. Προσκολλούνται και προσδένονται καλά πάνω σε υπόστρωμα, εμποδίζουν τη διάχυση προσμίξεων, είναι ανθεκτικά στα περισσότερα χημικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία πυριτίου, μπορούν εύκολα να μορφοποιηθούν και να κοπούν με συγκεκριμένα χημικά ή και εγχαρακτές με πλάσμα. Η παρασκευή του SiO₂ είναι μία θερμική διεργασία που πραγματοποιείται είτε σε κλειστούς φούρνους οξείδωσης σε υψηλές θερμοκρασίες (850-1000 °C), είτε σε αντιδραστήρες πλάσματος με χημική εναπόθεση ατμού σε χαμηλές θερμοκρασίες (<400 °C), είτε με την τεχνική της ατομικής εναπόθεσης στοιβάδων σε θερμοκρασίες > 400 °C) [25].

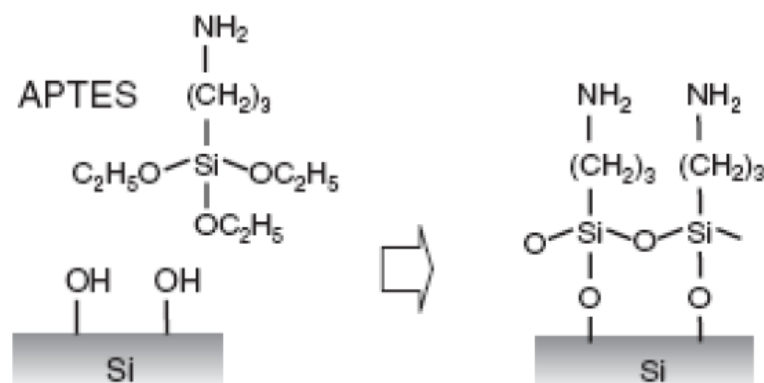
Αρχικά για τη χημική τροποποίηση επιφανειών SiO₂ χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πάχους 3000 Å. Τα δείγματα τροποποιήθηκαν με έξι διαφορετικές διαδικασίες για να επιλεγεί εκείνη που μετατρέπει την επιφάνεια σε υδρόφιλη με αποτέλεσμα την επιτυχή εναπόθεση σταγόνων GO (*ACS material single layer graphene oxide, dispersed in ethanol, 5mg/ml*) και rGO. Οι διαδικασίες είναι η τροποποίηση με

- plasma O₂,
- plasma O₂ και εμφάνιση σε APTES(3Aminopropyl)triethoxysilane,
- plasma O₂ και GOPTS,
- plasma O₂ και HDMS(bake),
- plasma O₂ και HDMS(no bake),
- χωρίς τροποποίηση

Τα δείγματα Si/SiO₂(3000 Å) καθαρίστηκαν με ακετόνη, προπανάλη, απιονισμένο νερό με υδροβολέα και άζωτο. Σε κάθε περίπτωση τροποποίησης χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη τροποποίηση, με plasma O₂ δηλαδή η έκθεση της επιφάνειας σε πλάσμα αερίων, έγινε στον καθαρό χώρο του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος. Κατά την έκθεση αυτή, τα μόρια του αερίου αλληλεπιδρούν με τα μόρια της επιφάνειας του υποστρώματος δημιουργώντας λειτουργικές ομάδες. Ιδιαίτερη σημασία έχει πως κατά τη διεργασία ενός υλικού με πλάσμα, εκτός από την τροποποίηση της χημείας της επιφάνειας, συντελείται συχνά και αλλαγή της μορφολογίας της, με πιο συχνό αποτέλεσμα τη δημιουργία τυχαίας τραχύτητας. Αν και γενικά οι υδρόφιλες επιφάνειες είναι γνωστές για την αντίσταση στην προσκόλληση των πρωτεϊνών, αυτές που έχουν οξυγόνο και κυρίως καρβοξυλικές ομάδες, δένουν απευθείας με πρωτεΐνες ή κύτταρα [26]. Οι συνθήκες υδροφιλοποίησης ήταν με ισχύ στα 400 Watt, πίεση 10mtorr 50 sccm για χρόνο 30 sec. Έπειτα, εναποτέθηκαν σταγόνες 1μL GO 0.5% w/v (5mg/ml), μη αραιωμένο διάλυμα και στη συνέχεια το ένα από τα δύο δείγματα ψήθηκε στους 200 °C για 1 ώρα μετατρέποντας το GO σε rGO μέσω θερμικής αναγωγής έτσι ώστε να είναι ηλεκτρικά αγωγίμο. Η διαδικασία της εναπόθεσης σταγόνων και του ψήσιματος γίνεται σε κάθε τροποποίηση.

Η δεύτερη τροποποίηση περιλαμβάνει υδροφιλοποίηση με plasma O₂ και APTES ((3Aminopropyl)triethoxysilane). Όπως και στην προηγούμενη διαδικασία, η υδροφιλοποίηση με plasma O₂ έγινε στον καθαρό χώρο. Οι συνθήκες ήταν με ισχύ στα 400 Watt, πίεση 10mtorr 50 sccm για χρόνο 30 sec. Όσον αφορά την ομοιοπολική σύνδεση δύο υλικών ο πιο συνηθισμένος τρόπος είναι η σιλανοποίηση κατά την οποία παράγωγα σιλανίων σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς σιλοξανίων (siloxane) με υδροξυλικές ομάδες μιας επιφάνειας. Οπότε, το πρώτο στάδιο είναι να αποκτήθει μία επιφάνεια πλούσια σε –OH ομάδες η οποία μπορεί να προκύψει από την οξείδωση μέσω διεργασίας πλάσματος, όπως και έγινε [26]. Το δεύτερο στάδιο είναι η εμφάνιση των υποστρωμάτων σε διαλύματα APTES σε απιονισμένο νερό συγκέντρωσης 2% v/v. Το APTES αποτελεί ένα μικρό μόριο σιλανίου και μία αμινομάδα στο τέλος ενός υδρογονάνθρακα. Η ομάδα του σιλανίου μπορεί να δεσμευθεί ισχυρά στο SiO₂ μέσω του δεσμού Si-O-Si. Τα υποστρώματα παραμένουν στο τριβλίο με το διάλυμα APTES για 20', στη συνέχεια εμφαπίζονται σε τρίβλιο με απιονισμένο νερό και στεγνώνονται με άζωτο. Το επόμενο βήμα είναι το ψήσιμο

στους 120 °C σε κλειστό φούρνο για 20' για ομοιοπολική πρόσδεση του APTES στην επιφάνεια του SiO₂.



Σχήμα 24: Δέσμευση του μορίου του APTES στην επιφάνεια υδροφιλοποιημένου SiO₂

Η επόμενη τροποποίηση είναι με plasma O₂ και GOPTS. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα toluene/GOPTS (25ml/250μL) για ένα βράδυ. Έπειτα, ξεπλύθηκε εναλλάξ μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως με toluene-ethanol (absolute)-toluene-ethanol (absolute). Τέλος, τοποθετήθηκε το δείγμα σε ένα άλλο ποτήρι ζέσεως γεμάτο με ethanol (absolute) και αυτό με τη σειρά του σε υπέρηχους για 15'.

Επιπλέον, τα δείγματα τροποποιήθηκαν με plasma O₂ και HDMS(bake στους 100°C για 1.5'/no bake). Η εναπόθεση του HDMS στα υποστρώματα Si/SiO₂ έγιναν με επίστρωση στον καθαρό χώρο. Οι συνθήκες επίστρωσης ήταν 7000rpm για 30'' όπου ένα παχύ στρώμα HDMS σχηματίστηκε στην επιφάνεια. Κατά το ψήσιμο στους 100 °C, απελευθερώθηκε αμμωνία. Η τελευταία διαδικασία δεν περιλαμβάνει υδροφιλοποίηση, έγινε απευθείας εναπόθεση σταγόνων μετά τον καθαρισμό με ακετόνη, προπανόλη, απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο [27].

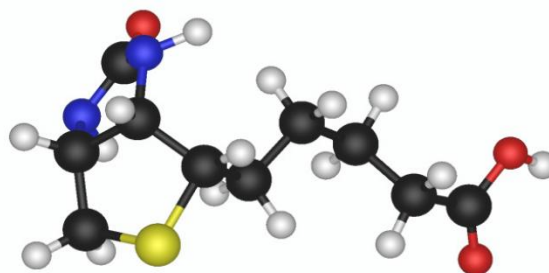
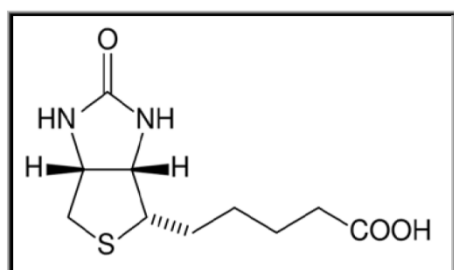
Οι σταγόνες διοξειδίου του γραφενίου και του θερμικά αναγόμενου διοξειδίου του γραφενίου στα υποστρώματα με τις διάφορες ή τροποποιήσεις τοποθετήθηκαν στο profilometer Ambius XP2 για να μετρηθεί το πάχος τους. Μετά την πρώτη μέτρηση, τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε ένα τριβλίο με ένα ρυθμιστικό διάλυμα phosphate buffer (50mM pH 7.4) για 10' και μετρήθηκαν εκ νέου για να διαπιστωθεί τυχούσα μεταβολή στο πάχος των σταγόνων. Αφού, ολοκληρώθηκε η μέτρηση, τα δείγματα επανατοποθετήθηκαν σε phosphate buffer (50mM pH 7.4) για ένα βράδυ και μετρήθηκαν ξανά. Στις τροποποιήσεις με plasma O₂ με σταγόνες GO και rGO, με plasma O₂ και HDMS(bake) με σταγόνες GO, με plasma O₂ και HDMS(no bake) με σταγόνες GO και rGO, καθώς και στα δύο μη τροποποιημένα δείγματα, οι σταγόνες δεν έμειναν στις αρχικές τους θέσεις και το πάχος τους είχε μεταβληθεί σε μεγάλο βαθμό. Στις τροποποιήσεις με plasma O₂ και APTES και με plasma O₂ και GOPTS, οι σταγόνες έμειναν στις αρχικές τους θέσεις και το πάχος των σταγόνων δεν άλλαξε

σε σημαντικό βαθμό. Στα επόμενα πειράματα, τα υποστρώματα SiO₂ τροποποιούνται με plasma O₂ και APTES.

5.2 Εναπόθεση σταγόνων biotin-streptavidin σε υπόστρωμα SiO₂ με graphene oxide 5mg/ml

Σκοπός αυτής της ενότητας είναι να παρουσιαστεί η διαδικασία σύνδεσης της βιοτίνης-στρεπταβιδίνης πάνω σε υπόστρωμα Si/SiO₂ καθώς και η μεταβολή της αντίστασης συναρτήσε του χρόνου σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Η μέτρηση της αντίστασης έγινε σε στεγνό δείγμα. Αρχικά, θα γίνει αναφορά στις σταγόνες πρωτεϊνών που εναποτέθηκαν στο υπόστρωμα.

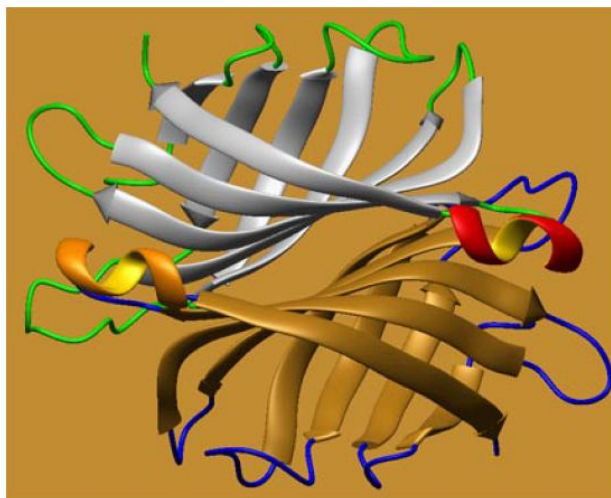
Η βιοτίνη (ή βιταμίνη B7) ανήκει στο σύμπλεγμα των βιταμινών B και ανακαλύφθηκε το 1927 από τον βιοχημικό M.A Boas αλλά χρειάστηκαν άλλα 40 χρόνια έρευνας για να συμπεριληφθεί στις βιταμίνες. Η βιοτίνη συμμετέχει σε πλήθος μεταβολικών αντιδράσεων όπως στη σύνθεση λιπαρών οξέων. Η δράση της οφείλεται στην ικανότητά της να δεσμεύει και να μεταφέρει το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για πολλές αντιδράσεις σύνθεσης. Γι' αυτό το λόγο, αποτελεί συνένζυμο σε αντιδράσεις καρβοξυλίωσης, που καταλύονται από ένζυμα, τις καρβοξυλάσεις. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του δέρματος, των μαλλιών και έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της τριχόπτωσης. Συμμετέχει, επιπλέον, στην παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη, μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης. Πηγές οι οποίες περιέχουν βιοτίνη είναι η σίκαλη, ο βασιλικός πολτός, το συκώτι, τα δημητριακά, τα φιστίκια, τα καρύδια, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και η σοκολάτα. Η βιοτίνη είναι συνένζυμο και εμφανίζει μεγάλη και εξειδικευμένη συγγένεια για την αβιδίνη και στρεπταβιδίνη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ βιοτίνης/στρεπταβιδίνης είναι μία από τις ισχυρότερες που αναφέρονται για τους πρωτεϊνικούς δεσμούς. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι ανθεκτική στο pH, σε αλλαγές της θερμοκρασίας, σε οργανικά διαλύματα. Μόνο ισχυρές μέθοδοι όπως η θέρμανση διαλύματος μπορεί να την αντιστρέψει [28].



Σχήμα 24: Χημική δομή της βιοτίνης και η τρισδιάστατη αναπαράσταση του μορίου της βιοτίνης

Η στρεπταβιδίνη είναι πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει ισχυρά το μόριο της βιοτίνης. Η στρεπταβιδίνη έχει απομονωθεί από τον μικροοργανισμό streptomyces

avidini και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες. Δεν περιέχει υδατάνθρακες, γεγονός που εμποδίζει τη μη ειδική σύνδεση με μόρια ανάλογα των λεκτινών που βρίσκονται σε αρκετούς ιστούς. [29] [30]



Σχήμα 25: Απεικόνιση της στρεπταβιδίνης

Για αυτή τη διαδικασία, τα υπόστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εναπόθεση σταγόνων είναι δισκία πυριτίου πάνω στα οποία έχει αναπτυχθεί ένα στρώμα διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2). Το πάχος του είναι 3000 Å. Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- υδροφιλοποίηση με με plasma O_2 και APTES που αποτελεί ένα μικρό μόριο σιλανίου και μία αμινομάδα στο τέλος ενός υδρογονάνθρακα. Η ομάδα του σιλανίου μπορεί να δεσμευθεί ισχυρά στο SiO_2 μέσω του δεσμού Si-O-Si. Η αμινομάδα μπορεί να σχηματίσει ομοιοπολικούς δεσμούς με τις καρβοξυλικές ομάδες των βιομορίων.
- Εναπόθεση επτά σταγόνων (1μL) graphene oxide 5mg/ml.
- Τοποθέτηση ηλεκτροδίων με silver paint.
- Ψήσιμο στους 180 °C για 1 ώρα, για να γίνει αγωγίμο το graphene oxide
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με τον prober 4140B.
- Εναπόθεση σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος phosphate buffer pH 7.4 συγκέντρωσης 50mM.
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με buffer μέσω του prober 4140B.
- Πλύση δείγματος με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.
- Εναπόθεση σταγόνων b-bsa και σταγόνων blank. Τοποθέτηση δισκίου με ένα βρεγμένο κομμάτι χαρτί για να παραμείνει η υγρασία σε ένα τριβλίο για ένα βράδυ.
- Πλύση δείγματος με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με τον prober 4140B.

- Εναπόθεση σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος phosphate buffer pH 7.4 συγκέντρωσης 50mM.
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με buffer μέσω του prober 4140B.
- Πλύση δείγματος με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.
- Εναπόθεση σταγόνων BSA blocking και επώαση για 1 ώρα για κάλυψη των θέσεων όπου δεν έχει προσδεθεί η βιοτίνη.
- Πλύση δείγματος με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με τον prober 4140B.
- Εναπόθεση σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος phosphate buffer pH 7.4 συγκέντρωσης 50mM.
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με buffer μέσω του prober 4140B.
- Πλύση δείγματος με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.
- Εναπόθεση σταγόνων στρεπταβιδίνης και επώαση για 30' με ένα βρεγμένο χαρτί για να παραμείνει η υγρασία.
- Πλύση δείγματος με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με τον prober 4140B.
- Εναπόθεση σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος phosphate buffer pH 7.4 συγκέντρωσης 50mM.
- Μέτρηση χαρακτηριστικών I-V των σταγόνων με buffer μέσω του prober 4140B.
- Πλύση δείγματος με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο.

Για τη δημιουργία του *blank*, χρησιμοποιήθηκε BSA(stock 1mg/ml), έγινε 10 φορές αραιώση οπότε σε ένα tube με 90μL phosphate buffer προστέθηκαν 10μL BSA.

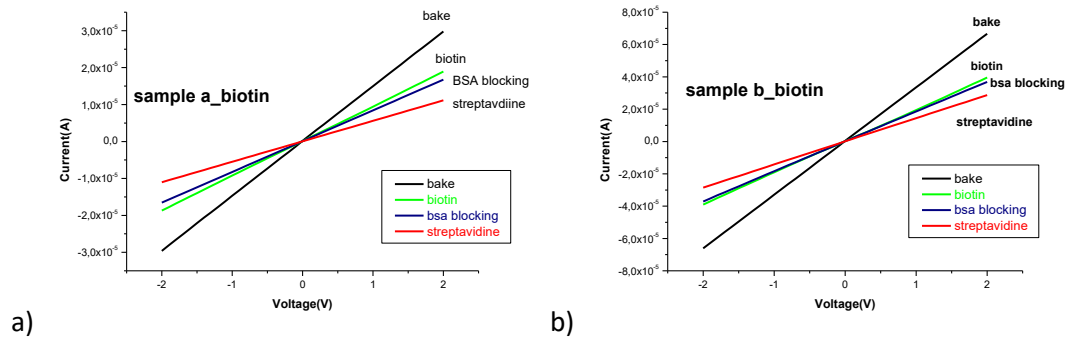
Για τη δημιουργία της *βιοτίνης*, χρησιμοποιήθηκε b-bsa(stock 1mg/ml, έγινε αραιώση 10 φορές. Η τελική συγκέντρωση είναι 100 μg/ml, δηλαδή σε ένα tube προστέθηκαν με 90μL phosphate buffer προστέθηκαν 10μL b-bsa.

Για τη δημιουργία του *BSA blocking*, χρησιμοποιήθηκε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα 0.5 gr BSA (Bovine serum albumin) με 50μL phosphate buffer pH 7.4 50mM. Ακολούθησε ανάδευση 15'.

Για τη δημιουργία της *στρεπταβιδίνης*, χρησιμοποιήθηκε 400μL BSA blocking με 1μL streptavidine.

Στην εικόνα 26 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των σταγόνων graphene oxide 5mg/ml πάνω σε υπόστρωμα πυριτίου Si/SiO₂(3000 Å) όταν έχουν εναποτεθεί σταγόνες βιοτίνης. Μετά την προσθήκη phosphate buffer και βιολογικών δειγμάτων γινόταν μέτρηση της αντίστασης για να παρατηρηθεί η μεταβολή της. Συγκεκριμένα, η αντίσταση μετρήθηκε μέσω του Prober 4140B μετά το ψήσιμο του δείγματος στους 180°C για 1 ώρα όταν έχουν εναποτεθεί μόνο οι σταγόνες του οξειδίου του γραφενίου. Έπειτα προστέθηκαν σταγόνες phosphate buffer και μετρήθηκε η αντίσταση όσο ήταν

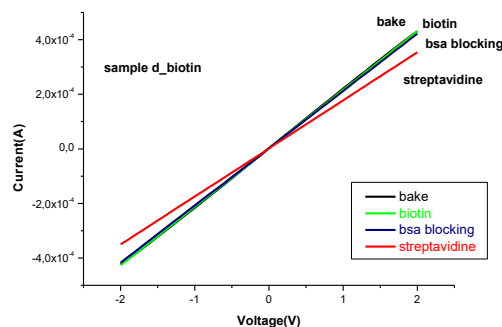
βρεγμένο. Γενικότερα, μετά τη προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος η μέτρηση της αντίστασης γινόταν απευθείας ενώ μετά τη προσθήκη βιολογικών δειγμάτων προηγούνταν πλύση με απιονισμένο νερό και άζωτο και έπειτα γινόταν η μέτρηση. Παρατηρείται μείωση του ρεύματος συναρτήσει της τάσης το οποίο προκαλεί την αύξηση της αντίστασης λόγω της σύνδεσης της βιοτίνης με την στρεπταβιδίνη.



Σχήμα 26: I-V χαρακτηριστική δείχνει τις αλλαγές της ηλεκτρικής αντίστασης για κάθε στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνοντας b-BSA a) για τη σταγόνα a, b) για τη σταγόνα b. Για το δείγμα b-BSA η αντίσταση αυξάνει μετά από κάθε στάδιο.

Μεταβολή της αντίστασης (Ohm)				
Σταγόνα a	Bake	Biotin	BSA blocking	streptavidin
	6.73×10^4	1.06×10^5	1.2×10^5	1.8×10^5
Σταγόνα b	Bake	Biotin	BSA blocking	streptavidin
	3.01×10^4	5.13×10^4	5.4×10^4	6.9×10^4

Όσον αφορά τις σταγόνες blank, η πειραματική διαδικασία και ο τρόπος μέτρησης της αντίστασης είναι ίδιος με τις σταγόνες της βιοτίνης. Από τα αποτελέσματα, είναι προφανής η μικρή μεταβολή της αντίστασης αφού η σταγόνα blank δεν έχει τους υποδοχείς της βιοτίνης για να μπορέσει να προσδεθεί η στρεπταβιδίνη.



Σχήμα 27: I-V χαρακτηριστική δείχνει τις αλλαγές της ηλεκτρικής αντίστασης για κάθε στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνοντας σταγόνα blank, παρατηρείται μικρή αλλαγή της αντίστασης.

Μεταβολή της αντίστασης (Ohm)				
Σταγόνα d	Bake	Biotin	BSA blocking	streptavidin

	4.62×10^3	4.66×10^3	4.7×10^3	5.8×10^3
--	--------------------	--------------------	-------------------	-------------------

Κεφάλαιο 6: Ανάπτυξη PCB LoC

6.1 Σχεδιασμός lab on a chip μέσω του προγράμματος kicad

Για την ανίχνευση βιολογικών αλληλεπιδράσεων και πιο συγκεκριμένα για την ανίχνευση DNA και βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιείται μια lab-on-a-chip (LOC) διάταξη η οποία αποτελείται από τέσσερα βασικά μέρη:

- ένα μικροροϊκό σύστημα, στο οποίο γίνεται ο πολλαπλασιασμός του DNA
- ένα θάλαμο συγκέντρωσης υγρών μέσα στον οποίο βρίσκονται οι αισθητήρες, οι οποίοι είναι transistors που έχουν κατασκευαστεί από ανηγμένο οξείδιο γραφενίου
- ένα θάλαμο συγκέντρωσης αποβλήτων
- μία διάταξη από θερμοστοιχεία (heaters), τα οποία είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του DNA και τα οποία βρίσκονται κάτω από το μικροροϊκό κανάλι

Το μικροροϊκό κανάλι και το ηλεκτρικό κύκλωμα, που είναι απαραίτητο για την ανίχνευση του σήματος από την βιολογική αλληλεπίδραση η οποία παίρνει μέρος στην επιφάνεια των τρανζίστορς, ενοποιούνται σε μια πλακέτα τυπωμένου κυκλώματος (printed circuit board, PCB). Με την κατασκευή μιας lab on chip διάταξης το βιολογικό δείγμα (πχ. DNA) εισέρχεται στο μικροροϊκό κανάλι, όπου εκεί ενισχύεται, και στην συνέχεια το αποτέλεσμα της ενίσχυσης κατευθύνεται προς τα τρανζίστορς, στην επιφάνεια των οποίων γίνεται η βιολογική αλληλεπίδραση. Το σήμα της βιολογικής αλληλεπίδρασης λαμβάνεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους μέσω: 1) της PCI-express, 2) ενός header και 3) του prober. Ο σχεδιασμός του lab on a chip έγινε μέσω του προγράμματος σχεδίασης kicad.

6.1.1. Κατασκευή της πρώτης lab -on-chip διάταξης

Στο σχήμα 28 απεικονίζονται τα στρώματα από τα οποία αποτελείται η lab-on-chip διάταξη που κατασκευάστηκε. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την σφράγιση του μικροροϊκού καναλιού είναι τρία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν η βιολογική αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα στους 37⁰C: 1) η πολυολεφίνη (πάχος 50μm) (polyolefin elastomer, POE) που διαθέτει μια σιλικονούχα κόλλα από την μια πλευρά, 2) karton (πάχος 50μm), το οποίο είναι πολυιμίδιο, με σιλικονούχα κόλλα (πάχος 37.5μm) μόνο από την μια πλευρά και 3) karton (πάχος 25μm) με σιλικονούχα κόλλα (πάχος 55μm) και από τις δυο μεριές. Η πολυολεφίνη είναι το πλέον κατάλληλο υλικό λόγω της υψηλής οπτικής ευκρίνειας και διαφάνειας.

Στρώμα σφράγισης μικροροϊκού καναλιού: πχ. <u>ΠΟΛΥΟΛΕΦΙΝΗ</u>	50μm
SOLDER MASK: MICROFLUIDIC	28μm
BOTTOMCOPPER	5μm
PREPREG	360μm
INNER2	18μm
FR4	710μm
INNER 1: HEATER	18μm
PREPREG	360μm
FRONT COPPER	5μm
SOLDER MASK	28μm

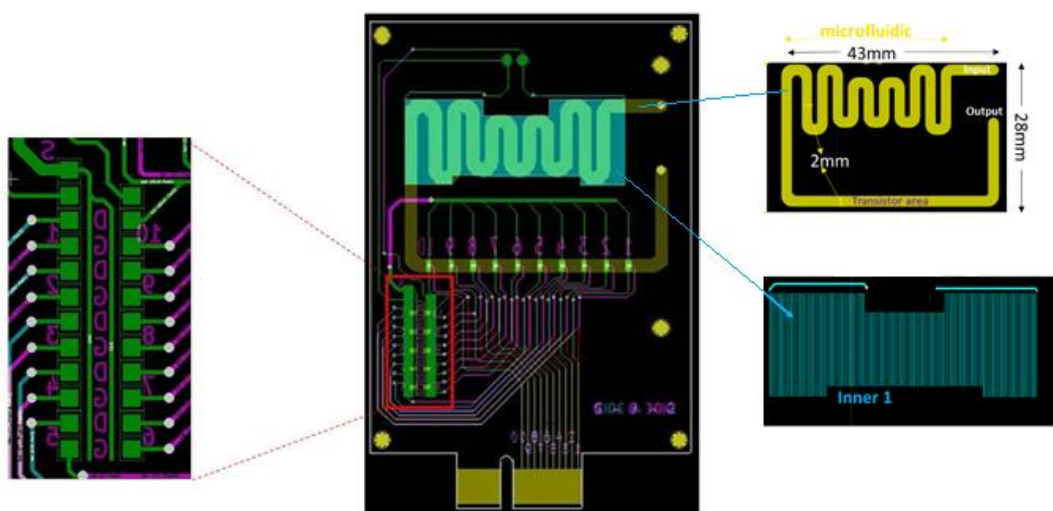
Σχήμα 28: Απεικόνιση των στρωμάτων από τα οποία αποτελείται η lab on a chip διάταξη

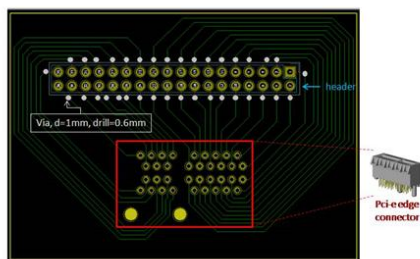
Η τελική πλακέτα απεικονίζεται στο σχήμα 27 και αποτελείται από 6 βασικά μέρη:

1. το μικροροϊκό κανάλι, το οποίο έχει αυτή τη μορφή για να γεμίζει ομοιόμορφα με το βιολογικό υγρό και να μην δημιουργούνται κενά αέρα. Πιο συγκεκριμένα, το μικροροϊκό σχηματοποιείται στο bottom soldermask (epoxy ink) [**Σφάλμα! Το ρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**], οπότε η κάτω πλευρά του μικροροϊκού θα είναι το prepreg, η πάνω πλευρά του θα έχει το υλικό σφράγισης και το πάχος του θα είναι ίσο με το πάχος του soldermask. Οι διαστάσεις του μικροροϊκού καναλιού παρουσιάζονται σαν ένθετο δεξιά στο σχήμα 28. Τέλος, η απόσταση του μικροροϊκού από τον θάλαμο που βρίσκονται τα τρανζίστορ είναι ίση με 12mm, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η σφράγιση του μικροροϊκού καναλιού χωρίς να καλύψουμε το θάλαμο στον οποίο περιέχονται τα τρανζίστορ.
2. τον header που αποτελείται από 2x12 ακροδέκτες οι οποίοι συνδέονται ηλεκτρικά με τα τρανζίστορ. Ο header δεν περιλαμβάνεται στην πλακέτα αλλά τοποθετήθηκε σε μία νέα η οποία περιλαμβάνει και τον PCI-edge connector στον οποίο εισάγεται η PCI-EXPRESS. Ο λόγος που αφαιρέθηκε ο header είναι την ελαχιστοποίηση των διαστάσεων της πλακέτας. Επιπλέον, ο header συνδέεται με τις επαφές του τρανζίστορ τις οποίες μπορούμε να μετρήσουμε μέσω του prober.
3. μια pci-express με την οποία μπορεί να συνδεθεί η πλακέτα διακοπών για την μέτρηση των τρανζίστορ. Στην pci-express συνδέονται τα gate και drain των τρανζίστορ.
4. το θερμοστοιχείο στο στρώμα 1 με τις επαφές του, που παρουσιάζονται σαν ένθετο δεξιά. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι οι επαφές των θερμοστοιχείων βρίσκονται στο B.Copper και σε απόσταση από το θερμοστοιχείο (6.65mm) έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η σφράγιση του μικροροϊκού χωρίς να καλύπτει τις επαφές και να μπορούν να συνδεθούν στις επαφές τα καλώδια για τη θέρμανση του θερμοστοιχείου.

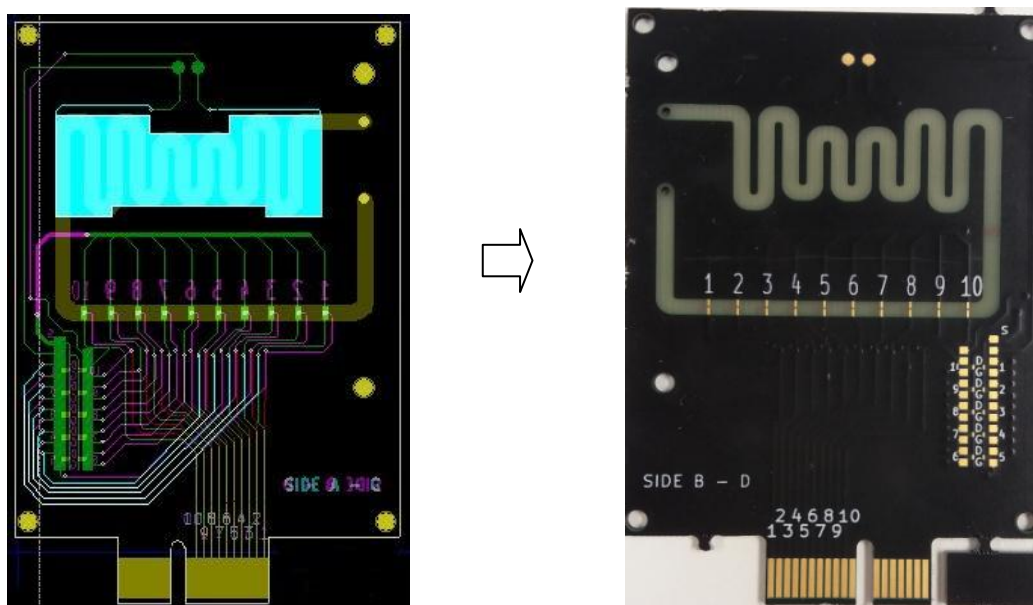
5. στην πλακέτα όπως φαίνεται υπάρχουν 4 οπές στις 4 γωνίες αλλά και δύο άλλες στο εσωτερικό διαμέτρου 2.5mm, με σκοπό την τοποθέτηση βιδών M3 σε αυτές. Η χρησιμότητα των δύο οπών στο εσωτερικό της πλακέτας είναι για την τοποθέτηση του PMMA στηρίγματος, το οποίο διαθέτει και 2 τρύπες από τις οποίες θα εισέρχεται και θα εξέρχεται το υγρό του μικροροϊκού καναλιού και στο σχήμα 28 δηλώνονται μέσω του input και output στο μικροροϊκό κανάλι. Οι οπές στις τέσσερις γωνίες της πλακέτας σχεδιάστηκαν για να βοηθήσουν στην στήριξη της μέσω αποστατών (spacers).
6. τα τρανζίστορ, τα οποία είναι 10, παρουσιάζονται σαν ένθετο αριστερά. Τα δέκα transistors χωρίζονται σε δύο πεντάδες. Η πρώτη πεντάδα είναι από τα τρανζίστορ (1) - (5) και συνδέεται με το δεξί μέρος του header (μονοί ακροδέκτες), ενώ τα υπόλοιπα πέντε με το αριστερό (ζυγοί ακροδέκτες). Η απόσταση μεταξύ τους είναι 3mm για να καταλαμβάνουν όλο το μήκος του chamber. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα τρανζίστορ έχουν την ίδια πηγή. Οι διαστάσεις των τρανζίστορ είναι:
 - μήκος: 0.5 mm και πλάτος: 0.25 mm πηγής (source) και απαγωγού (drain) (B.Copper)
 - μήκος: 0.34 mm και πλάτος: 0.5 mm του ηλεκτροδίου της πύλης (gate) (inner 2)
 - απόσταση μεταξύ των source και drain: 0.2 mm

Για τον υπολογισμό του όγκου του βιολογικού υλικού του θαλάμου στον οποίο βρίσκονται τα τρανζίστορ χωρίζουμε το θάλαμο σε τρία παραλληλόγραμμα (όγκος =(μήκος)x(πλάτος)x(πάχος)) (Εικόνα 4β). Ο θάλαμος σχήματος U έχει όγκο 3.8 μ L.





Σχήμα 29: α) Απεικόνιση της τελικής μορφής της διάταξης, β) της πλακέτας με τον header και τον ακροδέκτη της pci-e edge.

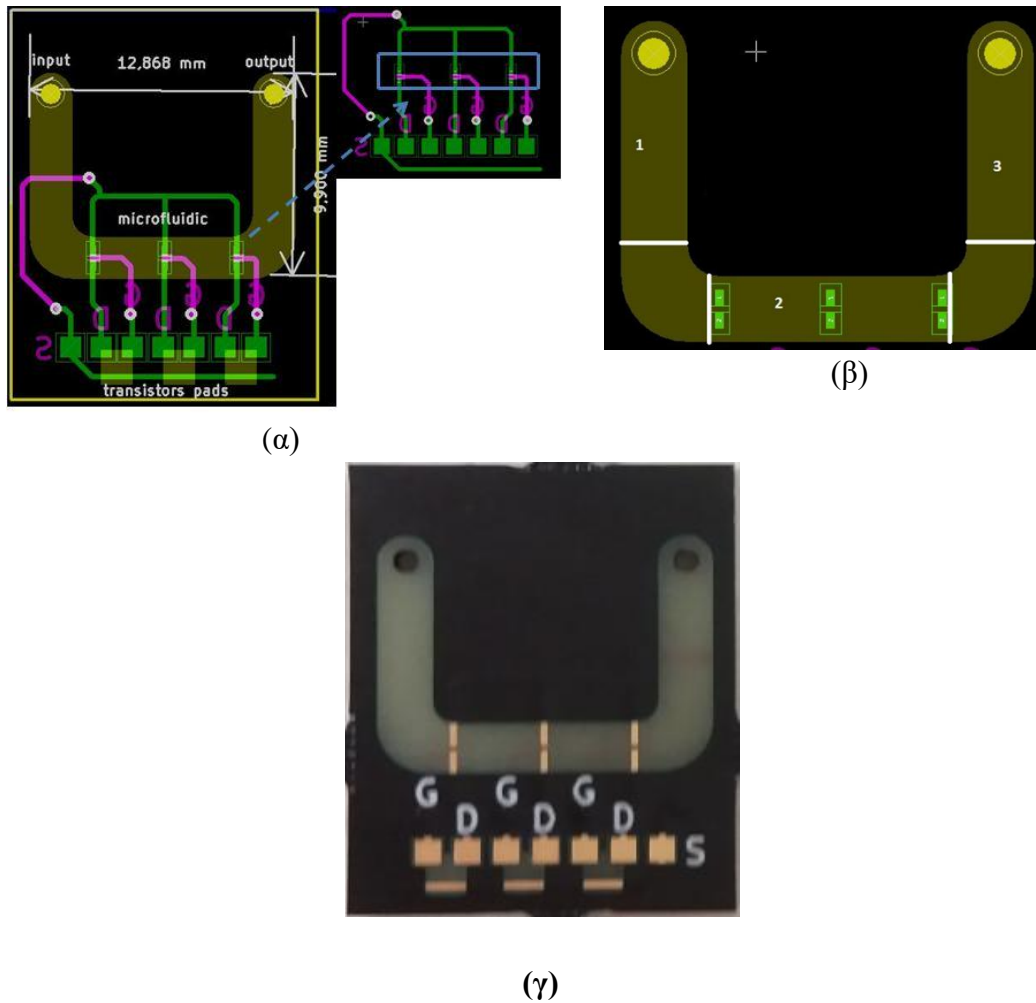


Σχήμα 30: Το σχηματικό layout και η τελική υλοποίηση της πλακέτας lab on a chip

6.1.2. Κατασκευή μιας lab-on-chip διάταξης μικρών διαστάσεων για την πραγματοποίηση των πρώτων πειραμάτων

Επιπλέον, κατασκευάστηκε μια άλλη διάταξη, η οποία περιελάμβανε μόνο το μικροροϊκό κανάλι και τα τρανζίστορ. Η πλακέτα του σχήματος 30 περιλαμβάνει τρία τρανζίστορς που απέχουν μεταξύ τους απόσταση 3mm και έχει διαστάσεις 13mm (πλάτος) και 10mm (μήκος) και σχήμα U του οποίου η χωρητικότητα είναι ίση με 0.69μL

Οι οπές, διαμέτρου 1mm, που βρίσκονται στην πλακέτα τοποθετήθηκαν για την είσοδο και την έξοδο του υγρού στο θάλαμο και η απόσταση των οπών από την αρχή της πλακέτας είναι 3,55mm. Τα vias για όλες τις πλακέτες είχαν διάμετρο 0.6mm και το μέγεθος του drill ήταν 0.25mm. Τα τρανζίστορς, είναι ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην προηγούμενη διάταξη και απέχουν μεταξύ τους 3mm.



Σχήμα 31: Απεικόνιση: (α) της πλακέτας που σχεδιάστηκε και (β) του θαλάμου για τον υπολογισμό του όγκου του, (γ) η τελική υλοποίηση της διάταξης

6.2 Προετοιμασία του lab on a chip

6.2.1. Καθαρισμός

Η προετοιμασία που απαιτείται για να χρησιμοποιηθεί ένα lab on a chip περιλαμβάνει τον καθαρισμό, την πιθανή λιθογραφία και σφράγιση του δείγματος. Για τα πειράματα που ακολούθησαν ήταν απαραίτητα ο καθαρισμός, η λιθογραφία και η σφράγιση. Όσον αφορά το πρώτο, τα δείγματα καθαρίζονταν με ακετόνη, προπανάλη και απιονισμένο νερό μέσω υδροβολέα, στέγνωμα με άζωτο ενώ στη συνέχεια ακολουθούσε ψήσιμο στο hotplate στους 120 °C για 15'.

6.2.2. Λιθογραφία

Λιθογραφία είναι η διαδικασία αποτύπωσης ορισμένων δομών, δηλαδή γεωμετρικών σχημάτων, πάνω σε κάποια επιφάνεια. Για να αποτυπωθούν αυτές οι

δομές απαιτείται η χρήση μιας μάσκας, η οποία να έχει αποτυπωμένη πάνω της μια μήτρα αυτών των δομών. Διαθέτει σκοτεινές (μη διαπερατές από το φως) και φωτεινές (διαπερατές από το φως) περιοχές. Ανάλογα με το είδος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται, η λιθογραφία διακρίνεται σε οπτική λιθογραφία, λιθογραφία με ακτίνες X και λιθογραφία ηλεκτρονικής δέσμης. Κατά την οπτική λιθογραφία η αποτύπωση γίνεται με τη διέλευση φωτός μέσα από τη μάσκα, η οποία είναι κατασκευασμένη από χαλαζία ή πλαστικό. Σ' αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε μάσκα από πλαστικό η οποία μπορεί να καθαριστεί με προπανόλη.

Η λιθογραφία των δειγμάτων έγινε στον καθαρό χώρο του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος. Για τη λιθογραφία απαιτούνταν η δημιουργία ενός διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Για το ανθρακικό νάτριο χρειάστηκαν 300ml H_2O και 3gr Na_2CO_3 (1% w/v), το οποίο αναδεύτηκε εκτός καθαρού χώρου στους 90 °C για 5' ή στους 40 °C για 20'-25'. Η πειραματική διαδικασία για *μονή λιθογραφία θετικού τόνου* δειγμάτων και αύξηση πάχους 55 μm είναι η ακόλουθη:

- Καθαρισμός δειγμάτων
- Εναπόθεση ξηρής ρητίνης (πάχος 60μm-dry photoresist polyimide, PC σειρά 1000), ένα υλικό ευαίσθητο στην ακτινοβολία. Η ξηρή ρητίνη έχει δύο προστατευτικά liners, από τα οποία αφαιρέσαμε το ένα για να κολλήσει πάνω στο PCB.
- Η διαδικασία κόλλησης έγινε μέσω του laminator. Οι συνθήκες του lamination ήταν: θερμοκρασία $T=80\text{ }^\circ\text{C}$, ταχύτητα $S=1$, πίεση $P=8$, max).
- Γίνεται έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία για 25'' για αύξηση πάχους του μικροροϊκού καναλιού. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία προκαλεί χημικές αλλαγές στο υμένιο της ρητίνης (π.χ. διάσπαση πολυμερικών αλυσίδων) στις περιοχές που προσπίπτει, έτσι ώστε να είναι δυνατή η αφαίρεση των αντίστοιχων περιοχών ρητίνης κατά τη διάκρεια του τελευταίου βήματος (εμφάνιση)
- Soft bake: 120 °C για 2' στο hotplate κατά τη διάρκεια του οποίου ολοκληρώνονται οι χημικές αλλαγές της ρητίνης.
- Αφαίρεση του δεύτερου liner της ρητίνης μέσω κολλητικής ταινίας.
- Εμφάνιση: Σε ένα δοχείο που περιέχει το διάλυμα Na_2CO_3 τοποθετούνται τα δείγματα. Αποτέλεσμα της εμφάνισης είναι η δημιουργία του επιθυμητού γεωμετρικού σχεδιασμού στη ρητίνη. [59]
- Πλύση με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο
- Ψήσιμο δειγμάτων στους 160 °C για 2h.

Η πειραματική διαδικασία για *διπλή λιθογραφία θετικού τόνου* δειγμάτων και αύξηση πάχους 110 μm είναι η ακόλουθη:

- Καθαρισμός δειγμάτων
- Εναπόθεση ξηρής ρητίνης (πάχος 60μm-dry photoresist polyimide, PC σειρά 1000). Η ξηρή ρητίνη έχει δύο προστατευτικά liners, από τα οποία αφαιρέσαμε το ένα για να κολλήσει πάνω στο PCB.

- Η διαδικασία κόλλησης έγινε μέσω του laminator. Οι συνθήκες του lamination ήταν: θερμοκρασία $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ταχύτητα $S=1$, πίεση $P=8$, max).
- Ψήσιμο στο hotplate στους $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2'.
- Αφαίρεση του πρώτο liner της ρητίνης με κολλητική ταινία.
- Ψήσιμο στο hotplate στους $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1h.
- Εναπόθεση 2ου στρώματος ξηρής ρητίνης με lamination. Οι συνθήκες του lamination ήταν: θερμοκρασία $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ταχύτητα $S=1$, πίεση $P=8$, max).
- Γίνεται έκθεση για 60" για τα δύο στρώματα ρητίνης.
- Ψήσιμο στους 120°C για 2'
- Αφαίρεση 2ου liner της ρητίνης
- Εμφάνιση: Σε ένα δοχείο που περιέχει το διάλυμα Na_2CO_3 τοποθετούνται τα δείγματα.
- Πλύση με απιονισμένο νερό και στέγνωμα με άζωτο
- Ψήσιμο δειγμάτων στους $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2h.

6.2.3. Σφράγιση

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την σφράγιση του μικροροϊκού καναλιού είναι τρία: η πολυολεφίνη (πάχος $50\mu\text{m}$) (polyolefin elastomer, POE) που διαθέτει μια σιλικονούχα κόλλα από την μια πλευρά, το kرتون one sided (πάχος $50\mu\text{m}$), το οποίο είναι πολυμίδιο, με σιλικονούχα κόλλα (πάχος $37.5\mu\text{m}$) μόνο από την μια πλευρά και το kرتون double sided (πάχος $25\mu\text{m}$) με σιλικονούχα κόλλα (πάχος $55\mu\text{m}$) και από τις δυο μεριές. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε πολυολεφίνη, η οποία μένει αναλλοίωτη μέχρι τη θερμοκρασία των 110°C . Η σφράγιση των PCB έλαβαν χώρα στο καθαρό χώρο μέσω του laminator. Έγιναν προσπάθειες σφράγισης σε PCB με κανάλι χωρητικότητας 3 transistors, σε 2 PCB με κανάλι χωρητικότητας 10 transistors, όπου το ένα είχε ως top layer το prepreg και το δεύτερο solder mask και σε δείγματα με μονωτικό υλικό FR4 και ως bottom layer έχει χαλκό Cu. Οι πρώτες προσπάθειες σφράγισης και επιτυχούς διέλευσης έγιναν με απιονισμένο νερό μέσω σύριγγας στα PCB με 3 και 10 τρανζίστορς.

Υλικό σφράγισης: *kرتون one sided*

Στα PCB με 3 τρανζίστορς *χωρίς αύξηση πάχους*, με υλικό σφράγισης *kرتون one sided* και με μη χρωματισμένο νερό επιτυχημένες ήταν μόνο οι προσπάθειες σφράγισης που έγιναν με το χέρι και με συνθήκες lamination $T=110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=2$, $S=5$. Άλλες συνθήκες που δοκιμάστηκαν ήταν με $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $S=5$ και με διάφορες τιμές πίεσης όπως $P=2,4,9$. Σε αυτές τις συνθήκες είτε υπήρχε διαρροή είτε το kرتون πατούσε στο κανάλι. Το νερό περνά μέσω σύριγγας.

Στα PCB με 10 τρανζίστορς *χωρίς αύξηση πάχους*, με υλικό σφράγισης *kرتون one sided* και με μη χρωματισμένο νερό δεν ήταν επιτυχημένες προσπάθειες με συνθήκες lamination $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=2$, $S=5$ και $T=110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=2$, $S=5$. Υπήρχε

διαρροή. Το νερό περνά μέσω σύριγγας.

Υλικό σφράγισης: *kapton double sided*

Στα PCB με 3 τρανζίστορες *χωρίς αύξηση πάχους*, με υλικό σφράγισης *kapton double sided* και με μη χρωματισμένο νερό επιτυχημένη ήταν η προσπάθεια με το χέρι και όχι με συνθήκες lamination T=80 °C, P=2, S=5 λόγω διαρροής. Το νερό περνά μέσω σύριγγας.

Υλικό σφράγισης: *πολυολεφίνη*

Στα PCB με 3 τρανζίστορες *χωρίς αύξηση πάχους*, με υλικό σφράγισης *πολυολεφίνη* και με χρωματισμένο νερό επιτυχημένες ήταν οι προσπάθειες με το χέρι και με lamination T=80 °C, P=2, S=5. Ανεπιτυχής ήταν με συνθήκες lamination T=110 °C, P=2, S=5. Το νερό περνά μέσω σύριγγας.

Στα PCB με 3 τρανζίστορες *με αύξηση πάχους*, με υλικό σφράγισης *πολυολεφίνη* και με χρωματισμένο νερό επιτυχημένες ήταν οι δύο προσπάθειες με lamination T=80 °C, P=2, S=5 με τη χρήση σύριγγας και αντλίας αντίστοιχα. Με lamination T=110 °C, P=2, S=5 το κανάλι είχε διαρροή.

Στα PCB με 10 τρανζίστορες *χωρίς αύξηση πάχους* με top layer το prepreg, με υλικό σφράγισης *πολυολεφίνη* και με χρωματισμένο νερό επιτυχημένες ήταν η προσπάθεια σφράγισης με το χέρι και με lamination T=80 °C, P=4, S=5 μόνο με αργή παροχή νερού. Οι υπόλοιπες προσπάθειες T=80 °C, P=2 και P=9, S=5 και T=110 °C, P=2, S=5 είχαν διαρροή ή η *πολυολεφίνη* «πατούσε» στο κανάλι λόγω των διαστάσεων του τελευταίου. Χρησιμοποιήθηκε ακέτονη για την καλύτερη διέλευση των υγρών αλλά είχε ως αποτέλεσμα την ολική αποκόλληση της *πολυολεφίνης* από το κανάλι.

Στα PCB με 10 τρανζίστορες *χωρίς αύξηση πάχους* με top layer το solder mask, με υλικό σφράγισης *πολυολεφίνη* και με χρωματισμένο νερό ανεπιτυχείς ήταν όλες οι παραπάνω προσπάθειες.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε υποστρώματα FR4 και χαλκού, κάνοντας διπλή λιθογραφία με μάσκες όπου βρίσκονταν πάνω τους τα κανάλια με διάφορα πάχη, όπως των 2mm, 1mm και των 0.5mm. Στην πρώτη λιθογραφία σχηματίζονταν το μικροροϊκό κανάλι και στη δεύτερη γινόταν αύξηση πάχους αυτού. Πιο αναλυτικά, για το μικροροϊκό κανάλι *πλάτους 2mm*, διπλής λιθογραφίας, χωρητικότητας 3 και 10 τρανζίστορες οι συνθήκες lamination ήταν T=80 °C, P=2, S=5 και T=110 °C, P=2, S=5. Ανεπιτυχής ήταν για το κανάλι 10 τρανζίστορ και τη συνθήκη T=110 °C, P=2, S=5.

Για τα δείγματα με κανάλι 0.5mm μονής λιθογραφίας οι προσπάθειες δεν ήταν επιτυχημένες για T=80 °C και T=110°C γιατί υπήρχε διαρροή λόγω των μικρών

απόστασεων των δρόμων του καναλιού.

Τέλος, για τα υποστρώματα με κανάλια μάσκας 1mm η συνθήκη σφράγισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν $T=110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=2$, $S=5$ και ήταν επιτυχημένη.

Κεφάλαιο 7: Χαρακτηρισμός LoC

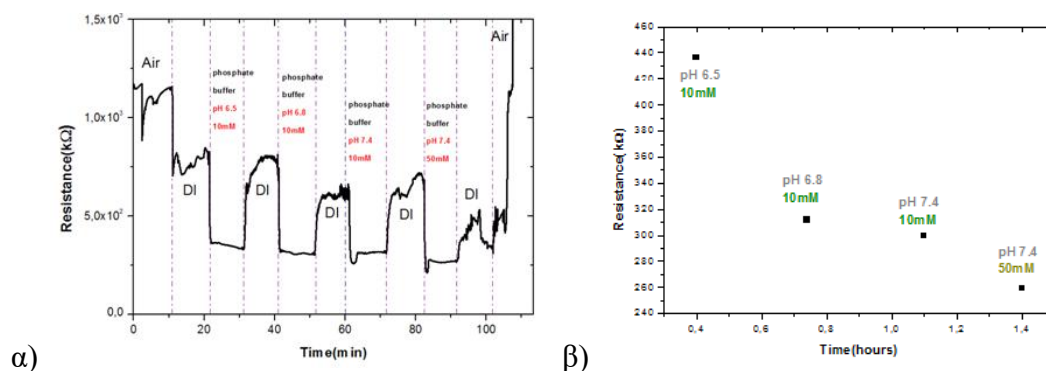
7.1 Απόκριση του lab on a chip σε συνεχή ροή με phosphate buffer διαφορετικών pH

Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε μία lab on a chip συσκευή με κανάλι το οποίο περιέχει τρία τρανζίστορς. Ο καθαρισμός της συσκευής έγινε με ακετόνη, προπανόλη, απιονισμένο νερό μέσω υδροβολέα και ψήθηκε στο hotplate στους 120°C για 15'. Έπειτα, εναποτέθηκε μία σταγόνα graphene oxide 0.5 mg/ml, αραιωμένο διάλυμα, η οποία ψήθηκε στους 200°C για 1 ώρα και μετρήθηκε η αντίστασή της η οποία ήταν της τάξης 10⁸. Προστέθηκαν αλλές δύο σταγόνες graphene oxide 0.5 mg/ml φθάνοντας η αντίσταση την τάξη μεγέθους των 10⁶, άφου ψήθηκαν ξανά. Τέλος, εναποτέθηκε μία τέταρτη σταγόνα για να ελεγχθεί αν θα προκληθεί επιπλέον μείωση της αντίστασης. Η αντίσταση που μετρήθηκε ήταν 1.5 MΩ. Στη συνέχεια έγινε σφράγιση του pcb με πολυολεφίνη με το χέρι και στη συνέχεια συνδέθηκε με την πλακέτα διακοπών, με τον multimeter Hewlett Packard 34401A καθώς και με την αντλία ροής. Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) Αρχικά από το κανάλι περνά αέρας για να μετρηθεί η αρχική αντίσταση.
- 2) Απιονισμένο νερό, για να παρατηρηθεί η μείωση της αντίστασης σε σχέση με την αρχική, και ποια θα είναι μεταβολή σε σχέση με τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικού διάφορων pH και συγκεντρώσεων.
- 3) *Phosphate buffer 10Mm pH 6.5*
- 4) Απιονισμένο νερό
- 5) *Phosphate buffer 10Mm pH 6.8*
- 6) Απιονισμένο νερό
- 7) *Phosphate buffer 10Mm pH 7.4*
- 8) Απιονισμένο νερό
- 9) *Phosphate buffer 50Mm pH 7.4*
- 10) Απιονισμένο νερό
- 11) Τέλος, περνά αέρας

Phosphate buffer 10mM pH 6.5 (0.5L DI water)	
<i>Na₂HPO₄ 2H₂O</i>	<i>KH₂PO₄</i>
0.2785g	0.46g
Phosphate buffer 10mM pH 6.8 (0.5L DI water)	
<i>Na₂HPO₄ 2H₂O</i>	<i>KH₂PO₄</i>
0.437g	0.345g
Phosphate buffer 10mM pH 7.4 (0.5L DI water)	
<i>Na₂HPO₄ 2H₂O</i>	<i>KH₂PO₄</i>
1.45g	0.123g
Phosphate buffer 50mM pH 7.4 (0.5L DI water)	
<i>Na₂HPO₄ 2H₂O</i>	<i>KH₂PO₄</i>
3.64g	0.62g

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο σχήμα 32α όπου μπορεί να παρατηρηθεί η μεταβολή της αντίστασης όταν από το κανάλι διέρχονται τα phosphate buffer σε σχέση με το νερό. Στο σχήμα 32β είναι η μεταβολή αντίστασης που αποκτά ο αισθητήρας για κάθε phosphate buffer.



Σχήμα 32: α) Απεικόνιση της αντίστασης συναρτήσει του χρόνου του lab on a chip με phosphate buffer διαφόρων συγκεντρώσεων και pH σε ροή, β) μεταβολή της αντίστασης συναρτήσει του χρόνου του lab on a chip στα διάφορα phosphate buffer.

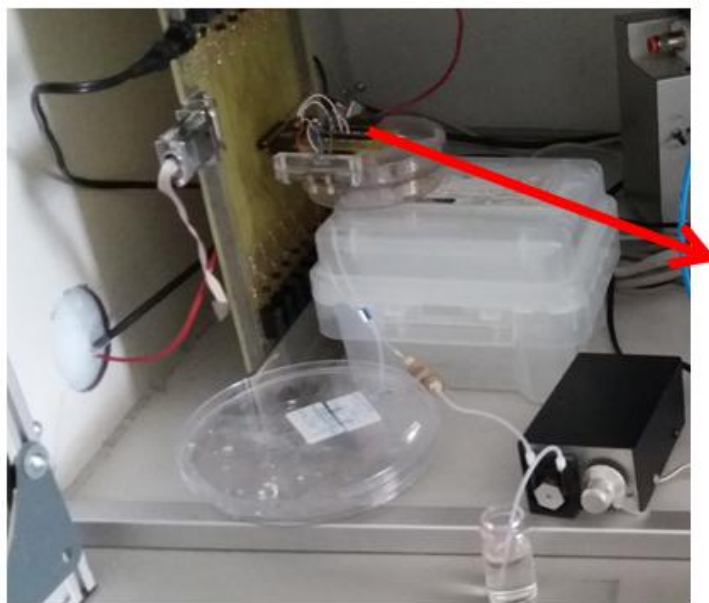
Η αντίσταση παρουσιάζει μείωση όταν από το κανάλι περνούν τα phosphate buffer σε σχέση με την αντίσταση που έχει ο αισθητήρας όταν από το κανάλι περνά απιονισμένο νερό. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί μία μικρή πτώση όταν περνούν τα phosphate buffer. Μεταξύ των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικού, η μεγαλύτερη τιμή της αντίστασης, $4,4 \times 10^2 \text{ k}\Omega$, παρουσιάζεται στη συγκέντρωση 10mM στο pH 6.5. Έπιπλέον, ακολουθούν τα διαλύματα με συγκέντρωση 10mM στο pH 6.8 και 10mM στο pH 7.4 με μικρή διαφορά μεταξύ τους γύρω στα 10 kΩ και τέλος το διάλυμα συγκέντρωσης 50 mM στο pH 7.4 όπου η αντίσταση ισούται με $2,6 \times 10^2 \text{ k}\Omega$.

7.2 Απόκριση του lab on a chip σε συνεχή ροή με βιολογικά δείγματα

Σκοπός αυτού του κεφαλαίου είναι η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της απόκρισης της lab on a chip συσκευής όταν από το μικροροϊκό κανάλι περνούν βιολογικά δείγματα. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν lab on a chip με τρία τρανζίστορ στα οποία πριν τη πειραματική διαδικασία έγινε καθαρισμός με ακετόνη, προπανόλη, απιονισμένο νερό, άζωτο και ψήσιμο στους 120 °C για 15’.

Πρώτη προσπάθεια:

Περιλαμβάνει τη μικροροϊκή συσκευή στην οποία έγινε μονή λιθογραφία για αύξηση πάχους όπως περιγράφεται στο Κεφ 7.2.2. Στη συνέχεια, προστίθενται τέσσερις σταγόνες GO 0.5mg/ml, αραιωμένο διάλυμα και ψήνεται στους 200°C για 1 ώρα. Έπειτα, σφραγίζεται με πολυλεφίνη με το χέρι και τοποθετούνται τα στηρίγματα PMMA στο πάνω μέρος του pcb για να τοποθετηθούν τα καλώδια στην είσοδο και στην έξοδο ώστε να επιτρέπεται η διέλευση των βιολογικών δειγμάτων. Στα ηλεκτρόδια source και drain των αισθητήρων τοποθετούνται μέσω ενός συγκολλητικού κράματος μαλακής συγκόλλησης, του kalay, καλώδια χαλκού τα οποία με τη σειρά τους συνδέονται στη πλακέτα διακοπών xy. Τα βιολογικά δείγματα διέρχονται μέσα στο μικροροϊκό κανάλι με τη βοήθεια της αντλίας η οποία συνδέεται με την είσοδο του καναλιού.



Σχήμα 33: Απεικόνιση της συνολικής διάταξης για την απόκριση του βιοαισθητήρα

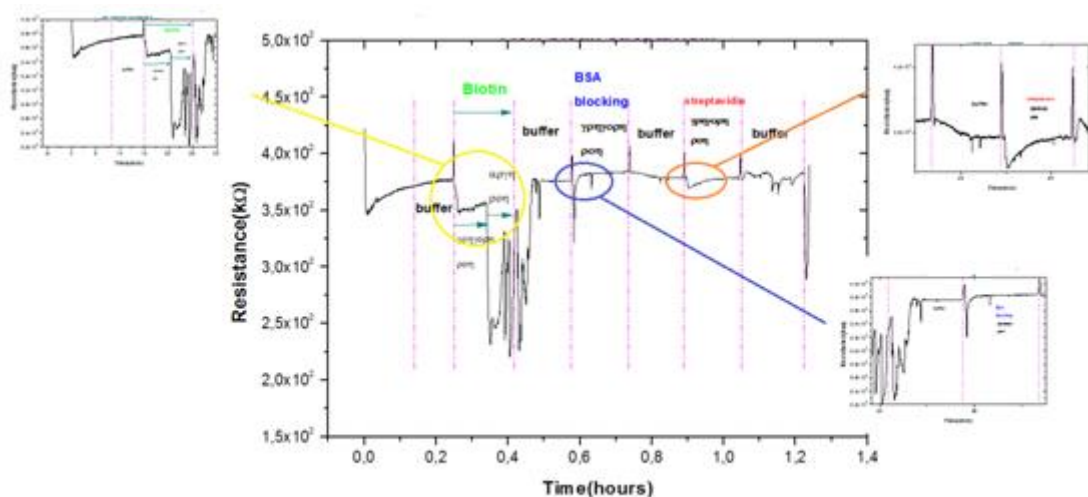
Τα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Βιοτίνη 100 $\mu\text{g/ml}$
- BSA blocking 10mg/ml
- Streptavidin 2.5 $\mu\text{g/ml}$
- Phosphate buffer 50mM pH 7.4

Η αρχική αντίσταση του αισθητήρα ήταν 0.6 M Ω . Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- 1) *Αέρας* (10')
- 2) *Phosphate buffer* (10')
- 3) *Βιοτίνη*. Αρχικά η βιοτίνη πέρασε από το κανάλι με γρήγορη ροή, στη συνέχεια η ροή μειώθηκε για να μπορεί να γίνει η πρόσδεση με τα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου. (10'-15')
- 4) *Phosphate buffer* (10')
- 5) *BSA blocking* (10'-15'), για την κάλυψη των θέσεων όπου η βιοτίνη δεν έχει προσδεθεί
- 6) *Phosphate buffer* (10')
- 7) *Στρεπταβιδίνη* (10-15')
- 8) *Phosphate buffer* (10')
- 9) *Απιονισμένο νερό*(10')
- 10) *Αέρας*

Η απόκριση της μικροροϊκής συσκευής απεικονίζεται παρακάτω:



Σχήμα 34: Η αντίσταση συναρτήσετι του χρόνου της συσκευής lab on a chip όταν από το κανάλι διέρχονται βιολογικά δείγματα.

Δεύτερη προσπάθεια:

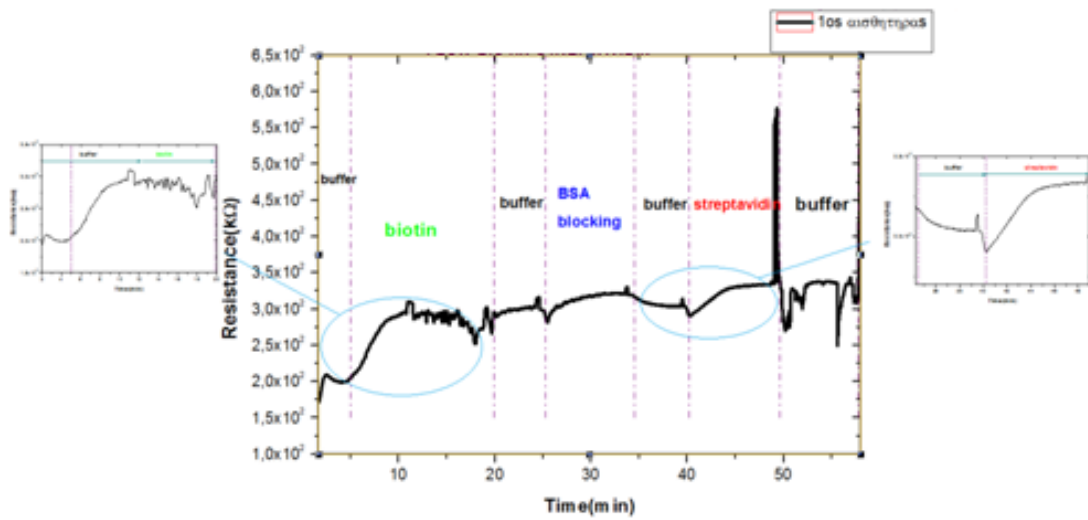
Όπως στην πρώτη δοκιμή, περιλαμβάνει τη μικροροϊκή συσκευή στην οποία έγινε μονή λιθογραφία για αύξηση πάχους ενώ στη συνέχεια στα ηλεκτρόδια τοποθετούνται τρεις σταγόνες graphene oxide 0.5 mg/ml, αραιωμένο διάλυμα και ψήνεται σε μικρότερη θερμοκρασία, στους 180⁰C για 1 ώρα καθώς υπάρχουν περισσότερες ομάδες υδροξυλίου πάνω στις οποίες μπορεί να προσδεθεί η βιοτίνη. Τα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Βιοτίνη 100 μg/ml
- BSA blocking 10mg/ml
- Streptavidine 2.5 μg/ml
- Phosphate buffer 50mM pH 7.4

Η αρχική αντίσταση του αισθητήρα ήταν 0.655 MΩ. Η ροή ήταν συνεχής και γρήγορη γιατί στην αργή ροή βιοτίνη φράζει το κανάλι και δημιουργεί θόρυβο στο σήμα. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- 1) *Αέρας (10')*
- 2) *Phosphate buffer (10')*
- 3) *Βιοτίνη (20')*
- 4) *Phosphate buffer (10')*
- 5) *BSA blocking (20')*, για την κάλυψη των θέσεων όπου η βιοτίνη δεν έχει προσδεθεί
- 6) *Phosphate buffer (10')*
- 7) *Στρεπταβιδίνη (10')*
- 8) *Phosphate buffer (10')*
- 9) *Απιονισμένο νερό (10')*
- 10) *Αέρας*

Η μεταβολή της αντίστασης συναρτήσει του χρόνου:



Σχήμα 35: Η αντίσταση συναρτήσει του χρόνου της συσκευής lab on a chip όταν από το κανάλι διέρχονται βιολογικά δείγματα.

Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα και Μελλοντική εργασία

8.1 Συμπεράσματα

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, δηλαδή την εισαγωγή των βιολογικών δεικτών στο μικροροϊκό κανάλι του συστήματος lab on a chip, συμπεραίνουμε ότι πραγματοποιήθηκε η αλληλεπίδραση της βιοτίνης και στρεπταβιδίνης σε υπόστρωμα PCB. Αυτή η αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε μέσω της μεταβολής της αντίστασης κατά τη real-time μέτρηση της.

Πιο συγκεκριμένα, έγινε πρώτη προσπάθεια ανίχνευσης βιολογικών δεικτών σε υπόστρωμα Si/SiO₂. Το Si/SiO₂ αρχικά τροποποιήθηκε κατάλληλα με plasma O₂ το οποίο δημιουργεί αλλαγή στη μορφοποίηση της επιφάνειας προσδίδοντάς της τραχύτητα και ομάδες -OH. Στη συνέχεια, τροποποιήθηκε με APTES για μεγαλύτερη πρόσφυση φύλλων GO. Έπειτα, εναποθέτοντας σταγόνες βιοτίνης-BSA blocking-στρεπταβιδίνης πάνω σε επιφάνεια οξειδίου γραφενίου 0.5mg/ml παρατηρήθηκε αλλαγή της αγωγιμότητας και αύξηση της αντίστασης λόγω της αλληλεπίδρασης βιοτίνης-στρεπταβιδίνης.

Επιπλέον, παρακολούθηθηκε η μεταβολή της αντίστασης με real-time μέτρηση σε υγρό δείγμα πάνω σε Si/SiO₂ με grapheme oxide 0.5mg/ml. Αρχικά, μετρήθηκε η αντίσταση όσο το δείγμα ήταν στον αέρα και ακολούθησαν μετρήσεις για σταγόνες buffer, βιοτίνης και στρεπταβιδίνης.

Όσον αφορά, το σχεδιασμό του lab on a chip, χρησιμοποιήθηκε ένα στρώμα μονωτικού υλικού FR4, το οποίο αποτελείται από ίνες γυαλιού. Πάνω και κάτω αυτού, τοποθετήθηκε το πρώτο και δεύτερο στρώμα χαλκού. Στο πρώτο στρώμα βρίσκεται ο heater και στο δεύτερο στρώμα τα pads της πύλης των τρανζίστορς. Έπειτα, προστέθηκαν πάνω από τα στρώματα χαλκού, δύο στρώματα prepreg αντίστοιχα, το οποίο είναι ένα εποξικό υλικό που παρουσιάζει μεγάλη μηχανική αντοχή και πάνω από το prepreg χρησιμοποιήθηκε το τρίτο (B.Copper) και τέταρτο (F.Copper) στρώμα χαλκού όπου βρίσκονται τα pads των ηλεκτροδίων απαγωγού-πηγής και του heater, αντίστοιχα. Το PCB καλύπτεται με solder mask προστατεύοντας το χαλκό ώστε να μην οξειδωθεί.

Από το μικροροϊκό κανάλι, στη συνέχεια, γίνεται διέλευση phosphate buffer διάφορων συγκεντρώσεων και pH, κατά την οποία παρατηρείται αλλαγή στη αγωγιμότητα. Τέλος, ακολουθεί ο έλεγχος της απόκρισης του βιοαισθητήρα όταν από το κανάλι περνά βιοτίνη και στρεπταβιδίνη. Τα υγρά δείγματα εισέρχονται στο κανάλι μέσω μιας περισταλτικής αντλίας, αντλούνται στο θάλαμο πάνω από τους τρεις ανιχνευτές γραφενίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη και τέλος τα δείγματα οδηγούνται στο θάλαμο αποβλήτων.

8.2 Μελλοντική Εργασία

Θεωρώντας αυτή τη διπλωματική εργασία ως βάση για την ανάπτυξη ενός συστήματος lab on a chip και την ανίχνευση βιοτίνης-στρεπταβιδίνης, υπάρχει δυνατότητα εξέλιξης της μελέτης αυτής, με τη δημιουργία νέων συσκευών lab on a chip. Πιο συγκεκριμένα, οι θερμοαντήρες να βρίσκονται σε μικροτέρα απόσταση από το μικροροϊκό κανάλι το οποίο να έχει μεγαλύτερο πάχος και μικρότερο πλάτος. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη σφράγιση του καναλιού και διέλευση των βιολογικών δειγμάτων χωρίς προβλήματα λόγω των αλάτων τους. Επιπλέον, στη βελτιωμένη έκδοση των διατάξεων χρήσιμο είναι να παραληφθούν οι αριθμητικοί χαρακτήρες για την αποφυγή προβλημάτων διαρροής. Στη συνέχεια, στα σημεία των ηλεκτροδίων ωφέλιμο είναι να υπάρχουν οπές για την άμεση σύνδεση στην πλακέτα.

Όσον αφορά την ανίχνευση, σ' αυτή την εργασία έγινε ανίχνευση της αλληλεπόδρασης της βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης, όπως προαναφέρθηκε. Σε μελλοντική εργασία θα θέταμε ως στόχο την ανίχνευση βιολογικών δειγμάτων DNA σε συσκευές lab on a chip όπου στο κανάλι να περιέχονται 10 τρανζίστορες. Πιο αναλυτικά, το δείγμα DNA θα πολλαπλασιάζεται λόγω των θερμαινόμενων ζωνών και θα οδηγείται μέσω του μικροροϊκού καναλιού στους βιοαισθητήρες που σχηματίστηκαν με graphene oxide όπου θα ανιχνεύεται και θα καταλήγει στο θάλαμο αποβλήτων.

Βιβλιογραφία

1. R. Satto, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, Physical Properties of Carbon Nanotubes, Imperial College Nanotubes, (2003).
2. V. I. Kasatochkin, V. V. Korshak, Y. P. Kudryavtsev, A. M. Sladkov, and I. E. Sterenberg, Crystalline Structure of Carbyne, Carbon, 11, 70, (1973).
3. Σερεμέτης Λάμπρος, Μελέτη της αλληλεπίδρασης Γραφενίου/ Πολυμερικού Υποστρώματος μέσω φασματοσκοπίας Raman, Πανεπιστήμιο Πατρών,(2013).
4. Frank Schwierz, Graphene transistors, Nature Nanotechnology,487, 488, 489, 493, (2010).
5. Qu Yuan He, Shixin Wu, Zongyou Yin and Hua Zhang, Graphene-based electronic sensors, Chemical Science, 1764, 1765, 1767, (2012).
6. Paredes JI, Villar-Rodil S, Soli´s-Ferna´ndez P, Marti´nez-Alonso A, Tasco´n JMD. Atomic force and scanning tunneling microscopy imaging of graphene nanosheets derived from graphite oxide. Langmuir; 25 (10): 5957–68 (2009).
7. D. Pandey, R. Reifengerger, R. Piner. Scanning probe microscopy study of exfoliated oxidized graphene sheets. Surf. Sci. 602 (9) 1607-1613 (2008).
8. H. A. Becerril, J. Mao, Z. Liu, R. M. Stoltenberg, Z. Bao, Y. Chen. Evaluation of solution-processed reduced graphene oxide films as transparent conductors. ACS Nano, 2 (3) 463-470 (2008).
9. Satyaprakash Sahoo, Geetika Khurana, Sujit K. Barik, S. Dussan, D. Barrionuevo, and Ram S. Katiyar. In situ Raman studies of electrically reduced graphene oxide and its field emission properties. J. Phys. Chem. 117 5485-5491 (2013).
10. H. C. Schniepp, J. L. Li, M. J. McAllister, H. Sai, M. Herrera-Alonso, D. H. Adamson et al. Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. J. Phys. Chem. B, 110 (17) pp. 8535-8539 (2006).
11. Yinxi Huang, Xiaochen Dong, Yumeng Shi, Chang Ming Li, Lain-Jong Li and Peng Chen, Nanoelectronic biosensors based on CVD grown graphene, Nanoscale, 1486, 1487, (2010).
12. Yasuhide Ohno, Kenzo Maehashi, Koichi Inoue, and Kazuhiko Matsumoto, Label-Free Aptamer-Based Immunoglobulin Sensors Using Graphene Field-Effect Transistors, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 070120-1-3, (2011).
13. Catherine Rivet, HyewonLee, AlisonHirsch, SharonHamilton, HangLu, Microfluidics for medical diagnostics and biosensors, www.elsevier.com/locate/ces, 1490, (2011).
14. Saurabh Kumar, Ved Varun Agrawal, Renu John, Bansi Malhotra, Microfluidic-integrated biosensors: Prospects for point-of-care diagnostics, Biotechnology journal, 1268, 1270-5 (2013).
15. J. Cooper McDonald and George M. Whitesides, Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices, Accounts of chemical Research, (2002).
16. George Luka, Ali Ahmadi, Homayoun Najjaran, Evangelyn Alocilja, Maria DeRosa, Kirsten Wolthers, Ahmed Malki, Hassan Aziz, Asmaa Althani and Mina Hoorfar, Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications, Sensors, 30011-25, (2015).
17. Πηνελόπη Μπαγιάτη, Κατεργασία και τροποποίηση Πολυμερικών Υλικών για την κατασκευή και ενεργοποίηση με ηλεκτροδιαβροχή μικρορευστομηχανικών διατάξεων, 2, (2007).

18. Huai-Ning Chang, Development of immunoassay using graphene and microfluidic platforms, University of Michigan, (2015).
19. Μίαρης Αναστάσιος, Μελέτη ιδιοτήτων εκπομπής πεδίου τρισδιάστατων καθόδων Οξειδίου του Γραφενίου, 27-9, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, (2014).
20. Kazuaki Furukawa and Yuko Ueno, Biosensing on a Graphene Oxide Surface, Front-line Research On Graphene, vol.11 No.8, 1, 2, (2013).
21. Peng Zuo, XiuJun Li, Delfina C. Dominguez, and Bang-Ce Ye, A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection, NIH Public Access, 3-5, (2014).
22. Giannitsis Athanasios, Microfabrication of biomedical lab-on-chip devices. A review. Department of Electronics, Tallinn University of Technology, 109-112,128, (2011).
23. D. Moschou, N. Vourdas, M.K.Filippidou, V.Tsouti, G. Kokkoris, G. Tsekenis, I. Zergioti, S. Chatzandroulis, A. Tserepi, Integrated biochip for PCR-based DNA amplification and detection on capacitive biosensors.
24. C.C.Katsidis, Εισαγωγή στην Μικροηλεκτρονική (ΕΤΥ-482), Ανάπτυξη μονοκρυσταλλικού πυριτίου για εφαρμογές στη μικροηλεκτρονική,1.
25. Ζυγούρης Νικηφόρος, Ηλεκτρικός χαρακτηρισμός οξειδίων του πυριτίου ανεπτυγμένων είτε θερμικά είτε με τη μέθοδο της ιοντοβολής. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 28, 29 (2012).
26. Ευφροσύνη Τσουναϊ, Πολυμερικά υμένα για την υδροφιλοποίηση μικροκαναλιών μικρορευστονικών διατάξεων, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 25-26, (2015).
27. http://www.microchemicals.com/technical_information/substrate_cleaning_adhesion_photoresist.pdf
28. Ηλιάδου Ελένη, Σχεδιασμός, Σύνθεση και Μελέτη Βιολογικών Δράσεων Πεπτιδίων της HARP, Πανεπιστήμιο Πατρών, 24, 25, (2010).
29. Κυπαρίδου Ε., Τσίγκα Α., Κεφ.15 «Ανοσοϊστοχημεία», 233, 234.
30. Κιτσαρά Μαρία, Οπτικοί αισθητήρες για χημικούς / βιολογικούς προσδιορισμούς υλοποιημένοι με μικροτεχνολογία πυριτίου, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 172-174, (2009).