



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ
ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ
ΔΡΑΣΟΥΝ ΩΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΛΕΝΤΙΝΑΣ – ΜΑΡΙΑΣ Γ. ΒΑΝΙΚΙΩΤΗ

Διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού Ε.Μ.Π.

ΕΠΙΒΛΕΨΗ:

Κ. ΚΟΡΔΑΤΟΣ

Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, Ιούνιος 2017



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ
ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ
ΔΡΑΣΟΥΝ ΩΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΛΕΝΤΙΝΑΣ – ΜΑΡΙΑΣ Γ. ΒΑΝΙΚΙΩΤΗ

Διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού Ε.Μ.Π.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κ. ΚΟΡΔΑΤΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Α. ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ, Όμ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Α. ΤΣΕΤΣΕΚΟΥ, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, Ιούνιος 2017

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ. «Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών» του Ε.Μ.Π.. Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο και στο Ίδρυμα ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, θα ήθελα να ευχαριστήσω κατ' αρχάς τον επιβλέποντα αναπληρωτή καθηγητή κ. Κώστα Κορδάτο για τις ιδέες, τις συμβουλές και την επιστημονική καθοδήγηση του σε κάθε στάδιο της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ το Ίδρυμα ιατροβιολογικών ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για τη φιλοξενία και τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Από το χώρο αυτό, ευχαριστώ το συνεπιβλέποντα Δρ. Γιώργο Τσέκενη για τη συνεργασία και την καθοδήγηση στο πειραματικό μέρος και στο θεωρητικό υπόβαθρο.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, οφείλω να ευχαριστήσω από το χώρο του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου τους Α. Ντζιούνη από τη σχολή Χημικών Μηχανικών, Σ. Παπάζογλου, Γ. Θεοδωράκο, Μ. Μακρύγιαννη και Χ. Κρύου από τη σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Α. Τσετσέκου, Φ. Πετρακλή και Μ. Περράκη από τη σχολή Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, χωρίς τη βοήθεια των οποίων δε θα ήταν εφικτή η εργασία αυτή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τον ενθουσιασμό, την αγωνία και τη συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Οι υπάρχουσες μεθοδολογίες για την ανίχνευση μολυντών στα τρόφιμα, οι οποίες στηρίζονται στις συνήθεις αναλυτικές τεχνικές, αδυνατούν να εγγυηθούν την ασφαλή παροχή των τροφίμων. Οι λόγοι είναι η πολυπλοκότητα των μεθόδων, η μεγάλη διάρκεια των αναλύσεων από τη δειγματοληψία μέχρι την απόκτηση αποτελεσμάτων (2-3 ημέρες) και το κόστος των μεθόδων. Η ανάγκη για μεθόδους αξιόπιστες και ταυτόχρονα απλές, φορητές, χαμηλού κόστους, υψηλής ταχύτητας και αυξημένης ευαισθησίας γίνεται φανερή. Η ιδέα αυτή υλοποιείται στη διάταξη του βιοαισθητήρα.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία ενός βιοαισθητήρα για την ανίχνευση ορισμένων μυκοτοξινών για εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων. Βασικά χαρακτηριστικά που απαιτείται να έχει ο βιοαισθητήρας είναι σταθερότητα, χαμηλό κόστος, χαμηλό όριο ανίχνευσης και επαναληψιμότητα.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου (Si_3N_4) επάνω στις οποίες θα γίνει τελικά η πρόσδεση και ανίχνευση της τοξίνης. Οι επιφάνειες τροποποιήθηκαν χημικά έτσι ώστε να προκύψουν δραστικές ομάδες που αντέδρασαν στη συνέχεια με την αλκόξυ- ομάδα ενός σιλανίου. Η επιφανειακή τροποποίηση πραγματοποιήθηκε με διαφορετικές κατεργασίες με στόχο τη σύγκριση των διάφορων μεθόδων. Η αποτίμηση κάθε μεθόδου έγινε με μία σειρά αναλυτικών τεχνικών.

Στις σιλανιοποιημένες επιφάνειες δοκιμάστηκε η πρόσδεση απταμερών εξειδικευμένων για τη δέσμευση κάποιας τοξίνης (αφλατοξίνη B1, ωχρατοξίνη A) με μεταβολή διαφόρων παραμέτρων και τελικά μελέτη της συμπεριφοράς της επιφάνειας σε έκθεση στην ίδια την τοξίνη. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές αύξησης της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα μέσω αύξησης των δραστικών σημείων στην επιφάνεια και, κατά συνέπεια, αύξησης των απταμερών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δένδριμερή πολυαμιδοαμίνης και πολυσακχαρίτες σε διάφορες συνθήκες και οι επιφάνειες μελετήθηκαν κατά κύριο λόγο με μικροσκοπία φθορισμού.

Συνολικά, τα πειράματα της εργασίας ήταν επιτυχή ως προς τη μελέτη των παραμέτρων, την αύξηση της ευαισθησίας και τη δέσμευση των τοξινών. Ωστόσο, παραμένουν ανοιχτά πολλά θέματα προς περαιτέρω διερεύνηση.

Abstract

Currently used methodologies for tracking toxic substances in food rely on common analytical methods, but fail to guarantee the safety of food chain. This is due to the complexity of the methods used, too much time needed between sampling, analysis and results recovery (few days) and the cost. It is absolutely necessary for new methods to be developed offering simplicity, portability, low cost, reliability, little time for analysis and increased sensitivity. These requirements can be met in a biosensor.

The present thesis aims to create a biosensor for applications in the food industry, in order to detect several mycotoxins. For this purpose, silicon nitride surfaces (Si_3N_4) were used, on which the binding and detection of toxins took place. The surfaces were chemically treated so as to create surface groups able to react with an alkoxy-silane. Surface modification included the application of various chemical treatment protocols as well as the comparison among them. Several analytical methods were used to this end.

Silanized surfaces were used as a substrate for binding aptamers specialized in the detection of a particular toxin (aflatoxin B1, ochratoxin A). Several parameters were altered in order to study the mechanisms of the system up to the point of applying the real toxin on the surface. Furthermore, some tests were carried out so as to increase the sensitivity of the biosensor through an increase in the number of reactive groups on the surface and thus in the number of aptamers. For this purpose, polyamidoamine dendrimers and polysaccharides were used in different conditions and surfaces were studied using fluorescence microscopy.

In conclusion, the experiments of this thesis have been successful, as far as increasing the sensitivity, studying several parameters and binding the toxins are concerned. However, much is yet to be investigated.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	1
Ευρετήριο εικόνων	2
Ευρετήριο πινάκων	3
Ευρετήριο σχημάτων	4
Εισαγωγή	6
I. Θεωρητικό μέρος	9
Βιοαισθητήρες	9
Απταμερή	13
Αφλατοξίνη Β1	16
Ωχρατοξίνη Α	18
Σιλανιοποίηση	21
Τεχνικές ακινητοποίησης	22
Τεχνικές ενόργανης χημικής ανάλυσης	24
Δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης	30
Φθορίζουσες ουσίες	31
Πολυσακχαρίτες	32
II. Πειραματικό μέρος	34
Ενότητα 1 – Χημική τροποποίηση επιφανειών νιτριδίου του πυριτίου	35
Εισαγωγή	35
Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα	37
Συμπεράσματα	46
Ενότητα 2 – Αφλατοξίνη Β1	48
Εισαγωγή	48
Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα	48
Συμπεράσματα	53
Ενότητα 3 – Ωχρατοξίνη Α	55
Εισαγωγή	55
Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα	56
Συμπεράσματα	72
Ενότητα 4 – Πολυσακχαρίτες	73
Εισαγωγή	73
Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα	73
Συμπεράσματα	84
III. Γενικά συμπεράσματα	85
IV. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	86
V. Βιβλιογραφία	88
VI. Παράρτημα 1. – Εικόνες μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM)	97
VII. Παράρτημα 2. – Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM)	101
VIII. Παράρτημα 3. – Φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR)	103
IX. Παράρτημα 4. – Φάσμα φθορισμού ακτίνων x (XRF)	104
X. Παράρτημα 5. – Φωτογραφικό υλικό	105
Βιογραφικό σημείωμα	106

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1 α-στ. Γραφική απεικόνιση της διάταξης MRR.....	12
Εικόνα 2. Χημικός τύπος της αφλατοξίνης Β1	16
Εικόνα 3. Χημικός τύπος της ωχρατοξίνης Α	19
Εικόνα 4. Μηχανισμός σιλανιοποίησης για τρι-αλκοξυ-σιλάνιο	22
Εικόνα 5. Απλουστευμένο σχέδιο διάταξης μεθόδου AFM	25
Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση των διαφόρων τμημάτων ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης	27
Εικόνα 7. Χημικός τύπος FITC (Fluorescein isothiocyanate)	32
Εικόνα 8. Χημικός τύπος FAM (Fluorescein amidite)	32
Εικόνα 9. Χημικός τύπος χιτοζάνης.....	33
Εικόνα 10. Χημικός τύπος υαλουρονικού οξέος.....	33
Εικόνα 11. Χημικός τύπος του σιλανίου GOPTS	38
Εικόνα 12. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού διαδοχικής υβριδοποίησης για συγκεντρώσεις απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου 10μΜ – 10μΜ.....	51
Εικόνα 13. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού διαδοχικής υβριδοποίησης για συγκεντρώσεις απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου 50μΜ – 10μΜ.....	51
Εικόνα 14. Σημείο με προσδεμένο απταμερές στην επιφάνεια μετά την προσθήκη αιθανολαμίνης	61
Εικόνα 15. Σημείο με προσδεμένο απταμερές στην επιφάνεια χωρίς προσθήκη αιθανολαμίνης	61
Εικόνα 16. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού με PAMAM G2 1% (Σχήματα 6 και 7)	68
Εικόνα 17. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού με PAMAM G2 1% (Σχήματα 11, 13 και 15).....	68
Εικόνα 18. Χημικός τύπος BS3	69
Εικόνα 19. Πρωτόκολλο σύζευξης EDC-NHS	77
Εικόνα 20 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο απευθείας στο σιλάνιο	82
Εικόνα 21 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο σε PAMAM	82
Εικόνα 22 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο σε χιτοζάνη	83
Εικόνα 23 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο σε υαλουρονικό οξύ	83

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Αναφορές του RASFF σε ξηρούς καρπούς για το 2011.....	6
Πίνακας 2. Σύγκριση απταμερών – αντισωμάτων	15
Πίνακας 3. Όρια ευρωπαϊκής νομοθεσίας του 2006 για τις αφλατοξίνες.....	17
Πίνακας 4. Όρια ευρωπαϊκής νομοθεσίας του 2006 για την ωχρατοξίνη A.....	20
Πίνακας 5. Χημικές κατεργασίες που πραγματοποιήθηκαν	38
Πίνακας 6. Μέσες τιμές τραχύτητας κάθε επιφάνειας.....	41
Πίνακας 7. Στοιχειακή ανάλυση μη σιλανιοποιημένων επιφανειών (% βάρος).....	42
Πίνακας 8. Στοιχειακή ανάλυση σιλανιοποιημένων επιφανειών (% βάρος)	43

Ευρετήριο σχημάτων

Σχήμα 1. Σήμα φθορισμού από την πρόσδεση απταμερούς τροποποιημένου με θειόλη σε επιφάνειες σιλανιοποιημένες και μη	44
Σχήμα 2. Σήμα φθορισμού από την πρόσδεση απταμερούς τροποποιημένου με θειόλη σε σιλανιοποιημένες επιφάνειες μετά από διαδοχικές εκπλύσεις.....	45
Σχήμα 3. Δοκιμές συνδυασμών συγκεντρώσεων απταμερούς και συμπληρωματικού κλώνου	50
Σχήμα 4. Σύγκριση σήματος φθορισμού σε διαφορετικές επιφάνειες και διαφορετικές μεθόδους υβριδοποίησης.....	52
Σχήμα 5. Σύγκριση σήματος φθορισμού πριν και μετά την έκθεση σε αναλύτες	53
Σχήμα 6. Σύγκριση σήματος φθορισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων PAMAM γενιάς G2	58
Σχήμα 7. Σύγκριση σήματος φθορισμού διαφορετικών γενεών PAMAM σε συγκέντρωση 1%	59
Σχήμα 8 α-ε. Σύγκριση σήματος φθορισμού πριν και μετά την προσθήκη αιθανολαμίνης σε διαφορετικές γενιές PAMAM	62
Σχήμα 9. Σύγκριση σήματος φθορισμού διαφόρων συγκεντρώσεων φθοριζόντων απταμερών προσδεμένων σε διαφορετικές γενιές PAMAM.....	63
Σχήμα 10. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για PAMAM G0 και G2 και διαδοχική υβριδοποίηση.....	64
Σχήμα 11. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο N3) για PAMAM G0 και G2 και διαδοχική υβριδοποίηση.....	64
Σχήμα 12. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για PAMAM G0 και G2 και προϋβριδοποίηση.....	65
Σχήμα 13. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο N3) για PAMAM G0 και G2 και προϋβριδοποίηση.....	66
Σχήμα 14. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για PAMAM G0 και σύγκριση τρόπων υβριδοποίησης.....	67
Σχήμα 15. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για PAMAM G2 και σύγκριση τρόπων υβριδοποίησης.....	67
Σχήμα 16. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για διαφορετικούς συνδέτες	69
Σχήμα 17. Σήμα φθορισμού συμπληρωματικού κλώνου (φίλτρο N3) για διαφορετικά μήκη απταμερών και προϋβριδοποίηση.....	71
Σχήμα 18. Σήμα φθορισμού συμπληρωματικού κλώνου (φίλτρο N3) για διαφορετικά μήκη απταμερών και διαδοχική υβριδοποίηση.....	71
Σχήμα 19. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς OTA σε επιφάνειες τροποποιημένες με διάλυμα χιτοζάνης, με και χωρίς συνδέτη (γλουτεραλδεϋδη)	74

Σχήμα 20. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς προσδεμένου σε PAMAM και χιτοζάνη	75
Σχήμα 21. Σύγκριση διαδοχικής υβριδοποίησης και προϋβριδοποίησης για επιφάνεια τροποποιημένη με χιτοζάνη – φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου	76
Σχήμα 22. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς OTA σε επιφάνειες τροποποιημένες με διάλυμα υαλουρονικού οξέος, με και χωρίς τροποποίηση σύζευξης (crosslinking)	78
Σχήμα 23. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς προσδεμένου σε PAMAM και υαλουρονικό οξύ	79
Σχήμα 24. Σύγκριση διαδοχικής υβριδοποίησης και προϋβριδοποίησης για επιφάνεια τροποποιημένη με υαλουρονικό οξύ– φθορισμός απταμερούς	80
Σχήμα 25. Σύγκριση διαδοχικής υβριδοποίησης και προϋβριδοποίησης για επιφάνεια τροποποιημένη με υαλουρονικό οξύ– φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου.....	80
Σχήμα 26. Σήμα φθορισμού συμπληρωματικού κλώνου πριν και μετά την έκθεση στον αναλύτη (τοξίνη OTA)	81

Εισαγωγή

Οι ξηροί καρποί αποτελούν αγαθά παγκοσμίως διακινούμενα. Πολλά από αυτά παράγονται σε αναπτυσσόμενες χώρες, οι οποίες δε διαθέτουν ή αδυνατούν να αφιερώσουν πόρους σε τεχνολογίες ελέγχων των αγαθών αυτών για τη διακρίβωση της ποιότητας και καταλληλότητάς τους για βρώση από τον άνθρωπο ή τα ζώα.

Ο συνηθέστερος λόγος απόρριψης ξηρών καρπών του διεθνούς εμπορίου είναι η ύπαρξη τοξινών σε επίπεδα ανώτερα από τα επιτρεπτά. Το σύστημα άμεσης ειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις τροφές στην Ευρώπη (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) ανέφερε 635 περιστατικά ακατάλληλων παρτίδων το 2011 λόγω μυκοτοξινών. [1] Από αυτά, τα 585 (ποσοστό 92%) σχετιζονταν με αφλατοξίνες, ιδιαίτερα σε φιστίκια (320 αναφορές, ποσοστό 54,7%), ενώ 35 αφορούσαν στην ωχρατοξίνη Α (ποσοστό 0,06%, αναφορές κυρίως σε μπαχαρικά, δημητριακά και ζωοτροφές). Στον ακόλουθο πίνακα, συγκεντρώνονται περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με αυτές τις αναφορές.

Πίνακας 1. Αναφορές του RASFF σε ξηρούς καρπούς για το 2011

Καρπός	Αριθμός αναφορών	Ποσοστό % αναφορών	Λόγω αφλατοξινών	Λόγω ωχρατοξινών
Αραχίδες (φιστίκια αράπικα)	183	47.8	170	0
Φιστίκια κελυφωτά	86	22.5	21	0
Φουντούκια	32	8.4	21	0
Αμύγδαλα	12	3.1	5	0
Καρύδια	7	1.8	2	0
Αποξηραμένα φρούτα	121	-	77	9

Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι τα ποσοστά το 2011 ήταν σημαντικά μειωμένα σε σύγκριση με παλαιότερα έτη, κυρίως λόγω της αύξησης διενέργειας ελέγχων στο εμπόριο τροφίμων. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι το 2008, μόλις 3 χρόνια νωρίτερα, τα

καταγεγραμμένα περιστατικά ήταν 933 (σχεδόν 60% περισσότερα), εκ των οποίων τα 902 αναφέρονταν σε αφλατοξίνες και 20 στην ωχρατοξίνη Α, ενώ αντίστοιχα το 2005 παρατηρήθηκε ρεκόρ καταγραφής περιστατικών με 996 αναφορές, 946 από τις οποίες αφορούσαν στις αφλατοξίνες και 42 στην ωχρατοξίνη Α. Σημειώνεται επίσης ότι παρότι η τάση για αναφορές σε εισαγωγές ξηρών καρπών είναι μειούμενη, οι αναφορές των αφλατοξινών σε ζωοτροφές ολοένα αυξάνονται. [1]

Ο όγκος των ξηρών καρπών που εισάγεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση απαιτεί ταχεία ανάλυση και εντοπισμό τυχόν ακατάλληλων παρτίδων. Η διασφάλιση της ποιότητας της τροφής είναι υψίστης σημασίας για τις σύγχρονες κοινωνίες. Τον τελευταίο αιώνα, η μόλυνση των τροφών εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα, τόσο ως προς τη μόλυνση από φυσική παρουσία τοξινών και μικροοργανισμών, αλλά και ως προς την παρουσία χημικών παραγόντων που προέρχονται από ανθρώπινη δραστηριότητα. Συνεπώς, η μόλυνση των τροφών μπορεί να προκαλέσει ένα σημαντικό ζήτημα δημόσιας υγείας. Η έγκαιρη ανίχνευση των μολυσμένων ή ακατάλληλων τροφίμων μπορεί να περιορίσει τα κρούσματα δηλητηριάσεων και τα περιστατικά νοσηλείας σε νοσοκομεία.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη διερεύνηση της ποιότητας των τροφίμων είναι η υγρή χρωματογραφία (high-performance liquid chromatography, HPLC), η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin-layer chromatography, TLC) και η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS). Οι μέθοδοι αυτές παρέχουν αυστηρό ποιοτικό έλεγχο, ωστόσο είναι χρονοβόρες, ακριβές και σύνθετες για να τις χειριστεί μη εξειδικευμένο προσωπικό. Επιπλέον, δεν μπορούν να εφαρμοστούν στη γραμμή παραγωγής ή διακίνησης αγαθών.

Αντί της χρήσης χημικών μεθόδων, έχει προταθεί η χρήση βιοαισθητήρων, στους οποίους το τμήμα βιολογικής αναγνώρισης των μολυντών αποτελείται από απταμερή. Τα απταμερή είναι μονόκλωνες αλληλουχίες γενετικού υλικού, εξειδικευμένες στον εντοπισμό ενός ορισμένου αναλύτη. Αναλύτες μπορεί να αποτελούν ορισμένες τοξίνες, βαρέα μέταλλα, ιχνοστοιχεία και λοιπές χημικές ενώσεις ενδιαφέροντος που περιέχονται στις τροφές. Βασικό χαρακτηριστικό των απταμερών είναι η υψηλή τους εκλεκτικότητα, καθώς και η δυνατότητα «αναγέννησης» και επαναχρησιμοποίησης, κάτι το οποίο δίνει τη δυνατότητα πολλαπλών χρήσεων του βιοαισθητήρα. Με αυτό τον τρόπο, η διαδικασία μπορεί να γίνει απλή και οικονομική, χωρίς να απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό ή πολύπλοκες διαδικασίες, ενώ παράλληλα δεν υστερεί σε ευαισθησία και εκλεκτικότητα.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε η εφικτότητα δημιουργίας και εφαρμογής ενός τέτοιου βιοαισθητήρα για τη βιομηχανία τροφίμων. Σκοπός ήταν, όχι μόνο η κατασκευή της διάταξης, αλλά και η μελέτη των επιμέρους παραμέτρων και η βελτιστοποίησή τους. Οι παράμετροι αυτές αφορούν στη δομή της διάταξης και στην απόδοση του βιοαισθητήρα.

Η εργασία διακρίνεται σε αυτοτελείς ενότητες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές σειρές πειραμάτων. Παρόλα αυτά, κάθε επόμενη σειρά πειραμάτων αξιοποιεί τα αποτελέσματα των προηγούμενων, με προσανατολισμό στην επίτευξη βέλτιστων συνθηκών. Από τα πειράματα που παρουσιάζονται γίνεται αντιληπτό ότι πρόκειται για ένα αρκετά περίπλοκο θέμα με πλήθος βαθμών ελευθερίας. Στόχος της εργασίας αυτής είναι η παρουσίαση ιδεών και πειραμάτων προς την κατεύθυνση της πραγματοποίησης ενός λειτουργικού βιοαισθητήρα, δίνοντας όμως παράλληλα κίνητρο για περαιτέρω μελέτη, περισσότερο ευρεία και σε μεγαλύτερο βάθος, ώστε να επιτευχθεί, όπως προαναφέρθηκε, μία αποτελεσματική, ταχεία, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος ελέγχου τροφίμων.

I. Θεωρητικό μέρος

Βιοαισθητήρες

Ο όρος «βιοαισθητήρας» αποτελεί σύντμηση του όρου «βιολογικός αισθητήρας». Οι βιοαισθητήρες (biosensors) είναι διατάξεις που χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύσουν την παρουσία ή τη συγκέντρωση ενός βιολογικού αναλύτη, όπως είναι ένα βιομόριο, μία βιολογική δομή ή ένας μικροοργανισμός, μέσω ενός φυσικοχημικού ανιχνευτή. [2] Πιο αναλυτικά, οι βιοαισθητήρες, ανάλογα με την κατασκευή τους, παρουσιάζουν ευαισθησία σε ένα φυσικό ή χημικό ερέθισμα που προκαλείται από μία βιολογική απόκριση και παράγουν αντίστοιχα ηλεκτρικά σήματα ως συνέπεια αυτού. [3] Συγκεντρώνουν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον στις μέρες μας καθώς αποτελούν ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση βιολογικών αντιδράσεων και τον εντοπισμό ουσιών, ακόμα και σε ίχνη, σε δείγματα όπως κύτταρα, ιστούς, βιολογικά υγρά και τρόφιμα. Η πληροφορία μπορεί να παρέχεται σε πραγματικό χρόνο και αυτό είναι ένα από τα βασικά τους πλεονεκτήματα.

Οι βιοαισθητήρες μελετώνται και βελτιώνονται συνεχώς με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας, την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα, το μειωμένο όριο ανίχνευσης, το μειωμένο χρόνο ανάλυσης, αλλά και τη δυνατότητα να παρέχουν ποιοτική και ποσοτική πληροφορία. Ζωτικής σημασίας χαρακτηριστικά για έναν «εμπορικό» βιοαισθητήρα είναι επιπλέον η φορητότητα, η οποία συνδέεται στενά με την εξέλιξη της μικροηλεκτρονικής, το χαμηλό κόστος ή/και η δυνατότητα πολλαπλών χρήσεων και η ευκολία στο χειρισμό και στην αξιολόγηση του αποτελέσματος. Σημειώνεται, ακόμα, ότι βασικό εν γένει χαρακτηριστικό τους είναι η υψηλή εκλεκτικότητα.

Όλοι οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από τρία μέρη: το βιολογικό στοιχείο που αναγνωρίζει τον αναλύτη, αντιδρά χημικά με αυτόν και παράγει σήμα, το μετατροπέα του σήματος και ένα ηλεκτρονικό σύστημα που περιλαμβάνει ενίσχυση, ανάγνωση και ερμηνεία του σήματος. [2] [4] Το ακινητοποιημένο βιομόριο, ή σωστότερα το βιολογικό στοιχείο, είναι αυτό που αντιδρά χημικά με το αναλύτη. Ως βιοστοιχεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν νουκλεϊκά οξέα (απταμερή), πρωτεΐνες (ένζυμα, αντισώματα), τμήματα ιστών, μικροοργανισμοί, οργανίδια και λοιπά. [4] Επίσης, συμπληρωματικά με το βιολογικό στοιχείο (ακινητοποιημένο βιομόριο) του βιοαισθητήρα, μπορεί να υπάρχει κάποιο χημικό μόριο, όπως τα δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης (PAMAM), τα οποία παρέχουν το πρόσθετο πλεονέκτημα της αύξησης της ενεργής επιφάνειας του βιοαισθητήρα λόγω αύξησης των προς αντίδραση θέσεων. Εκτός από τα δενδριμερή,

μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε μόρια διαθέτουν παρόμοια διάταξη και πολλαπλά σημεία πρόσδεσης, όπως είναι οι πολυσακχαρίτες. [5]

Οι βιοαισθητήρες, ανάλογα με την αρχή λειτουργίας τους και το είδος του μετατροπέα σήματος, διακρίνονται σε οπτικούς (ή φωτονικούς), ηλεκτροχημικούς, ακουστικούς – πιεζοηλεκτρικούς και θερμικούς. Συνοπτικά, οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην τεχνολογία οπτικών ινών (optical fibres). Οι οπτικές ίνες μεταφέρουν ακτινοβολία (φως) δεδομένου μήκους κύματος σε μία φωτοδίοδο, η οποία ανιχνεύει τη μεταβολή πριν και μετά τη διέγερση. [4]

Η χημική αντίδραση που προαναφέρθηκε προκαλεί τη μεταβολή κάποιου παραμέτρου, φυσικής ή χημικής. Αυτή η μεταβολή μετατρέπεται σε μετρήσιμο σήμα και οδηγείται στη μονάδα επεξεργασίας. Το σήμα μπορεί να είναι ηλεκτρικό, οπτικό ή θερμικό. Στην περίπτωση ενός οπτικού βιοαισθητήρα, η χημική αντίδραση προκαλεί μεταβολή σε συγκεκριμένη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, συνήθως στην ορατή περιοχή, η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως η οπτική απορρόφηση, ο φθορισμός, και η χημειο- και βιο-φωταύγεια. Η οπτική μεταβολή αυτή σχετίζεται ποσοτικά με την παρουσία του αναλύτη, ο οποίος συμμετέχει στη χημική αντίδραση. [5]

Οι οπτικές ίνες αποτελούν κυματοδηγούς (waveguides) που έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν το οπτικό σήμα σε μεγάλες αποστάσεις. Συνεπώς, οποιαδήποτε οπτική μεταβολή η οποία οφείλεται στην δράση του βιοστοιχείου που βρίσκεται ακινητοποιημένο στο άκρο της οπτικής ίνας, είναι δυνατό να μεταφερθεί στον ανιχνευτή του βιοαισθητήρα και το φαινόμενο να εκτιμηθεί ποσοτικά. Σε άλλη τεχνική εφαρμογή των οπτικών ινών, το βιοστοιχείο είναι δυνατό να ακινητοποιηθεί όχι στο άκρο, αλλά στην εξωτερική επιφάνεια της ίνας και να 'φωτίζεται' από το λεγόμενο διαφεύγον κύμα (evanescent wave). Αυτό αποτελεί μια λεπτότατη στιβάδα φωτός που εξέρχεται από την ίνα και την περιβάλλει. Συνεπώς, οι τυχόν οπτικές μεταβολές που πραγματοποιούνται μέσα στα όρια του διαφεύγοντος κύματος επηρεάζουν την ένταση του κυρίως κύματος που διατρέχει εσωτερικά την ίνα, φαινόμενο το οποίο εκτιμάται ποσοτικά. [5]

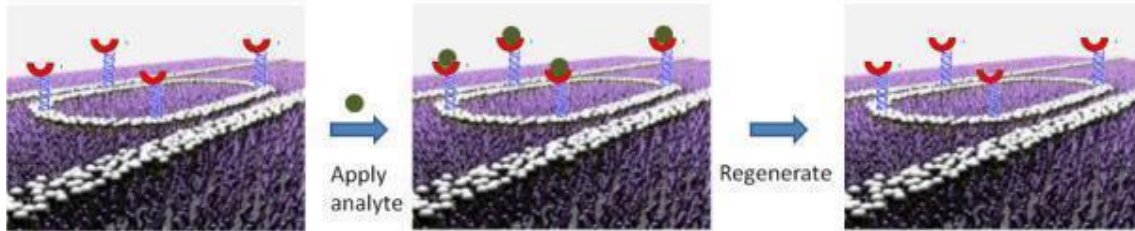
Ιδιαίτερα στην περίπτωση των βιοαισθητήρων, όπου ο όγκος του δείγματος είναι μικρός και η επίδραση από ακαθαρσίες μπορεί να είναι μεγάλη, είναι σημαντική η ενίσχυση του σήματος και ο διαχωρισμός των φασμάτων απορρόφησης ώστε να γίνει σωστά η χημική ταυτοποίηση. [6] Εκτός από την καθαρότητα της επιφάνειας, είναι σημαντικό να υπάρχει σημαντική τραχύτητα δεδομένου ότι στους οπτικούς (φωτονικούς) αισθητήρες γίνεται χρήση λείζερ. Όπως προαναφέρθηκε, είναι επιθυμητή η λεία επιφάνεια του βιοαισθητήρα και, αν αυτό δεν είναι δυνατό, τότε επιβάλλεται η διατήρηση της τραχύτητας χωρίς μεταβολές. Στους βιοαισθητήρες γενικά, έχει σημασία η όσο το δυνατόν υψηλότερη ευαισθησία. Αυτό επιτυγχάνεται με αύξηση της ενεργής επιφάνειας του αισθητήρα, όχι όμως μέσω αύξησης του μεγέθους ή μέσω τράχυνσης,

αλλά μέσω της δημιουργίας περισσότερων δραστικών θέσεων στην επιφάνεια. Περισσότερα διαθέσιμα σημεία πρόσδεσης του αναλύτη αυξάνουν την πιθανότητα ανίχνευσής του. Η μεταβολή της τραχύτητας θεωρείται ανεπιθύμητη στους οπτικούς αισθητήρες λόγω της ευαισθησίας των οπτικών ινών που αξιοποιούν, όπως προαναφέρθηκε.

Στους οπτικούς (βιο)αισθητήρες, η ενίσχυση του σήματος πραγματοποιείται μέσω ενός δακτυλίου (micro-ring resonator, MRR). Ο ενισχυτής με μικροδακτύλιο αποτελείται από ένα σετ κυματοδηγών, εκ των οποίων τουλάχιστον ένας είναι διαμορφωμένος σε ένα βρόχο (loop). Οι διατάξεις με μικροδακτύλιο (micro-ring resonators, MRRs) παρουσιάζουν εκλεκτικότητα μήκους κύματος λειτουργώντας ως φίλτρα. Ο κυματοδηγός «παγιδεύει» ένα μέρος της ακτινοβολίας στο βρόχο αναγκάζοντάς το να ακολουθήσει διαφορετική διαδρομή. Όταν η φάση της κυκλικής διαδρομής της ακτινοβολίας είναι ίση με ακέραιο πολλαπλάσιο του 2π , τότε παρατηρείται ενίσχυση του σήματος λόγω συντονισμού. Με τον τρόπο αυτό, η ακτινοβολία αυξάνει σε ένταση λόγω των επαναλαμβανόμενων κυκλικών διαδρομών. [7] [8] [9] [10]

Στις ακόλουθες εικόνες, παρουσιάζεται μία γραφική απεικόνιση της διάταξης MRR. Στις εικόνες απεικονίζεται πυριτική επιφάνεια με κυματοδηγούς που διαμορφώνουν ένα βρόχο. Ο βρόχος, λόγω διαφορετικής χημικής σύστασης από την υπόλοιπη επιφάνεια, μπορεί μέσω χημικής τροποποίησης να καλυφθεί από ένα στρώμα που επιτρέπει την πρόσδεση του προς ανίχνευση βιολογικού στοιχείου (αναλύτη). Αντίστοιχα, η υπόλοιπη επιφάνεια καλύπτεται με ανάλογο τρόπο με μόρια που θα εμποδίσουν την πρόσδεση του συγκεκριμένου βιοστοιχείου (antifouling coating). Σε βελτιστοποιημένες συνθήκες, το στρώμα μορίων επάνω στον κυματοδηγό θα πρέπει να μπορεί να δεσμεύσει τα μόρια του αναλύτη και κατόπιν σε διαφορετικές συνθήκες να τα αποδεσμεύσει καθιστώντας τα σημεία πρόσδεσης και πάλι ενεργά (regeneration).





Εικόνα 1 α-στ. Γραφική απεικόνιση της διάταξης MRR

Για τη δημιουργία του βιοαισθητήρα πρέπει το βιολογικό στοιχείο να προσδεθεί στην επιφάνεια του αισθητήρα. Η βάση του αισθητήρα μπορεί να είναι μεταλλική, πολυμερική και λοιπά. Η συνηθέστερη μέθοδος είναι η επικάλυψη (coating) της βάσης με το βιολογικό στοιχείο μετά από κατάλληλη τροποποίηση της επιφάνειας και ομοιοπολική πρόσδεση σε αυτή του βιομορίου. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση μορίων, όπως τα σιλάνια (με αμινομάδες ή εποξειδικές ομάδες), η πολυλυσίνη και η αζωτούχος κυτταρίνη, τα οποία επιτρέπουν την πρόσδεση σε πυριτικές επιφάνειες. Σημειώνεται ότι η χημική τροποποίηση θα αναλυθεί στην παρούσα εργασία και αποτελεί σημαντικό μέρος της πειραματικής διαδικασίας. Εναλλακτική μέθοδος είναι η επικάλυψη με εγκλεισμό του βιοστοιχείου σε τριδιάστατες δομές, όπως πλέγματα υδρογέλης (hydrogel) ή ξηρογέλης (xerogel), που προκύπτουν από τη μέθοδο sol-gel (λύματος – πηκτής) ή πολυμερικά δίκτυα με εναλλασσόμενο φορτίο που έχουν εναποτεθεί στην επιφάνεια της βάσης κατά στρώματα (layer-by layer). Στις περιπτώσεις αυτές, το βιοστοιχείο μπορεί να συνδέεται είτε φυσικά, είτε χημικά με το υπόστρωμα. Ο χημικός εγκλεισμός του βιοστοιχείου δημιουργεί ισχυρούς χημικούς δεσμούς με το υπόστρωμα, ακινητοποιώντας πλήρως το βιοστοιχείο. Αντίθετα, ο φυσικός εγκλεισμός προκαλείται από την ανάπτυξη φυσικών δυνάμεων που επιτρέπουν μικρή ελευθερία στην κίνηση του βιοστοιχείου, μόνο όμως μέσα στους πόρους του πολυμερικού δικτύου. [4]

Το βιολογικό στοιχείο και ο αναλύτης συνδέονται με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

- Με φυσική προσρόφηση. Η πρόσδεση γίνεται με φυσικές δυνάμεις, όπως δυνάμεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου και ιοντικές δυνάμεις.
- Με παγίδευση στους πόρους και εγκλεισμό (encapsulation).
- Με παγίδευση σε ημιπερατή μεμβράνη.
- Με ομοιοπολικούς δεσμούς.

Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, στον τομέα της υγείας και της προληπτικής ιατρικής, σε κλινικές αναλύσεις,

στη βιομηχανία, στη διεξαγωγή περιβαλλοντικών μελετών και στον έλεγχο περιπτώσεων ρύπανσης – μόλυνσης.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής βιοαισθητήρα είναι η συσκευή μέτρησης της γλυκόζης στο αίμα. Ακόμα, οι βιοαισθητήρες αξιοποιούνται σε εργαστηριακές μελέτες σχετικά με τη μετάσταση του καρκίνου εντοπίζοντας κύτταρα στα οποία έχει αλλοιωθεί η γενετική πληροφορία. Βιοαισθητήρες μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν για τον ποιοτικό έλεγχο στο νερό και στον αέρα ανιχνεύοντας και ποσοτικοποιώντας την παρουσία ρυπαντών, παθογόνων μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα στερεής, υγρής ή αέριας φύσης και βαρέων μετάλλων σε νερό ποταμών ή υπόγειων ρευμάτων. Επιπλέον, είναι δυνατό να ανιχνευθούν βακτήρια ή χημικές ουσίες που μεταφέρονται μέσω του αέρα ή μέσω υδάτινων οδών και να εντοπιστεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών που μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς ένα οικοσύστημα ή τον άνθρωπο σε επαφή με αυτό (παραδείγματα: χάρη, παραλιακές ζώνες) ή να υποδηλώνει διατάραξη της ισορροπίας του οικοσυστήματος αυτού.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η εφαρμογή των βιοαισθητήρων στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων. Βοηθούν στον ποιοτικό έλεγχο τροφών, υγρών (π.χ. γάλα) ή στερεών (κρέας, ψάρι, πουλερικά, ξηροί καρποί) ανιχνεύοντας και ποσοτικοποιώντας μέταλλα, τοξίνες, μικροοργανισμούς και λοιπά παθογενή στοιχεία. Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση όχι μόνο τοξικών και επιβλαβών ουσιών, αλλά και χρήσιμων, όπως οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία, τα οποία μετρώνται τακτικά κατά τον ποιοτικό έλεγχο. Ακόμα, δίνουν μια καλή εικόνα για την εκτίμηση της προόδου κάποιας βιολογικής δραστηριότητας, όπως είναι η ζύμωση στη μπίρα και στο γιαούρτι, μετρώντας αλκοόλες, οξέα και υδατάνθρακες. [4]

Απταμερή

Τα απταμερή (aptamers) είναι μονόκλινα (single-stranded) νουκλεϊικά οξέα (ssDNA ή ssRNA) ή πεπτίδια, με μικρό μήκος, δηλαδή μικρό αριθμό συνδεδεμένων βάσεων στην αλυσίδα. Για το λόγο αυτό, χαρακτηρίζονται ως ολιγονουκλεοτίδια (oligonucleotides). Κάθε απταμερές «κατασκευάζεται» για συγκεκριμένο σκοπό, συνεπώς η αλληλουχία των βάσεων του είναι αυστηρά καθορισμένη. Τα απταμερή χρησιμοποιούνται στην έρευνα και σε κλινικές μελέτες και προορίζονται για πρόσδεση σε στόχους με συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων. Η συμπληρωματικότητα ενός τμήματος της αλυσίδας τους με ένα συγκεκριμένο στόχο επιτρέπει το σχηματισμό αρκετά ισχυρής πρόσδεσης. Στόχοι αυτής της πρόσδεσης (αναλύτες) μπορεί να είναι μόρια (λόγου χάρη,

τοξίνες), πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα (γενετικό υλικό), κύτταρα (παραδείγματος χάρη, καρκινικά) ή ιστοί. [11]

Η αλληλουχία στην αλυσίδα του απταμερούς προκύπτει από τη «βιβλιοθήκη» SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). Η βιβλιοθήκη SELEX διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό τυχαίων μονόκλωνων αλληλουχιών μήκους 20 έως 100 νουκλεοτιδίων και «επιλέγει» εκείνες που ανταποκρίνονται στα δεδομένα που έχουν δοθεί, δηλαδή διαθέτουν κάποιο τμήμα συμπληρωματικό με την προς διερεύνηση ακολουθία. [12] Με μοντελοποίηση εικάζεται η αναδίπλωσή τους στο χώρο, η οποία θα καθορίσει την πρόσδεση του αναλύτη. Η τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή των μορίων περιορίζει σημαντικά τις επιλογές, ενώ η καταλληλότητα του απταμερούς επηρεάζεται σημαντικά από τις αναδιπλώσεις στο χώρο τόσο του στόχου, όσο και του απταμερούς.

Πειραματικές δοκιμές υποδεικνύουν τα απταμερή εκείνα που μπορούν να προσδεθούν στο στόχο, ενώ τα υπόλοιπα απομακρύνονται με έκπλυση. Τα απταμερή που επιλέχθηκαν πολλαπλασιάζονται μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και είναι διαθέσιμα για πειραματικές μελέτες. [13]

Συχνά, κατασκευάζεται και ένας συμπληρωματικός κλώνος (complementary strand), ο οποίος δίνει τη δυνατότητα υβριδοποίησης με το απταμερές (η αλυσίδα γίνεται δίκλωνη), αλλά και τη δυνατότητα αποδιάταξης, παρόντος του αναλύτη, ώστε να μπορεί εκείνος να δεσμευτεί στους βρόχους (loops) του απταμερούς. Ο συμπληρωματικός κλώνος διαφοροποιείται από το απταμερές διότι είναι τεχνητή αλληλουχία που δεν παρουσιάζει αναδιπλώσεις στο χώρο. Η παρουσία του συμπληρωματικού κλώνου είναι αναγκαία αρχικά, ώστε να μην αναδιπλώνεται το απταμερές μόνο του σχηματίζοντας δομή που δε θα επιτρέψει την πρόσδεση του αναλύτη στη συνέχεια. Επιπλέον, οι συμπληρωματικοί κλώνοι χρησιμοποιούνται κυρίως για την έμμεση ανίχνευση του αναλύτη. Επειδή αποτελούν τεχνητά μόρια, συχνά φέρουν κάποια φθορίζουσα ομάδα στο άκρο τους, σε αντίθεση με τους αναλύτες (τοξίνες κ.λπ.) που συνήθως δεν παρουσιάζουν φθορισμό, ενώ συχνά πρόκειται για πολύ μικρά μόρια που δεν μπορούν να τροποποιηθούν άμεσα με κάποια φθορίζουσα ουσία. Η παρουσία του αναλύτη, επομένως, πιστοποιείται έμμεσα μέσω παρατήρησης μείωσης του φθορισμού και πτώσης του σήματος στη μικροσκοπία φθορισμού, λόγω απομάκρυνσης της φθορίζουσας συμπληρωματικής αλυσίδας. [11] Τα απταμερή καθίστανται επομένως δελεαστικά για διατάξεις χαμηλού κόστους και πολλαπλών χρήσεων.

Ως προς την αναγνώριση των στόχων από τα απταμερή, υπάρχει το πλεονέκτημα της μεγάλης ποικιλίας και διαφορετικότητας στόχων, με χρήση φυσικά του κατάλληλου απταμερούς. Ωστόσο, κάθε απταμερές είναι σχεδιασμένο αποκλειστικά για την ανίχνευση ενός και μόνο μορίου, ενώ είναι παράλληλα δυνατό να γίνει διάκριση μεταξύ παρόμοιων χημικών δομών, παρέχοντας τη δυνατότητα υψηλής εκλεκτικότητας. [12]

Συγκρινόμενα με τα αντισώματα, τα απταμερή έχουν απλούστερη δομή και κατασκευάζονται *in vitro* μέσω της διαδικασίας SELEX, όπως προαναφέρθηκε. Η διαδικασία αυτή έχει χαμηλότερο κόστος από την *in vivo* παραγωγή των αντισωμάτων και περιλαμβάνει λιγότερο πολύπλοκες διεργασίες καθαρισμού. Επιπλέον, τα απταμερή, ως αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, αποτελούν σταθερότερες δομές από τα πρωτεϊνικά αντισώματα και μπορούν να υποστούν κύκλους εναλλαγής θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης αλάτων, αποδιάταξης (denaturation) και επαναδιάταξης (renaturation). Το τελευταίο δίνει τη δυνατότητα «αναγέννησης» του απταμερούς μετά τη δέσμευση και αποδέσμευση του αναλύτη, ώστε να είναι διαθέσιμο να δεσμεύσει κάποιο άλλο μόριο του αναλύτη στη συνέχεια. [14]

Η παραπάνω σύγκριση απταμερών και αντισωμάτων οπτικοποιείται στον πίνακα που ακολουθεί.

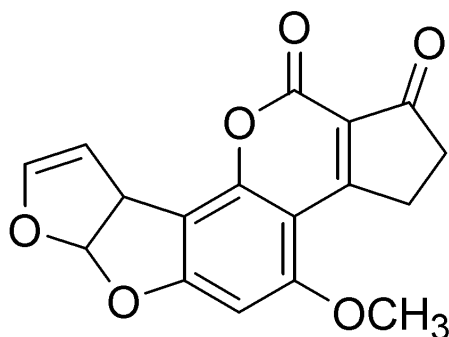
Πίνακας 2. Σύγκριση απταμερών – αντισωμάτων

	Απταμερή	Αντισώματα
Παραγωγή	In vitro χημική διεργασία	In vivo βιολογικά συστήματα
Στόχοι	Ιόντα, μικρά οργανικά μόρια, πρωτεΐνες, κύτταρα	Ανοσογενή στοιχεία
Χημική τροποποίηση	Εύκολη και άμεση	Περιορισμένη
Θερμική αποδιάταξη	Αντιστρεπτή	Αναντίστρεπτη
Σταθερότητα	Υψηλή	Χαμηλή

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον προς τους βιοαισθητήρες που βασίζονται σε απταμερή. Στους βιοαισθητήρες αυτούς, το παραγόμενο σήμα από τα απταμερή μπορεί να είναι ηλεκτροχημικό, χρωματομετρικό ή σήμα φθορισμού. Επιπλέον, είναι δυνατή η προσθήκη φθορίζουσας ουσίας στο απταμερές, γεγονός που οδηγεί σε σημαντικά πλεονεκτήματα. Η προσθήκη γίνεται συνήθως στο άκρο της αλυσίδας και η διαδικασία πραγματοποιείται κατά τη χημική σύνθεση του απταμερούς. Τα απταμερή που φέρουν φθορίζουσες ομάδες μπορούν να ανιχνευθούν άμεσα, αλλά και να εκτιμηθεί η μεταβολή στη συγκέντρωσή τους. [14]

Αφλατοξίνη Β1

Οι αφλατοξίνες ανήκουν στη οικογένεια των μυκοτοξινών και είναι τοξίνες που παράγονται ως μεταβολίτες των παρασιτικών μυκήτων *Aspergillus flavus* και *Aspergillus parasiticus*. Οι αφλατοξίνες έχουν χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα τοξικές και έχουν κατηγορηθεί ως καρκινογενείς. [15] Η δράση τους επιταχύνεται σε θερμά και υγρά κλίματα (λόγω μεγάλης ανάπτυξης των μυκήτων), ωστόσο δεν εξαλείφεται σε συνθήκες ηπιότερης θερμοκρασίας και υγρασίας.



Εικόνα 2. Χημικός τύπος της αφλατοξίνης Β1

Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις τύποι αφλατοξινών, οι AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, συν δύο επιπλέον μεταβολίτες, οι AFM1 και AFM2. Από αυτά, η AFB1 εμφανίζει τη μεγαλύτερη αφθονία και επικινδυνότητα. Οι αφλατοξίνες απαντώνται συχνά σε γεωργικά αγαθά και τρόφιμα, όπως το καλαμπόκι και άλλοι καρποί, έλαια καρπών, ξηροί καρποί και άλλα, που προορίζονται για βρώση από τον άνθρωπο ή για διάθεση ως ζωοτροφή. [16] Έχουν ανιχνευθεί σε φιστίκια, σπόρους βαμβακιού, καρύδια και αμύγδαλα, σύκα, μπαχαρικά, γάλα και πολλά ακόμα τρόφιμα και ποτά. [17] Παρουσιάζουν σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, επομένως διατηρούν ανεπηρέαστη τη χημική τους δομή κατά το μαγείρεμα. [17] [18]

Μεταξύ των αφλατοξινών, η αφλατοξίνη Β1 (AFB1) θεωρείται η πλέον τοξική, ενώ θεωρείται καρκινογικής για τον άνθρωπο (Group 1 κατά IARC – Carcinogenic to humans). [19] Η AFB1 παράγεται και από τα δύο προαναφερθέντα είδη μυκήτων. Η παρουσία της AFB1 σε τρόφιμα, κυρίως καρπούς, και η υψηλή τοξικότητά της έχουν οδηγήσει πολλές χώρες στη θέσπιση ανώτατων ορίων στην περιεχόμενη ποσότητά της σε βρώσιμα είδη. Για την Ευρωπαϊκή Ένωση, τα ανώτατα επιτρεπτά όρια στην κατηγορία των ξηρών καρπών και δημητριακών «για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικών σε τρόφιμα» είναι 8 (ή 5 κατά περίπτωση) µg/kg

για την AFB1 και 10 µg/kg για το σύνολο των αφλατοξινών (B1, B2, G1, G2) για ορισμένους ξηρούς καρπούς, ενώ για ορισμένους άλλους, καθώς και για τα δημητριακά, τα όρια διαμορφώνονται σε 2 µg/kg για την AFB1 και 4 µg/kg για το σύνολο των αφλατοξινών, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 165/2010 του 2010. [20] Σημειώνεται ότι ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός 1881/2006 του 2006 είχε αυστηρότερα όρια στις ίδιες κατηγορίες, επιβάλλοντας χαμηλότερες ανώτατες τιμές, δηλαδή 2 µg/kg και 4 µg/kg για την AFB1 και το σύνολο των αφλατοξινών, αντίστοιχα. [21] Αναλυτικά, οι ανώτατες τιμές συγκέντρωσης για την Ε.Ε. απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. [22]

Πίνακας 3. Όρια ευρωπαϊκής νομοθεσίας του 2006 για τις αφλατοξίνες

AFLATOXIN IN FOOD ^{1 2}			
Commodity	Maximum Level		
	B1	Sum of B1, B2, G1, G2	M1
Groundnuts (peanuts) and other oilseeds, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs, with the exception of groundnuts (peanuts) and other oilseeds for crushing for refined vegetable oil production	8.0 ppb	15.0 ppb	-
Almonds, pistachios and apricot kernels to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs (a)	12.0 ppb	15.0 ppb	-
Hazelnuts and Brazil nuts, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs (b)	8.0 ppb	15.0 ppb	-
Tree nuts, other than the tree nuts listed in (a) and (b), to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	5.0 ppb	10.0 ppb	-
Groundnuts (peanuts) and other oilseeds and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs, with the exception of crude vegetable oils destined for refining and refined vegetable oils	2.0 ppb	4.0 ppb	-
Almonds, pistachios and apricot kernels, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs (c)	8.0 ppb	10.0 ppb	-
Hazelnuts and Brazil nuts, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs (d)	5.0 ppb	10.0 ppb	-
Tree nuts, other than the tree nuts listed in (c) and (d), and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	2.0 ppb	4.0 ppb	-
Dried fruit to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	5.0 ppb	10.0 ppb	-
Dried fruit and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs	2.0 ppb	4.0 ppb	-
All cereals and all products derived from cereals, including processed cereal products, with the exception of foodstuffs listed in (d), (f) and (g)	2.0 ppb	4.0 ppb	-
Maize and rice to be subjected to sorting or other physical treatment before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs (d)	5.0 ppb	10.0 ppb	-
Raw milk, heat-treated milk and milk for the manufacture of milk-based products	-	-	0.050 ppb
Spices: <i>Capsicum spp.</i> (dried fruits thereof, whole or ground, including chilies, chili powder, cayenne and paprika) <i>Piper spp.</i> (fruits thereof, including white and black pepper) <i>Myristica fragrans</i> (nutmeg) <i>Zingiber officinale</i> (ginger) <i>Curcuma longa</i> (turmeric) Mixtures of spices containing one or more of the abovementioned spices	5.0 ppb	10.0 ppb	-
Processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children; level refers to dry matter (f)	0.10 ppb	-	-
Infant formulae and follow-on formulae, including infant milk and follow-on milk; level refers to product ready to use	-	-	0.025 ppb
Dietary foods for special medical purposes intended specifically for infants; level refers to dry matter, for milk and milk products to product ready to use (g)	0.10 ppb	-	0.025 ppb

* Levels currently under discussion

Η αντίστοιχη τιμή για τις Η.Π.Α. είναι 20 ppb για το σύνολο των αφλατοξινών για τις τροφές εξαιρουμένου του γάλακτος. Στην Κίνα, τα όρια είναι ελαφρώς υψηλότερα από

αυτά της Ε.Ε., ενώ στη Σιγκαπούρη το ανώτατο όριο για όλες σχεδόν τις τροφές είναι 5 ρrb για την αφλατοξίνη Β1. Στη Βραζιλία το όριο είναι 5 ρrb για τα δημητριακά και το κακάο και 10 ρrb για τους περισσότερους ξηρούς καρπούς και τα αποξηραμένα φρούτα. [22] Τέλος, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει θεσπίσει ως όριο τα 15 ρrb για το σύνολο των αφλατοξινών σε μη επεξεργασμένους ξηρούς καρπούς, ενώ μόνο για την αφλατοξίνη Β1 σε ζωοτροφές αγελάδων γαλακτοπαραγωγής το όριο ανέρχεται σε 5 ρrb. [15]

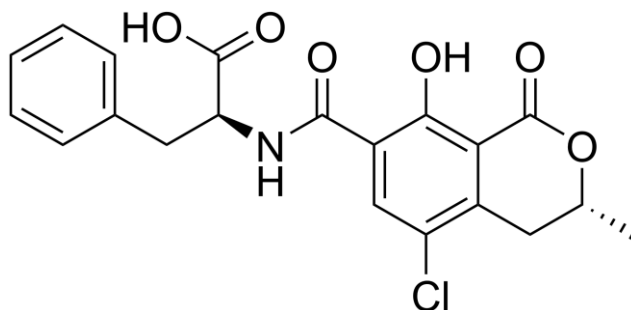
Κατά συνέπεια, καθίσταται αναγκαία η εύρεση μεθόδων εντοπισμού της ΑFB1, ώστε με ακρίβεια και επαναληψιμότητα να αξιολογείται η πιθανότητα έκθεσης στην τοξίνη. Έχουν αναπτυχθεί ήδη χρωματογραφικές μέθοδοι για το σκοπό αυτό, όπως η HPLC και η συνδυασμένη μέθοδος LC-MS, οι οποίες όμως είναι χρονοβόρες και αποκλείουν την ανάλυση εκτός εργαστηριακού χώρου. Αντίστοιχα, οι ανοσολογικές δοκιμές που έχουν αναπτυχθεί προσφέρουν κάποια πλεονεκτήματα, αλλά όχι ικανά να εφαρμοστεί γρήγορος επιτόπιος έλεγχος στη βιομηχανία τροφίμων. [23] Ιδιαίτερα, ο επιτόπιος και ταχύς έλεγχος μυκοτοξινών και άλλων πιθανών κινδύνων αποτελεί σημείο ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία τροφίμων, το οποίο δεν έχει επιτευχθεί ακόμα.

Μία άλλη μέθοδος που εφαρμόζεται για επιτόπια ανάλυση χρησιμοποιεί αντισώματα εξειδικευμένα στις ουσίες-στόχους. Τα αντισώματα, ωστόσο, αυξάνουν σημαντικά το κόστος, ενώ παράλληλα δεν είναι απολύτως σταθερά κατά την αποθήκευσή τους. [24] Τα απταμερή θεωρούνται μια καλή εναλλακτική των αντισωμάτων. Πρόκειται, όπως προαναφέρθηκε, για μονόκλωνο γενετικό υλικό (DNA ή RNA), το οποίο έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με ισχυρούς δεσμούς με ένα μόριο-στόχο. Το γενετικό υλικό εμφανίζει σημαντικά αυξημένη σταθερότητα ως προς τα αντισώματα σε συνθήκες αποθήκευσης, αλλά και σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, η παρασκευή τους έχει χαμηλότερο κόστος και είναι δυνατή η χρήση φθορίζουσας σήμανσης. [23]

Ωχρατοξίνη Α

Οι ωχρατοξίνες είναι μία υποκατηγορία μυκοτοξινών, οι οποίες αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού των μυκήτων του γένους *Aspergillus* και *Penicillium*. Οι μύκητες αυτοί ευνοούνται ανάλογα με το είδος τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Γενικά όμως είναι δυνατό να παραχθούν ωχρατοξίνες σε θερμοκρασίες από 0 °C έως 37 °C. [25] Οι μύκητες αυτοί αναπτύσσονται σε ωμές τροφές και τα προϊόντα μεταβολισμού τους είναι εν δυνάμει τοξικά. Για το σκοπό αυτό, πολλές χώρες έχουν διεξάγει μελέτες και αναλύσεις διαφόρων τροφών [26] και έχουν θεσπίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης των ωχρατοξινών.

Η πλέον σημαντική και τοξική από τις ωχρατοξίνες είναι η ωχρατοξίνη Α (ochratoxin A, OTA), που απαντάται φυσικά σε τρόφιμα. Η μόνη άλλη ωχρατοξίνη που απαντάται σε τρόφιμα είναι η ωχρατοξίνη Β, η οποία παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη τοξικότητα και μεγαλύτερη σπανιότητα. [15]



Εικόνα 3. Χημικός τύπος της ωχρατοξίνης Α

Η OTA εικάζεται ότι είναι νεφροτοξίνη, δηλαδή είναι υπεύθυνη για άμεσες αλλά και χρόνιες παθήσεις των νεφρών στα θηλαστικά. Επιπλέον, καταστρέφει το γενετικό υλικό (DNA) αλλοιώνοντάς το, με συνέπεια να προκαλεί τερατογενέσεις και καρκινογενέσεις. [27] Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός της καρκινογόνου ουσίας έχει επιβεβαιωθεί μόνο για τα θηλαστικά ζώα, και όχι ακόμα για τον άνθρωπο. Οι ωχρατοξίνες έχουν χαρακτηριστεί ως «πιθανώς καρκινογόνες για τον άνθρωπο» (“Potentially carcinogenic to humans” – Group 2B κατά IARC). [19] Έχει ακόμα αναφερθεί ότι προκαλούν δυσμενείς συνέπειες στο ανοσοποιητικό σύστημα και στο ήπαρ. [27]

Η ωχρατοξίνη Α έχει ανιχνευθεί στο ανθρώπινο αίμα και στο μητρικό γάλα, υποδεικνύοντας ότι προέρχεται από τη διατροφή. Πράγματι, η OTA συναντάται σε τρόφιμα όπως δημητριακά, κόκκους καφέ, αποξηραμένα φρούτα, σταφίδες, ρύζι, φασόλια και ξηρούς καρπούς, αλλά και σε ποτά όπως η μπύρα και το κρασί. Έχει ανιχνευθεί ακόμα σε κρέας, ιδιαίτερα χοιρινό και πουλερικά, ένδειξη για κατανάλωση μολυσμένης τροφής. [28] [29]

Η μέγιστη ποσότητα τοξίνης που έχει προταθεί στην ΕΕ ως συνιστώμενη για μέγιστη έκθεση ανά κιλό σωματικού βάρους ανά ημέρα είναι μόλις 14 ng. [30] Στις Η.Π.Α. η μέγιστη ημερήσια πρόσληψη (Tolerable Daily Income, TDI) είναι μόλις 5 ng/kg. Ως λογική συνέπεια αυτού, πολλές χώρες, ιδιαίτερα στην Ευρώπη, έχουν θεσπίσει ειδική νομοθεσία για τα ανώτατα επιτρεπτά ή συνιστώμενα όρια συγκέντρωσης σε τρόφιμα και ποτά. Τα όρια που θέσπισε η Ευρωπαϊκή Ένωση το 2006 [21] απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. [22]

Πίνακας 4. Όρια ευρωπαϊκής νομοθεσίας του 2006 για την ωχρατοξίνη Α

OCHRATOXIN A IN FOOD ^{1 3}	
Commodity	Maximum Level
Unprocessed cereals	5.0 ppb
All products derived from unprocessed cereals, including processed cereal products and cereals intended for direct human consumption with the exception of foodstuffs listed in (a) and (b)	3.0 ppb
Dried vine fruit (currants, raisins and sultanas)	10.0 ppb
Dried figs	8 - 10 ppb*
Dried fruit other than dried vine fruit and dried figs	1 - 2 ppb*
Roasted coffee beans and ground roasted coffee, excluding soluble coffee	5.0 ppb
Soluble coffee (instant coffee)	10.0 ppb
Cocoa products (cocoa powder, powder chocolate, chocolate powder, drinking chocolate, sweetened cocoa, chocolate, milk chocolate and white chocolate)	0.5 - 2 ppb*
Wine (including sparkling wine, excluding liqueur wine and wine with an alcoholic strength of not less than 15% volume) and fruit wine	2.0 ppb
Aromatised wine, aromatised wine based drinks and aromatised wine product cocktails	2.0 ppb
Grape juice, concentrated grape juice as reconstituted, grape nectar, grape must and concentrated must as reconstituted, intended for direct human consumption	2.0 ppb
Beer < 6% alcohol	0.2 ppb*
Liqueur wines	2 - 4 ppb*
Spices: <i>Capsicum</i> spp. (dried fruits thereof, whole or ground, including chillies, chili powder, cayenne and paprika) <i>Piper</i> spp. (fruits thereof, including white and black pepper) <i>Myristica fragrans</i> (nutmeg) <i>Zingiber officinale</i> (ginger) <i>Curcuma longa</i> (turmeric)	30 ppb (1.7.2010) 15 ppb (1.7.2012)
Liquorice (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> and other species), liquorice root, ingredient for herbal infusion	20 ppb
Liquorice extract for use in food, particular beverages and confectionery; level refers to pure and undiluted extract	80 ppb
Edible offal and products containing edible offal	5 - 15 ppb*
Blood products (such as black pudding and sausages)	2 - 5 ppb*
Baby foods and processed cereal based foods for infants and young children; level refers to dry matter (a)	0.50 ppb
Dietary foods for special medical purposes intended specifically for infants; level refers to dry matter, for milk and milk products to product ready to use (b)	0.50 ppb

* Levels currently under discussion

Για λόγους σύγκρισης, αναφέρεται ότι στην Κίνα τα όρια για κόκκους και φασόλια είναι 5 ppb τοξίνης, στη Σιγκαπούρη το όριο είναι 3 ppb για τροφές όπως τα δημητριακά, ο καφές και η μπύρα, ενώ στη Βραζιλία τα όρια είναι υψηλότερα (10 ppb) για είδη όπως τα δημητριακά, τα μπαχαρικά, τα αποξηραμένα φρούτα, το κρασί και ο καβουρδισμένος καφές. Ωστόσο, όσον αφορά σε παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά και προϊόντα που προέρχονται από κακάο, τα όρια μειώνεται σε 2 και 5 ppb, αντίστοιχα. Η Ελβετία έθεσε όριο τα 5 ppb για όλες τις τροφές πλην των παιδικών (0,5 ppb), ενώ η Τουρκία έχει όρια που κυμαίνονται μεταξύ 3 και 10 ppb. [22]

Το 2010 η Ε.Ε. τροποποίησε τον κανονισμό του 2006, θεσπίζοντας ταυτόχρονα ορισμένα συμπληρωματικά όρια με την προοπτική της μείωσης σε βάθος χρόνου. [20] Ακολούθως, το 2015 πραγματοποίησε νέα τροποποίηση με περαιτέρω μείωση των ορίων για τα καρυκεύματα. [31]

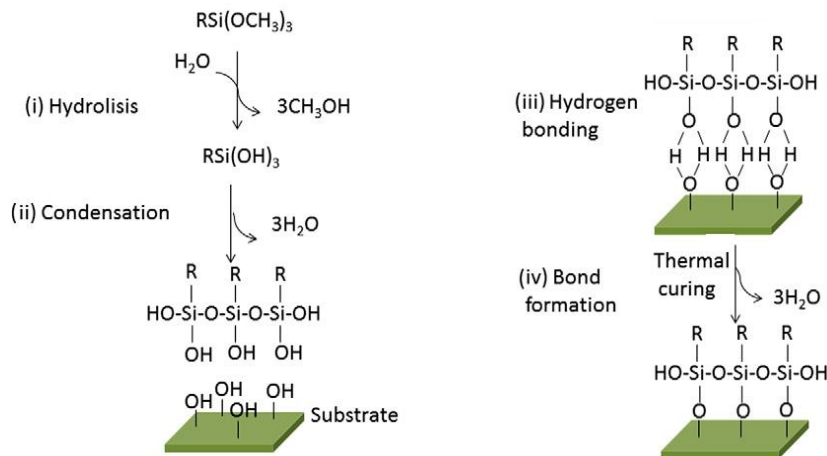
Ο εντοπισμός της ωχρατοξίνης Α στις τροφές γίνεται κυρίως με χρήση χρωματογραφικών μεθόδων, όπως είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (GC). [32] [33] Ωστόσο, έχει προταθεί η χρήση απταμερών με αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία της τοξίνης. [34] Με τα απταμερή εξασφαλίζεται εξειδίκευση ως προς το στόχο που ανιχνεύεται.

Σιλανιοποίηση

Τα σιλάνια χρησιμοποιούνται σε πλήθος εφαρμογών, σε εργαστηριακή αλλά και σε βιομηχανική κλίμακα. Αξιοποιούνται ως ενδιάμεσος συνδέτης (coupling agent) για την πραγματοποίηση διαφόρων αντιδράσεων, ως μέσα διασποράς και ως μέσα για την αύξηση της υδροφοβικότητας μιας επιφάνειας. [35] Έχει αναφερθεί πολλές φορές η αξιοποίηση των σιλανίων σε βιολογικές εφαρμογές με σκοπό την ακινητοποίηση βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, σε επιφάνεια μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή χημικών δεσμών. [36] Σημαντική, ακόμα, εφαρμογή των σιλανίων είναι για τη δημιουργία αυτο-σχηματιζόμενων στρωμάτων (self-assembly monolayers, SAM), η οποία βασίζεται στη δημιουργία των ομοιοπολικών δεσμών που μπορούν να σχηματίσουν τα σιλάνια. [37]

Σιλανιοποίηση (silanization) είναι η διαδικασία κάλυψης μιας επιφάνειας με μόρια οργανικού αλκοξυ-σιλανίου μέσω χημικής αντίδρασης. Επιφάνειες πυριτικές, όπως γυαλί, ή οξειδίων μετάλλων μπορούν να σιλανιοποιηθούν με την προϋπόθεση ότι διαθέτουν επιφανειακές ομάδες υδροξυλίων, με τις οποίες το σιλάνιο αντιδρά μέσω των αλκόξυ- ομάδων και μπορεί να σχηματίσει δεσμούς σιλοξάνης ($-Si-O-Si-$). Ο μηχανισμός της σιλανιοποίησης παρουσιάζεται αναλυτικότερα στην παρακάτω εικόνα. [37]

Η αντίδραση σιλανιοποίησης με αλκοξυ-σιλάνιο περιλαμβάνει 4 στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται υδρόλυση των αλκοξυ- ομάδων και σχηματίζονται σιλανόλες. Όταν η υδρόλυση έχει ολοκληρωθεί, γίνεται συμπύκνωση των μονομερών (μορίων σιλανίου) με ταυτόχρονη αποβολή νερού. Στο τρίτο στάδιο, τα μονομερή είναι έτοιμα να σχηματίσουν δεσμό υδρογόνου με την πυριτική επιφάνεια, ο οποίος στη συνέχεια μετατρέπεται σε ομοιοπολικό δεσμό κατά το στάδιο της θέρμανσης που ακολουθεί. [38] Όπως προαναφέρθηκε, η σιλανιοποίηση μιας πυριτικής επιφάνειας αυξάνει την υδροφοβικότητά της. Αναφέρεται ακόμα ότι οι σύγχρονες τεχνικές δεν έχουν κατορθώσει να ποσοτικοποιήσουν τους δεσμούς σιλοξάνης που σχηματίζονται. [35]



Εικόνα 4. Μηχανισμός σιλανιοποίησης για τρι-αλκοξυ-σιλάνιο

Τεχνικές ακινητοποίησης

Το γυαλί και οι πυριτικές επιφάνειες επιδέχονται χημική τροποποίηση μέσω ευέλικτων διαδικασιών με σκοπό τη σιλανιοποίηση. Απώτερος σκοπός είναι η ομοιοπολική πρόσδεση βιομορίων στις πυριτικές επιφάνειες. Η διαδικασία πρόσδεσης ολιγονουκλεοτιδίων σε σιλανιοποιημένες επιφάνειες πρέπει να πληροί προϋποθέσεις, όπως τη χημική σταθερότητα, την επιλογή του κατάλληλου μήκους και συγκέντρωσης ώστε να αποφεύγεται η στερεοχημική παρεμπόδιση, την υδροφιλικότητα του συνδέτη (linker) ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις σε κατάλληλο περιβάλλον και, τέλος, την κατά το δυνατόν μείωση των φαινομένων συγκράτησης ολιγονουκλεοτιδίων που δεν είναι χημικά προσδεμένα, αλλά συγκρατούνται μέσω φυσικής προσρόφησης (non-specifically bound). [39]

Για την ακινητοποίηση των βιομορίων, προτείνεται η εφαρμογή κάποιου είδους χημικής κατεργασίας. [39] Τα σιλάνια (ενδιάμεσα μόρια) μπορούν να προσδεθούν μόνο μετά την κατεργασία της επιφάνειας καθώς μόνο τότε υπάρχουν ενεργά σημεία για αντίδραση και σχηματισμό δεσμού. Τα σιλάνια, μετά την πρόσδεσή τους, μεταβάλλουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πυριτικής επιφάνειας και επιτρέπουν στη συνέχεια την πρόσδεση των βιομορίων με φυσική προσρόφηση ή χημικό δεσμό. [40] Η χρήση των

σιλανίων ως ενδιάμεσα μόρια θεωρείται απαραίτητη για να προσεγγιστεί η συγγένεια των βιομορίων με την πυριτική επιφάνεια. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει ακόμα ένα ενδιάμεσο μόριο, δηλαδή ένας συνδέτης μεταξύ του βιομορίου και του τροποποιημένου υποστρώματος. [40] [41] [42]

Τα αμινοσιλάνια χρησιμοποιούνται ευρέως ως μέσα σύζευξης σε πυριτικά υποστρώματα λόγω της χημικής δομής τους με περισσότερα του ενός ενεργά σημεία. Ανεξάρτητα από το είδος της εφαρμογής (βιομηχανική, βιολογική, περιβαλλοντική), τα σιλάνια ανθίστανται στην υδρόλυση παρέχοντας χημική σταθερότητα στα συστήματα όπου συμμετέχουν. [37]

Τα τριαλκοξυ- σιλάνια προτιμώνται έναντι των μονοαλκοξυ- ή διαλκοξυ- σιλανίων λόγω της δυνατότητάς τους να διαμορφώνουν περισσότερους δεσμούς σιλοξάνης με το πυριτικό υπόστρωμα και τα γειτονικά σιλάνια. Επίσης, έχει σημασία το είδος της αλκοξυ- ομάδας του σιλανίου (μεθοξυ- ή αιθοξυ-) λόγω διαφορετικής συμπεριφοράς σε υδατικό περιβάλλον κατά τη σιλανιοποίηση. Παρουσία νερού παρατηρείται ταχύτερη υδρόλυση των μεθοξυ- ομάδων, η οποία οδηγεί σε περισσότερους δεσμούς σιλοξάνης.

Για τη σιλανιοποίηση μέσω διαλύματος, η γενική ιδέα για να προκύψουν ομοιόμορφες επιφάνειες είναι η χρήση άνυδρου διαλύτη, όπως το τολουόλιο, με μικρή προσθήκη νερού ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός των σιλανίων, η χαμηλή συγκέντρωση σιλανίων ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός ολιγομερών, η ήπια θερμοκρασία ώστε να μειώνεται η πιθανότητα σχηματισμού ασθενών δεσμών αλλά να είναι δυνατή η διάσπαση δεσμών υδρογόνου, η κατάλληλη έκπλυση με οργανικό διαλύτη ή νερό ώστε να απομακρύνονται τα μη προσδεμένα μόρια, και τέλος η διαδικασία curing σε υψηλότερη θερμοκρασία (π.χ. 110 °C) ώστε να συμπυκνωθούν οι σιλανόλες σε σιλοξάνες και να μετατραπούν τα αμμωνιακά ιόντα σε αμίνες αυξάνοντας τη δραστηριότητά τους. [37]

Μετά την επιτυχή πρόσδεση του σιλανίου, μπορεί να μεσολαβήσει, όπως προαναφέρθηκε, το στάδιο μίας ακόμα πρόσδεσης πριν από αυτή του βιομορίου. Η προσθήκη ενός ακόμα ενδιάμεσου μορίου λαμβάνει χώρα σε περιπτώσεις που η δραστικές ομάδες του σιλανίου και του απταμερούς δεν μπορούν να αντιδράσουν απευθείας μεταξύ τους. Τέτοιου είδους ενδιάμεσα μόρια καλούνται συνδέτες. Πρόκειται για συνθετικά μόρια, τα οποία παρασκευάζονται για να αξιοποιηθούν αποκλειστικά σε αντίστοιχες εφαρμογές. Παραδείγματα συνδετών είναι η γλουτεραλδεΐδη, το προϊόν σύζευξης EDC-NHS, το SPMB (succinimidyl 4-(maleimidophenyl)butyrate) και άλλα. Οι συνδέτες αυτοί διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το αν φέρουν ενός είδους ελεύθερη δραστική ομάδα (homobifunctional) ή περισσότερες της μίας δραστικές ομάδες (heterobifunctional). Τέλος, από τα παραπάνω παραδείγματα, γίνεται αντιληπτό ότι το μήκος των συνδετών ποικίλει σημαντικά. Κατά συνέπεια, ένας ακόμα λόγος για τη χρήση τους και, παράλληλα, μία παράμετρος κατά την επιλογή κατάλληλου συνδέτη,

είναι κατά πόσο είναι επιθυμητό να είναι το σημείο πρόσδεσης του βιομορίου περισσότερο ή λιγότερο απομακρυσμένο από την επιφάνεια. Αυτό καθορίζεται από την πυκνότητα στην επιφάνεια και τη δομή των μορίων στο χώρο (γραμμικές αλυσίδες, ογκώδεις και άκαμπτοι δακτύλιοι κ.λπ.), τα οποία «συμπυκνώνονται» στην έννοια της στερεοχημικής παρεμπόδισης. [43]

Όσον αφορά στα (συνθετικά) βιομόρια, αυτά θα πρέπει να φέρουν μία κατάλληλη δραστική ομάδα (modifier) στο άκρο τους. Παραδείγματα δραστικών ομάδων είναι οι αμινομάδες και οι ομάδες θειόλης. Αυτές μπορούν να προστεθούν κατά τη σύνθεση είτε στο 3' είτε στο 5' άκρο ενός νουκλεοτιδίου, καθορίζοντας τον τρόπο πρόσδεσης στο υπόστρωμα. Σημειώνεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατή η προσθήκη δραστικής ομάδας ακόμα και ενδιάμεσα στην αλληλουχία του νουκλεοτιδίου. [43]

Τεχνικές ενόργανης χημικής ανάλυσης

Μικροσκοπίας ατομικής δύναμης – Αρχή λειτουργίας μεθόδου

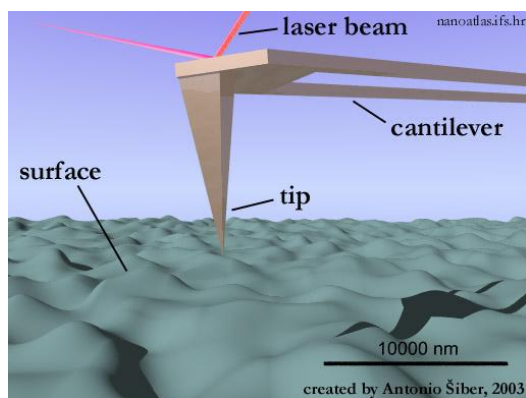
Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) είναι υποκατηγορία της μικροσκοπίας σάρωσης ακίδας (Scanning Probe Microscopy, SPM) και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση ιδιοτήτων, όπως το ύψος και η τραχύτητα στη νανοκλίμακα. Σε γενικές γραμμές, η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην ταλάντωση της ακίδας (probe), ανάλογα με την έλξη ή την άπωση που δέχεται από την επιφάνεια, καθώς η ακίδα σαρώνει την προς μελέτη επιφάνεια. [44]

Οι δυνάμεις που υφίστανται σε ατομικό επίπεδο μπορεί να είναι δυνάμεις van der Waals, που διακρίνονται σε ελκτικές και απωστικές, ή άλλου είδους, όπως ηλεκτροστατικές, μαγνητικές και λοιπά. Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης έχει τη δυνατότητα να μετρά τη δύναμη, ελκτική ή απωστική, που ασκείται μεταξύ της ακίδας και του δείγματος. Η μέτρηση και καταγραφή αυτής της δύναμης, καθώς η ακίδα σκανάρει την επιφάνεια σε δεδομένο εμβαδό, δημιουργεί μια τριδιάστατη απεικόνιση του δείγματος, η οποία με κατάλληλη επεξεργασία παρέχει σημαντικές πληροφορίες για αυτό. [44] Η δύναμη που ασκείται μεταξύ ακίδας και επιφάνειας είναι της τάξης των 10^{-11} έως 10^{-6} N. [45]

Η ακίδα είναι πυριτική και διαθέτει αιχμηρό πυραμιδοειδές άκρο με ύψος 3-6 μm . Η ακτίνα της ακίδας είναι της τάξης των 20 nm. Οι διαστάσεις αυτές επιτρέπουν ευαισθησία της ακίδας μέχρι και δέκατα του νανομέτρου (Ångström), κατά συνέπεια η μέθοδος διαθέτει διακριτική ικανότητα ατομικής κλίμακας. Η ακίδα σαρώνει την επιφάνεια με τη δυνατότητα χρήσης τριών τεχνικών: της τεχνικής συνεχούς επαφής με το δείγμα (contact mode), της τεχνικής μη επαφής, συνεπώς και μη αλλοίωσης της επιφάνειας (non-contact mode) και της τεχνικής ελαφρών χτυπημάτων ή περιοδικής

επαφής (tapping mode), η οποία στην πραγματικότητα δεν έρχεται σε επαφή με το δείγμα ώστε να του προκαλέσει αλλοίωση. Στην τεχνική συνεχούς επαφής, η ακίδα ακολουθεί τη μορφολογία της επιφάνειας, ενώ στην τεχνική περιοδικής επαφής η ακίδα διατηρεί σταθερό πλάτος ταλάντωσης. Οι τεχνικές αυτές, με κατάλληλες ρυθμίσεις, παρέχουν όχι μόνο πληροφορίες για την τοπογραφία της επιφάνειας, αλλά και για τις μηχανικές, ηλεκτρικές και μαγνητικές ιδιότητες του υλικού. Επιπλέον, ένα πρόσθετο πλεονέκτημα είναι το γεγονός ότι η ακίδα αλληλεπιδρά διαφορετικά με ένα μαλακό ή σκληρό υπόστρωμα, παρέχοντας έτσι σχετικές πληροφορίες. [46]

Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [47], οι κινήσεις της ακίδας λόγω της αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια ανιχνεύονται με μεγάλη ευαισθησία μέσω μίας δέσμης laser που προσπίπτει στον εύκαμπτο βραχίονα της ακίδας (πρόβολος, cantilever), ακολουθεί την ταλάντωση ή την κίνηση του προβόλου και ανακλάται σε μία φωτοδίοδο. Ο φωτοανιχνευτής ερμηνεύει το σήμα που δέχεται και διαμορφώνει κατάλληλα την εικόνα της επιφάνειας. [48] [49] Πιο αναλυτικά, καθώς η ακίδα έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια που σαρώνει, ο μοχλοβραχίονας αυτός αποκλίνει. Το μέγεθος της απόκλισης καταγράφεται από τη δέσμη laser, η οποία ανακλάται σε αμβλεία γωνία από το άκρο του μοχλοβραχίονα που ταλαντώνεται. Το γράφημα της απόκλισης της δέσμης σε σχέση με τη θέση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια του δείγματος δίνει την ανάλυση της επιφάνειας σε όρη και κοιλάδες που περιέχει αυτή, δηλαδή τη μορφολογία της επιφάνειας. [45]



Εικόνα 5. Απλουστευμένο σχέδιο διάταξης μεθόδου AFM

Ο ανιχνευτής είναι ένας πιεζοηλεκτρικός κρύσταλλος που έχει τη δυνατότητα να παράγει τάση όταν μεταβάλλεται μηχανικά το μήκος του. Με τον τρόπο αυτό, ερμηνεύει το σήμα του laser μέσα από τις συστολές και διαστολές που υφίσταται και δημιουργεί εξαιρετικά ακριβείς απεικονίσεις τριών διαστάσεων της μορφολογίας της

επιφάνειας υπολογίζοντας τη δύναμη που ασκείται στην ακίδα και μετρώντας τη μεταβολή στις συντεταγμένες. [50]

Πλεονεκτήματα της μεθόδου AFM είναι η δυνατότητα μελέτης της επιφάνειας σε τρεις διαστάσεις και σε ατομική κλίμακα, η μελέτη αγώγιμων ή μη αγώγιμων υλικών, η μελέτη βιολογικών δειγμάτων, η μελέτη δειγμάτων ακόμα και σε υδάτινο περιβάλλον και η μη απαίτηση για προκατεργασία ή προετοιμασία του δείγματος. Ωστόσο, στα μειονεκτήματα αναφέρονται η ευαισθησία της μεθόδου σε εξωτερικές επιδράσεις, όπως δονήσεις, και το γεγονός ότι η ταχύτητα σάρωσης της επιφάνειας είναι μικρή. [51]

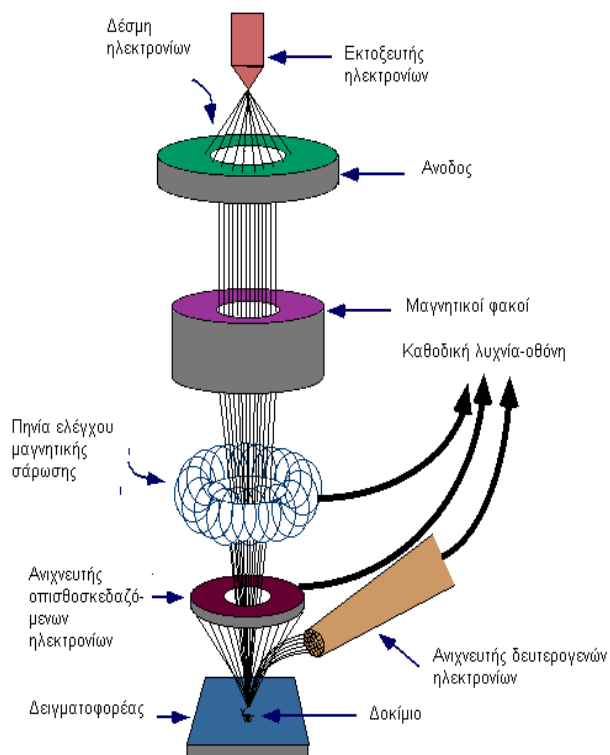
Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης με φασματοσκοπία ενεργειακής διασποράς ακτινών X – Αρχή λειτουργίας μεθόδου

Η λειτουργία του SEM στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις του προς εξέταση δείγματος και της προσπίπτουσας σε αυτό δέσμης ηλεκτρονίων. Οι βασικές διατάξεις που υπάρχουν στο μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και το σύστημα κενού.

Τα βασικά στάδια λειτουργίας ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [52], είναι τα ακόλουθα. Αρχικά, σχηματίζεται μια δέσμη ηλεκτρονίων από την πηγή, η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού. Με χρήση κάποιων μεταλλικών ανοιγμάτων, ηλεκτρομαγνητικών φακών και πηνίων σάρωσης, επιτυγχάνεται μια λεπτή εστιασμένη μονοχρωματική δέσμη, η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος. [53]

Η προσπίπτουσα δέσμη προκαλεί την εκπομπή δευτερογενών και οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων. Τα σήματα των ηλεκτρονίων ενισχύονται και στη συνέχεια διαμορφώνουν την ένταση μιας εξωτερικής (ανεξάρτητης) καθοδικής δέσμης η οποία προσπίπτει σε φθορίζουσα οθόνη ακολουθώντας την ίδια σάρωση, η οποία οδηγεί τη δέσμη του μικροσκοπίου. Το αποτέλεσμα είναι η μεγεθυσμένη απεικόνιση, στη φθορίζουσα οθόνη, της επιφάνειας του δείγματος που σαρώνει η δέσμη του μικροσκοπίου. Ανάλογα με την επιλογή του σήματος που θα χρησιμοποιηθεί για την αναπαραγωγή της εικόνας, αναδεικνύονται διαφορετικά χαρακτηριστικά του δείγματος, δεδομένου ότι τόσο η παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων όσο και ο συντελεστής οπισθοσκέδασης εξαρτώνται από τις τοπικές τιμές της γωνίας πρόσπτωσης (τοπογραφικά χαρακτηριστικά), το μέσο ατομικό αριθμό (πληροφορίες για τη σύνθεση) και τον κρυσταλλικό προσανατολισμό (κρυσταλλογραφικά χαρακτηριστικά). [49] Εκπέμπονται, επίσης, ηλεκτρόνια που έχουν υποστεί ελαστική

σκέδαση ή χαμηλή απώλεια ενέργειας, καθώς και ακτίνες X, χαρακτηριστικές της επιφάνειας από την οποία προήλθαν. [54]



Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση των διαφόρων τμημάτων ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης

Το ποσοστό των ηλεκτρονίων που οπισθοσκεδαζονται εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του χημικού στοιχείου του δείγματος. Οι βαρύτερες φάσεις φαίνονται λαμπρότερες από τις ελαφρύτερες. Έτσι παρέχονται πληροφορίες για τη σύσταση του δείγματος. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι χαμηλής ενέργειας και εκπέμπονται κοντά στην επιφάνεια του δείγματος αφού αυτά που εκπέμπονται από μεγαλύτερο βάθος, απορροφώνται εύκολα από τη μάζα του δείγματος. Για το λόγο αυτό, τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, σε αντίθεση με τα οπισθοσκεδαζόμενα, είναι χρήσιμα για την απεικόνιση της επιφάνειας του δείγματος. [55] [56]

Οι χαρακτηριστικές ακτίνες X, στις οποίες στηρίζεται η αρχή λειτουργίας της ανάλυσης EDX, δημιουργούνται σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό. Όταν σκεδάζεται ένα ηλεκτρόνιο από εσωτερική στοιβάδα, τότε ένα ηλεκτρόνιο από υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα καλύπτει το κενό μεταπίπτοντας στη χαμηλότερη στοιβάδα και εκπέμποντας την διαφορά ενέργειας ως ακτίνες X. Η ενέργεια αυτών των ακτίνων είναι χαρακτηριστική της μετάπτωσης και κατά συνέπεια του ατόμου. Με τον τρόπο αυτό,

δίνονται πληροφορίες για τη χημική σύσταση του υλικού, δηλαδή τα χημικά στοιχεία από τα οποία αποτελείται. Σημειώνεται, ακόμα, ότι η ανάλυση αυτή είναι ημιποσοτική, δηλαδή δίνονται πληροφορίες για την αφθονία κάθε χημικού στοιχείου στο δείγμα. [55] [56]

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα πολλών εργαστηρίων που ασχολούνται με τη μορφολογία και τη σύσταση της μικροδομής. Χρησιμοποιείται από ερευνητικούς φορείς για την εξέταση βιολογικών δειγμάτων (μικροοργανισμοί, κύτταρα), ιατρικών δειγμάτων και κρυσταλλικών δομών. Επίσης, η τεχνική SEM χρησιμοποιείται για τοπογραφικές μελέτες επιφανειών στο σύνολο σχεδόν των στερεών (μέταλλα, ημιαγωγοί, μονωτές, πολυμερή κ.α.). Ο συνδυασμός του SEM με άλλες τεχνικές μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική ανάλυση σε ελατές και εύθραυστες φάσεις, για το βάθος των ρηγμάτων, το μέγεθος της ζώνης στη σχισμή και τον τρόπο δημιουργίας ρωγμών με σκοπό να καθορισθεί ένα ποσοτικό μοντέλο σκληρότητας της δομής. [53]

Μικροσκοπία φθορισμού – Αρχή λειτουργίας μεθόδου

Μία μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πιστοποίηση ύπαρξης ή μη μίας ουσίας είναι η μικροσκοπία φθορισμού (fluorescence microscopy). Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως όταν αυτά διεγείρονται από δεδομένου μήκους κύματος ακτινοβολία. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου είναι η παρουσία φθορίζουσας ουσίας είτε ως στόχος της ανίχνευσης (άμεση μέθοδος), είτε ως προσδεμένο μόριο (χρωστική, dye) στην ουσία ενδιαφέροντος (έμμεση μέθοδος). Στη δεύτερη περίπτωση, το αποτέλεσμα της ανάλυσης επηρεάζεται από ολόκληρη την αλληλουχία των προσδέσεων. Επομένως, ένα κακό ή μέτριο αποτέλεσμα δεν υποδεικνύει ποια πρόσδεση είναι ασθενής (ενδιάμεσου μορίου – ουσίας ενδιαφέροντος στο υπόστρωμα ή φθορίζοντος μορίου στην ουσία ενδιαφέροντος). Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη τακτική ακολουθείται ευρέως στη βιολογία και στην ιατρική. [57]

Η μικροσκοπία φθορισμού είναι μέθοδος οπτικής μικροσκοπίας κατά την οποία το φως διέρχεται μέσα από μία φθορίζουσα ουσία, απορροφάται σε δεδομένο μήκος κύματος προκαλώντας διέγερση και επανεκπέμπεται (παραγωγή ακτινοβολίας μεγαλύτερου μήκους κύματος, δηλαδή χαμηλότερης ενέργειας). Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως με την παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης και φάσμα εκπομπής της ακτινοβολίας, τα οποία εξαρτώνται από τη δομή στο χώρο και την ηλεκτρονική κατανομή. Για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, χρησιμοποιούνται κατάλληλα φίλτρα, ανάλογα με το φάσμα εκπομπής της εκάστοτε ουσίας. [58] [59]

Η αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου φθορισμού είναι η ίδια με αυτή του κοινού οπτικού μικροσκοπίου, με τη διαφορά ότι το δείγμα μπορεί να φωτίζεται εκτός από το κλασικό τρόπο και με υπεριώδη ακτινοβολία. Οι φακοί των μικροσκοπίων αυτών είναι ειδικής κατασκευής, από γυαλί που δεν εμφανίζει αυτοφθορισμό. Το φως παράγεται από λυχνία και συγκεντρώνεται από ένα συμπυκνωτή φακό επάνω στο δείγμα. Καθώς το φως περνά μέσα από το αντικείμενο δημιουργεί μια εικόνα με την αρχή της διάθλασης. Την εικόνα αυτή λαμβάνει ένας πρώτος φακός που είναι και μεγεθυντικός (ονομάζεται αντικειμενικός), ενώ στη συνέχεια την εικόνα του αντικειμενικού φακού παραλαμβάνει ο προσοφθάλμιος φακός (είναι ο φακός στον οποίο κοιτάζει το μάτι του ερευνητή). Η μεγέθυνση που προκύπτει είναι το γινόμενο της διαθλαστικής ισχύος του αντικειμενικού επί του προσοφθάλμιου φακού. Η εικόνα που παρέχεται από τα οπτικά μικροσκόπια είναι έγχρωμη, καθώς δημιουργείται με διάθλαση και απορρόφηση του φωτός. [57]

Η χρήση χρωστικών είναι διαδεδομένη, αφενός διότι οι περισσότερες ουσίες δεν εμφανίζουν «αυτοφθορισμό» (ή «πρωτογενή φθορισμό»), αφετέρου επειδή δίνουν τη δυνατότητα στόχευσης ορισμένων περιοχών, ουσιών ή οργανιδίων μέσω πρόσδεσης σε αυτά («δευτερογενής φθορισμός»). Οι χρωστικές είναι φθορίζοντα μόρια, δηλαδή ουσίες που φέρουν φθορίζουσες ομάδες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φθορίζουσών ουσιών είναι οι χρωστικές FITC, Texas Red και DAPI.

Ορισμένες χρωστικές είναι ευαίσθητες στις μεταβολές του pH και μεταβάλλουν αντίστοιχα τη συμπεριφορά τους. Η ένταση φθορισμού των χρωστικών εκφράζεται μέσω ενός συντελεστή (συντελεστής μοριακής απορρόφησης, attenuation coefficient, παλαιότερα extinction coefficient). [60] Ο συντελεστής αυτός χρησιμοποιείται στη χημεία, βιοχημεία, μικροβιολογία και μοριακή βιολογία και εκφράζει πόσο ισχυρά μία ουσία μπορεί να απορροφήσει ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Όσο μεγαλύτερη η τιμή αυτού του συντελεστή, τόσο εντονότερος είναι ο φθορισμός της ουσίας. Ακόμα, βασική παράμετρος για την επιλογή της κατάλληλης χρωστικής είναι οι αλληλεπικαλύψεις φασμάτων που ενδέχεται να υπάρχουν μεταξύ διαφορετικών φθορίζουσών ουσιών. [60]

Σημαντικός περιορισμός της μεθόδου είναι η μη σταθερότητα πολλών χρωστικών. Η ένταση φθορισμού των χρωστικών τείνει να μειώνεται, και μάλιστα ταχύτατα, όσο αυξάνεται η επαφή με το φως είτε λόγω έκθεσης στο περιβάλλον είτε κατά τη διάρκεια της παρατήρησης στο μικροσκόπιο. Η ευαισθησία αυτή οδηγεί σε φωτοαποχρωματισμό (photobleaching), δηλαδή σε μη αντιστρεπτή φωτοχημική διάσπαση των χρωμοφόρων ομάδων του μορίου. Επιπλέον, διάφορες ουσίες εμφανίζουν χαμηλό αυτοφθορισμό που μειώνει την αντίθεση κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. [61]

Μετά την εφαρμογή της μεθόδου αυτής, ο φθορισμός ποσοτικοποιείται μέσω ειδικού λογισμικού ανάλυσης εικόνων (π.χ. Image J, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην

παρούσα εργασία), ώστε να είναι δυνατές οι συγκρίσεις μεταξύ των εικόνων. Κατά την επεξεργασία αυτή, είναι δυνατό να εξαλειφθεί ο αυτοφθορισμός των υπολοίπων ουσιών.

Η τεχνική πλεονεκτεί ως προς την ευαισθησία, καθώς δεν υπάρχει απαίτηση για υψηλές συγκεντρώσεις χρωστικής, και την εξειδίκευση, δεδομένου ότι η πρόσδεση της χρωστικής μπορεί να γίνει ακριβώς και αποκλειστικά στην περιοχή ή μόριο ενδιαφέροντος. Επιπλέον, αποτελεί μία μέθοδο ταχεία και απλή στην εφαρμογή της, μιας και δεν απαιτεί ιδιαίτερη προετοιμασία των δειγμάτων, με υψηλή αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). [58] [61]

Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι, παρόλο που η μέθοδος αυτή είναι αναπαραγωγίσιμη, δηλαδή δεν επηρεάζεται από τον ερευνητή, δεν ισχύει το ίδιο για την επεξεργασία των εικόνων που λαμβάνονται από το μικροσκόπιο. Υπάρχουν, όπως προαναφέρθηκε, διάφορα προγράμματα λογισμικού για την επεξεργασία των δεδομένων, τα οποία ποσοτικοποιούν την ένταση του φθορισμού. Η επιλογή, όμως, της επιμέρους επιφάνειας προς ποσοτικοποίηση γίνεται από τον ίδιο τον ερευνητή με αποτέλεσμα να επιδέχεται μεταβολές λόγω υποκειμενικής σκοπιάς.

Δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης

Τα δενδριμερή αποτελούν σφαιρικά μόρια με υψηλή πυκνότητα δραστικών ομάδων. Στην ουσία είναι πολυμερικά μόρια με πλήθος διακλαδώσεων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης (PAMAM dendrimers). Τα μόρια αυτά αποτελούνται από έναν πυρήνα αιθυλενοδιαμίνης (ethylene diamine core). Κάθε φορά που μία διαμίνη αντιδρά με ακρυλικό μεθυλεστέρα μέσω σταδιακού πολυμερισμού, νέες αμινομάδες σχηματίζονται στο εξωτερικό του μορίου, διαθέσιμες προς εκ νέου αντίδραση. Μετά από κάθε στάδιο αντίδρασης (γενιά), οι δραστικές ομάδες του δενδριμερούς διπλασιάζονται. [62] [63]

Τα δενδριμερή λειτουργούν ως συνδέτες (linkers) μεταξύ της στερεής επιφάνειας και του ολιγονουκλεοτιδίου (απταμερές). Ακόμα, τα δενδριμερή αξιοποιούνται σε περιπτώσεις μεταφοράς ουσιών, καθώς μικρά μόρια μπορούν να εγκλωβιστούν στις εσωτερικές τους κοιλότητες. [62]

Τα δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης με πυρήνα αιθυλενοδιαμίνης έχουν 4, 8, 16 και 32 διαθέσιμες δραστικές θέσεις για τις γενιές G0, G1, G2 και G3 αντίστοιχα. [63] Σημειώνεται ότι αύξηση της γενιάς, επομένως αύξηση των δραστικών αμινομάδων, καταλήγει σε αύξηση της στερεοχημικής παρεμπόδισης λόγω εγγύτητας των δραστικών σημείων, και, κατά συνέπεια, μείωση της δραστικότητας. [62] Ταυτόχρονα, αύξηση της γενιάς συνεπάγεται αύξηση της ακτίνας του μορίου. Δεδομένου ότι

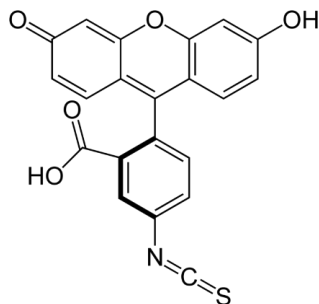
πρόκειται για μόρια με πλήθος αμινομάδων, συμπεραίνεται ότι αύξηση της γενιάς συνεπάγεται και αύξηση της υδροφιλικότητας.

Συχνά, για την αξιοποίηση όλων αυτών των δραστικών θέσεων, απαιτείται κάποιο στάδιο τροποποίησης (modification) ή ενεργοποίησης (activation) των δενδριμερών, ώστε να ακολουθήσει κατόπιν το στάδιο της επιθυμητής σύζευξης με κάποιο βιομόριο ή χημικό μόριο. Ωστόσο, υπερβολικά πολλές τροποποιήσεις ή χρήση ογκωδών υποκαταστατών είναι πιθανό να οδηγήσει σε αυξημένη στερεοχημική παρεμπόδιση και μείωση της δραστηριότητας του δενδριμερούς. Επομένως, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση των υποκαταστατών ή η αναλογία δενδριμερούς – υποκατάσταση, ώστε οι συνθήκες να είναι οι βέλτιστες για κάθε εφαρμογή. Το ίδιο ισχύει στην περίπτωση που γίνεται σήμανση (labeling) του δενδριμερούς με φθορίζοντα μόρια. Εάν τα φθορίζοντα μόρια είναι υπερβολικά πολλά ή ογκώδη, τότε το σήμα του φθορισμού δεν αυξάνεται, αλλά, επέρχεται κορεσμός και μάλιστα το σήμα μειώνεται αν ο φθορισμός παρεμποδίζεται από το πλήθος των μορίων (quenching). [62]

Φθορίζουσες ουσίες

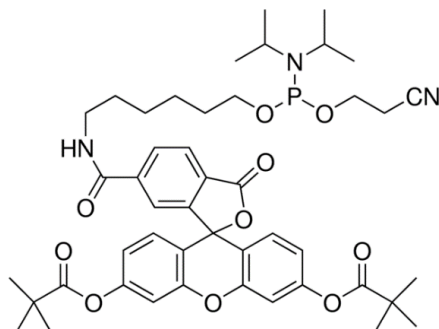
Μία κοινή φθορίζουσα ουσία αποτελεί το FITC (Fluorescence isothiocyanate). Η χρωστική αυτή απορροφά και εκπέμπει (φθορίζει) στα 495 nm και 519 nm περίπου, αντίστοιχα. [64] [65] Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (extinction coefficient) της ουσίας αυτής είναι περίπου $84000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ στη μέγιστη απορρόφηση. [64] Ο συντελεστής αυτός εκφράζει πόσο ισχυρά απορροφά το φως μία ουσία σε δεδομένο μήκος κύματος ανά μονάδα μάζας ή μοριακής συγκέντρωσης. Σημειώνεται επιπλέον ότι το FITC αποτελεί φωτοευαίσθητη ουσία, επομένως πρέπει να παρασκευάζεται σε μικρό χρονικό διάστημα πριν τη χρήση (λόγω αποχρωματισμού με την πάροδο του χρόνου - photobleaching) και να αποφεύγεται η έκθεσή του στο φως. Ακόμα, σε όλα τα στάδια αποθήκευσης και χρήσης πρέπει να διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία (2-8 °C).

Το FAM (Fluorescein amidite) αποτελεί και αυτό τεχνητή φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ουσιών στη μοριακή βιολογία. Βρίσκει εφαρμογή στη σήμανση πρωτεϊνών και ολιγονουκλεοτιδίων για την ανίχνευση της παρουσίας άλλων νουκλεϊκών οξέων, στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) και λοιπά. Φθορίζει σε μήκος κύματος 520 nm και έχει



Εικόνα 7. Χημικός τύπος FITC (Fluorescein isothiocyanate)

τιμή συντελεστή μοριακής απορρόφησης (extinction coefficient) $75000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ στη μέγιστη απορρόφηση. [66] Όπως και το FITC, θα πρέπει να προστατεύεται από την έκθεση σε φως, καθώς έτσι εξασθενεί ο φθορισμός του. Το FAM έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως μόριο προσδεμένο στο απταμερές με σκοπό τον εντοπισμό της ωχρατοξίνης Α. [14] [67]



Εικόνα 8. Χημικός τύπος FAM (Fluorescein amidite)

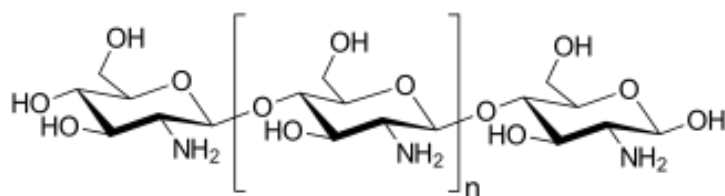
Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες που θα συζητηθούν στην παρούσα εργασία είναι η χιτοζάνη και το υαλουρονικό οξύ.

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από την τροποποίηση της χιτίνης. Η χιτίνη απαντάται στο σκληρό περίβλημα (εξωσκελετό) οστρακοειδών και ορισμένων εντόμων. Πρόκειται για μία από τις περισσότερο άφθονες βιοδιασπώμενες ουσίες στον κόσμο.

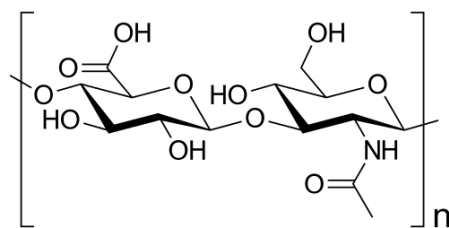
Η χιτοζάνη έχει αξιοποιηθεί σε διάφορες εμπορικές και βιοϊατρικές εφαρμογές. Έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύει την άμυνα των φυτών απέναντι σε μυκητιάσεις και άλλες

προσβολές από παράσιτα. [68] [69] Στην ιατρική, έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να μειώσει την αιμορραγία, ενώ παρουσιάζει και αντιμικροβιακή δράση, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται σε επιδέσμους και αιμοστατικές γάζες. [70] [71] Μία ακόμα εφαρμογή της χιτοζάνης αφορά στο φιλτράρισμα του νερού και άλλων υγρών (όπως, για παράδειγμα, το γάλα), καθώς έχει τη δυνατότητα να καταβυθίζεται παρασύροντας μαζί της φώσφορο, ορισμένα βαρέα άλατα, έλαια κι διάφορες άλλες ανεπιθύμητες ουσίες. [72] [73] Η χιτοζάνη χρησιμοποιείται ακόμα για την κατασκευή βιοδιασπώμενων πολυμερικών συσκευασιών και ειδών μίας χρήσης, όπως ποτήρια μίας χρήσης και θήκες αυγών. [74] Ενδιαφέρουσα είναι και η χρήση της από τη NASA για πειραματικές δοκιμές προστασίας και διατήρησης σπόρων και φυτών στο διάστημα, οι οποίες στέφθηκαν με επιτυχία. [75]



Εικόνα 9. Χημικός τύπος χιτοζάνης

Το υαλουρονικό οξύ αποτελεί και αυτό γραμμικό πολυσακχαρίτη, ο οποίος προέρχεται από δύο διαφορετικούς μονοσακχαρίτες, το γλουκουρονικό οξύ και τη Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη. [76] Το υαλουρονικό οξύ είναι το βιοπολυμερές με τη μεγαλύτερη δυνατότητα συγκράτησης νερού, γεγονός που δικαιολογεί την πιο κοινή εφαρμογή του στην κοσμετολογία για τη διατήρηση της ενυδάτωσης και ελαστικότητας του δέρματος και των ιστών. Χαρακτηριστικό του επίσης είναι ότι δεν είναι τοξική ή ερεθιστική ουσία, ενώ δεν προκαλεί ανοσολογική αντίδραση στον οργανισμό, με αποτέλεσμα να θεωρείται κατάλληλο για χρήση στον άνθρωπο. [76] Το υαλουρονικό οξύ είναι επίσης απαραίτητο για τη μείωση των τριβών στις κλειδώσεις του σώματος και στους ιστούς που συγκρατούν τους μύες επάνω στα οστά. [77] Έχει αναφερθεί ακόμα χρήση του για τη θεραπεία της ατοπικής δερματίτιδας. [78] Συνολικά, η παρουσία του και οι εφαρμογές του περιορίζονται σχεδόν αποκλειστικά στις ανάγκες του οργανισμού, ανθρώπινου ή και ζωικού. [79]



Εικόνα 10. Χημικός τύπος υαλουρονικού οξέος

II. Πειραματικό μέρος

Ενότητα 1

Χημική τροποποίηση επιφανειών νιτριδίου του πυριτίου

Εισαγωγή

Στη βιβλιογραφία συναντά κανείς πληθώρα αναφορών και διαφορετικών μεθόδων για επιφανειακή τροποποίηση (surface functionalization) και χημική κατεργασία (chemical treatment) πυριτικών επιφανειών. Παρόλο που μετά την τροποποίηση τα μόρια που θα ακινητοποιηθούν μπορεί να διαφέρουν, η κεντρική ιδέα της κατεργασίας είναι κοινή. Στόχος είναι η «ενεργοποίηση» της, κατά τα άλλα, αδρανούς πυριτικής επιφάνειας μέσω της δημιουργίας δραστικών θέσεων, ικανών προς αντίδραση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω χημικών αντιδράσεων, συνηθέστερα με οξύ, άλλοτε σε ηπιότερες και άλλοτε σε πιο έντονες συνθήκες. Σημειώνεται ότι δεν υπάρχει μοναδική και καθολικά χρησιμοποιούμενη τεχνική αλλά κάθε μελέτη καθορίζει διαφορετικές συνθήκες.

Η κατεργασία της επιφάνειας με χημικά μέσα είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Ιδιαίτερα η χρήση οξέων είναι ευρέως διαδομένη χωρίς όμως να αποκλείεται η κατεργασία με κάποια βάση. Μία συνήθης πρακτική που προτείνεται από διάφορους ερευνητές [80] [81] [82] είναι η χρήση αραιού νιτρικού οξέος (10%) εν θερμώ (80 °C). Οι χρόνοι ποικίλλουν από 20 λεπτά έως 1 ώρα.

Ένα άλλο οξύ που χρησιμοποιείται συχνά ακολουθώντας σημαντικά διαφορετικά πρωτόκολλα με μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και χρόνων είναι το υδροφθορικό οξύ. Οι επιστήμονες αναφέρουν τόσο ακραίες, όσο και πιο μέτριες συνθήκες. Για παράδειγμα, αναφέρεται χημική κατεργασία με πυκνό υδροφθορικό οξύ (49%) για 1 λεπτό [83] αλλά και κατεργασία με πιο αραιό διάλυμα υδροφθορικού οξέος 10% για μεγαλύτερο χρόνο (10 λεπτά). [84] Ωστόσο, είναι αρκετές οι αναφορές για προτίμηση σε αραιά διαλύματα, δεδομένου ότι το υδροφθορικό οξύ είναι αρκετά ισχυρό και διαβρωτικό. [85] [86] Παρόλο όμως που η κατεργασία γίνεται με συγκεντρώσεις 1 ή 2%, οι χρόνοι που αναφέρονται είναι αντίστοιχα μικροί (2 ή 3 λεπτά). Η γενική τάση είναι να χρησιμοποιείται το υδροφθορικό οξύ για μικρούς χρόνους (λίγα λεπτά). [87]

Μία εναλλακτική μέθοδος χημικής κατεργασίας, η οποία επιβάλλει αρκετά έντονες συνθήκες, είναι η χρήση διαλύματος piranha. Πρόκειται για ένα διάλυμα πυκνού θειικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου (30%) σε συνηθέστερη αναλογία 3 προς 1. Η ένωση αυτών των δύο διαλυμάτων προκαλεί έντονη εξώθερμη αντίδραση και αυξάνει τη θερμοκρασία στο διάλυμα. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για απομάκρυνση οργανικών υπολειμμάτων και καθαρισμό των επιφανειών, αλλά και για υδροξυλίωση αυτών. Ως προς τη χρήση του piranha για επιφανειακή κατεργασία με σκοπό τη χημική τροποποίηση, υπάρχουν αναφορές για αναλογία $H_2SO_4:H_2O_2$ 2:1 [88] , 3:1 [89] [90] ή ακόμα και 5:1 [91] και για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 10 λεπτών.

Εκτός από τα οξέα, είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί χημική κατεργασία με βάση με παρόμοια αποτελέσματα. Συνήθης είναι η χρήση υδροξειδίου του νατρίου, ενδεικτικά συγκέντρωσης 1M. Η διαδικασία της επιφανειακής τροποποίησης διαρκεί περισσότερο χρόνο σε αυτή την περίπτωση (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου). [92]

Αναφέρονται στη βιβλιογραφία και άλλες μέθοδοι χημικής κατεργασίας με χρήση, παραδείγματος χάρη, φθοριούχου αμμωνίου [86] ή πυκνό θειικό οξύ [93]. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί και άλλα διαλύματα που αποτελούν συνδυασμό των προηγούμενων. Ερευνητές [84] αναφέρουν κατεργασία της επιφάνειας με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου εν θερμώ (H_2O_2 (30%):HCl (37%): H_2O σε αναλογία 2:1:8) και κατόπιν επιπλέον κατεργασία με υδροφθορικό οξύ.

Εκτός από τη χημική κατεργασία, είναι δυνατό να γίνει επιφανειακή τροποποίηση με διαφορετικές μεθόδους. Παραδείγματος χάρη, η τροποποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω έκθεσης της επιφάνειας σε πλάσμα σε εξαιρετικά χαμηλή πίεση (20-30 Pa). [94] [95] Η μέθοδος αυτή έχει υψηλό κόστος και εφαρμόζεται σε ειδικές περιπτώσεις, όπως είναι η τροποποίηση πυριτικών ακίδων που χρησιμοποιούνται στη μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM). Μία άλλη μέθοδος που δεν περιλαμβάνει χημική κατεργασία είναι ο βομβαρδισμός της επιφάνειας με αδρανές αέριο, όπως το αργό. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή είναι πολύπλοκη καθώς απαιτεί και άλλα στάδια με ειδικές απαιτήσεις (λουτρό υπερήχων [81] [96], έκθεση σε υδρογόνο [96] ή όζον [88] υπό ακτινοβολία).

Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν τις παραπάνω μεθόδους, όχι μόνο για να καταστεί η χημικά αδρανής επιφάνεια ικανή προς αντίδραση, αλλά και για να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες που υπάρχουν επάνω σε αυτή, όπως οργανικά υπολείμματα και ίχνη βαρέων μετάλλων. [81] [97] Αναφορές υπάρχουν ακόμα για μεγαλύτερη ομοιογένεια της επιφάνειας μετά από ελεγχόμενη κατεργασία, λόγω της απομάκρυνσης των επιμολύνσεων. [83] [90] Επιπλέον, βασικός λόγος εφαρμογής κάποιων μεθόδων κατεργασίας είναι η απομάκρυνση του στρώματος διοξειδίου του πυριτίου (native silicon dioxide), που σχηματίζεται αυθόρμητα όταν μία πυριτική επιφάνεια εκτίθεται στο οξυγόνο της ατμόσφαιρας.

Όπως προαναφέρθηκε, στόχος της τροποποίησης μπορεί να είναι η χημική ενεργοποίηση της επιφάνειας που προκύπτει μέσω διάσπασης ορισμένων δεσμών του πλέγματος πυριτίου (για εξ' ολοκλήρου πυριτική επιφάνεια) ή πυριτίου – αζώτου (στην περίπτωση του νιτριδίου του πυριτίου) και η δημιουργία χημικά δραστικών ομάδων στα σημεία αυτά. Τα χημικά μέσα που προαναφέρθηκαν (οξέα, βάσεις) είναι υδατικά διαλύματα και προκαλούν διάσπαση του νερού στο οποίο είναι διαλυμένα. Στο διάλυμα υπάρχουν συνεπώς ελεύθερα υδροξύλια, τα οποία σχηματίζουν δεσμούς με το πυρίτιο στις θέσεις όπου έχει ήδη «ανοίξει» ένας δεσμός. [98] Τα υδροξύλια (-OH) μπορούν να αντιδράσουν στη συνέχεια με πρωτεΐνες (ένζυμα, αντισώματα) [81] [82], λιπίδια [95], σιλάνια (APTES, GOPTS, GOPES) [88] και λοιπά.

Τέλος, επισημαίνεται ότι ο όρος «επιφάνεια» περιλαμβάνει τόσο την επιφάνεια που εννοείται μακροσκοπικά, όσο και το εξωτερικό νανοδομών, όπως είναι τα νανოსωματίδια. Η διαδικασία που ακολουθείται μπορεί να είναι παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις. [85]

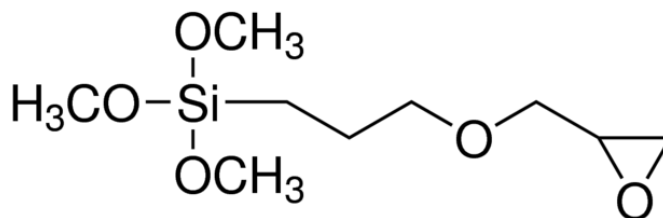
Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα

Για την κατασκευή και μελέτη ενός βιοαισθητήρα λαμβάνεται ως υπόστρωμα επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου (Si_3N_4) 1x1 cm. Συγκεκριμένα, το πολυστρωματικό υπόστρωμα αποτελείται από νιτρίδιο του πυριτίου πάχους περίπου 100nm επάνω σε ένα υπόστρωμα διοξειδίου του πυριτίου και όλο αυτό επάνω σε ένα παχύτερο υπόστρωμα στοιχειακού πυριτίου.

Η επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου είναι σχετικά χημικά αδρανής, επομένως απαιτείται ενεργοποίηση αυτής. Επιπλέον, κάθε πυριτική επιφάνεια ερχόμενη σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας οξειδώνεται και καλύπτεται από επιφανειακό στρώμα διοξειδίου του πυριτίου (native silicon oxide). Το επιφανειακό αυτό στρώμα σχηματίζει ομάδες υδροξυλίων όταν εκτίθεται σε υγρασία, όχι όμως επαρκώς πυκνές και ισχυρές ώστε να αξιοποιηθούν για χημικές αντιδράσεις στην επιφάνεια του Si_3N_4 . Για το λόγο αυτό, απαιτείται κάποιου είδους επιφανειακή τροποποίηση ώστε να αυξηθούν σε αριθμό και σε πυκνότητα τα δραστικά σημεία της επιφάνειας. [98]

Επιλέγεται η επιφανειακή τροποποίηση με τη χρήση χημικών μέσων. Μετά από βιβλιογραφική μελέτη, επιλέχθηκαν οι κατεργασίες και οι συνθήκες που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Σκοπός της χημικής κατεργασίας είναι η επιφανειακή τροποποίηση ώστε να καταστεί δυνατός ο σχηματισμός χημικού δεσμού μεταξύ του νιτριδίου του πυριτίου και της αλκόξυ ομάδας του GOPTS ((3-

glycidylxypropyl)trimethoxysilane, 3-γλυκιδοξυ-προπυλ-τριμεθοξυ-σιλανιο). Για τη δημιουργία του δεσμού απαιτείται η παρουσία ομάδων υδροξυλίου στην επιφάνεια του νιτριδίου του πυριτίου. [99]



Εικόνα 11. Χημικός τύπος του σιλανίου GOPTS

Χημική τροποποίηση

Οι χημικές κατεργασίες και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Για συγκριτικούς λόγους, κάθε πειραματική διαδικασία και αναλυτική μέθοδος έγινε και σε μη κατεργασμένη (μη τροποποιημένη) επιφάνεια (επιφάνεια αναφοράς).

Πίνακας 5. Χημικές κατεργασίες που πραγματοποιήθηκαν

Χημική κατεργασία	Χρόνος	Θερμοκρασία
Νιτρικό οξύ HNO ₃ 10%	20 min	80 °C
Υδροφθορικό οξύ HF 1%	3 min	θερμοκρασία δωματίου
Piranha π. H ₂ SO ₄ : H ₂ O ₂ (30%) 3:1	10 min	θερμοκρασία δωματίου
Υδροξείδιο του νατρίου NaOH 1M	1 h	θερμοκρασία δωματίου

Η κατεργασία γίνεται με βύθιση της επιφάνειας στο χημικό μέσο σε ποτήρι ζέσεως ή τρυβλίο, χωρίς ανάδευση. Όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν την ημέρα των τροποποιήσεων. Για την κατεργασία με νιτρικό οξύ, σημειώνεται ότι χρησιμοποιήθηκε φούρνος για τη διατήρηση της θερμοκρασίας στους 80 °C. Μετά από κάθε χημική κατεργασία, ακολούθησε έκπλυση της επιφάνειας με διπλά απιονισμένο νερό και στέγνωμα σε ροή αερίου αζώτου. Στο piranha έγινε έκπλυση σε υπερκάρθαρο νερό για 10 min.

Παράχθηκε επαρκής αριθμός επιφανειών από κάθε χημική τροποποίηση, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί διαφορετική επιφάνεια για κάθε αναλυτική τεχνική που ακολουθεί. Συνυπολογίστηκαν επιπλέον επιφάνειες από καθαρό νιτρίδιο του πυριτίου (control).

Σιλανιοποίηση

Σε ορισμένες από τις προαναφερθείσες επιφάνειες κάθε κατηγορίας έγινε σιλανιοποίηση. Η διαδικασία της σιλανιοποίησης περιλαμβάνει έκπλυση των επιφανειών με 95% αιθανόλη για 5 min υπό ανάδευση και επανάληψη της έκπλυσης. Κατόπιν, οι επιφάνειες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα με 98% αιθανόλη (95%) και 2% GOPTS και αφέθηκαν να αντιδράσουν overnight. Ακολούθησε έκπλυση με νερό, στέγνωμα σε ροή αζώτου και θέρμανση στους 135 °C για 1h. [98] [100]

Αναλυτικές τεχνικές

Το αποτέλεσμα της χημικής κατεργασίας εκτιμήθηκε από την επιτυχή πρόσδεση του σιλανίου (επιβεβαίωση μέσω αναλυτικών τεχνικών), ενώ τέθηκε η απαίτηση να μη μεταβάλλεται σημαντικά η τραχύτητα της επιφάνειας πριν και μετά την κατεργασία. Ο λόγος για αυτή την απαίτηση είναι η χρήση της επιφάνειας σε οπτικό αισθητήρα, εφαρμογή η οποία απαιτεί την ελάχιστη δυνατή τραχύτητα.

Οι αναλυτικές τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν περιλαμβάνουν τις ακόλουθες.

- Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy (AFM))
- Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy (SEM))
- Φασματοσκοπία ενεργειακής διασποράς ακτινών X (Energy Dispersive x-ray analysis (EDX Analysis))
- Μικροσκοπία φθορισμού
- Φασματοσκοπία υπερύθρου (Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR))
- Ανάλυση φθορισμού με ακτίνες x (X-ray Fluorescence (XRF))
- Φασματοσκοπία RAMAN

Τα αποτελέσματα των αναλυτικών μεθόδων παρουσιάζονται στη συνέχεια.

- Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)

Η μελέτη επιφανειών στην ατομική κλίμακα γίνεται με διάφορους τρόπους, ένας από τους οποίους (και ιδιαίτερα δημοφιλής) είναι με χρήση της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων. Η τεχνική AFM, όπως αποκαλείται, έχει τη δυνατότητα να παράγει τριδιάστατες εικόνες μεγάλης ακρίβειας και πολύ υψηλής ανάλυσης. [101]

Πειραματική διαδικασία

Η τραχύτητα εξετάστηκε με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM, Atomic Force Microscopy). Για τη μικροσκοπία ατομικής δύναμης (συσκευή Veeco di Innova) διεξήχθησαν μετρήσεις σε όλες τις μη σιλανιοποιημένες επιφάνειες (κατεργασμένες και μη) χρησιμοποιώντας ακίδα πυριτίου και τρόπο λειτουργίας «αγγίγματος» (tapping mode). Σημειώνεται ότι η κεντρική ιδέα για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν να εξεταστεί η τραχύτητα της ίδια επιφάνειας πριν και μετά την κατεργασία. Λήφθηκαν εικόνες από σάρωση της εκάστοτε επιφάνειας έκτασης μερικών τετραγωνικών μμ. Ορισμένες από τις εικόνες που λήφθηκαν παρατίθενται στο Παράρτημα 1.

Οι εικόνες που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν από το πρόγραμμα SPMLab Analysis του οργάνου. Μέσω αυτού, υπολογίστηκε η τραχύτητα της έκτασης κάθε επιμέρους επιφάνειας που μετρήθηκε. Οι τιμές αντιστοιχούν στην τραχύτητα όπως αυτή εκφράζεται ως μέση τετραγωνική ρίζα (root mean square, RMS) των τιμών τραχύτητας, σύμφωνα με τον τύπο

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (1)$$

Η επιλογή της έκφρασης της τραχύτητας ως RMS έγινε για λόγους συμβατότητας και άμεσης σύγκρισης με την πλειονότητα των βιβλιογραφικών αναφορών. Οι τιμές που αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα προκύπτουν ως μέσες τιμές των μετρήσεων σε κάθε επιφάνεια.

Πίνακας 6. Μέσες τιμές τραχύτητας κάθε επιφάνειας

Χημική κατεργασία	Τραχύτητα RMS ακατέργαστης επιφάνειας (nm)	Τραχύτητα RMS κατεργασμένης επιφάνειας (nm)	Ποσοστό μεταβολής τραχύτητας (%)
HF	0.18	0.44	144.4
HNO ₃	0.25	0.30	20.0
NaOH	0.38	0.55	44.7
Piranha	0.18	0.49	172.2

Ως συμπέρασμα από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η τραχύτητα δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή (ως απόλυτη τιμή) μετά την τροποποίηση της επιφάνειας με κάποια από τα παραπάνω χημικά μέσα, γεγονός θετικό για την εφαρμογή σε βιοιαισθητήρα. Ωστόσο, κάποια από τα είδη χημικής κατεργασίας που δοκιμάστηκαν αύξησαν σημαντικά το ποσοστό μεταβολής της τραχύτητας. Ακόμα, η αρχική, μη κατεργασμένη επιφάνεια εμφανίζει τραχύτητα τέτοια, η οποία μπορεί να τη χαρακτηρίσει «λεία».

- Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy (SEM)) με φασματοσκοπία ακτινών X ενεργειακής διασποράς (Energy Dispersive x-ray analysis (EDX Analysis))

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών. Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο αλληλεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση αυτή προκύπτουν πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία της επιφάνειας. Το SEM παράγει καλά εστιασμένες και λεπτομερείς εικόνες. Ένα σύγχρονο SEM έχει διακριτική ικανότητα που φτάνει τα 3 nm. Πρόσθετες πληροφορίες για τη χημική σύσταση της επιφάνειας μπορούν να αποκτηθούν εύκολα όταν η μέθοδος συνδυάζεται με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας ενεργειακής διασποράς ακτινών X (Energy Dispersive x-ray analysis (EDX Analysis)).

Πειραματική διαδικασία

Επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου εξετάστηκαν με μικροσκόπιο σάρωσης, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε στοιχειακή ανάλυση της επιφάνειας τόσο σημειακά όσο και σαρώνοντας συγκεκριμένο εμβασμό, με το περιθώριο σφάλματος που αυτό συνεπάγεται. Χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL JSM-6380 LV με στοιχειακό αναλυτή INCA x-sight της Oxford Instruments. Οι επιφάνειες που εξετάστηκαν ήταν επιφάνειες πριν και μετά κάθε χημική κατεργασία, σιλανιοποιημένες και μη. Ορισμένες από τις εικόνες που λήφθηκαν παρατίθενται στο Παράρτημα 2. Τα αποτελέσματα της στοιχειακής ανάλυσης απεικονίζονται παρακάτω. Υπογραμμίζεται ότι η στοιχειακή ανάλυση με αυτή τη μέθοδο είναι ημιποσοτική, δηλαδή τα ποσοστά τείνουν στο 100%, αλλοιώνοντας με αυτόν τον τρόπο ελαφρώς την πραγματική τιμή του κάθε στοιχείου. Επιπλέον, δεν παρέχεται καμία πληροφορία για τις χημικές ενώσεις στις οποίες συμμετέχει το κάθε χημικό στοιχείο.

Τα δεδομένα των πινάκων συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Όλες οι επιφάνειες περιέχουν μεγάλο ποσοστό πυριτίου και αζώτου, από τα οποία αποτελείται το επιφανειακό τους στρώμα. Φυσικά το πυρίτιο παρουσιάζεται άνισα περισσότερο από το άζωτο, αλλά αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ποσοστά δεν είναι σε επίπεδο μορίων αλλά κατά βάρος.

Οι κατεργασμένες επιφάνειες εμφανίζουν μικρά ποσοστά οξυγόνου, γεγονός το οποίο συμφωνεί με την παρουσία των υδροξυλίων στην επιφάνεια μετά την κατεργασία. Ωστόσο, το οξυγόνο είναι ιδιαίτερα ελαφρύ στοιχείο, με αποτέλεσμα οι τιμές του να έχουν κυρίως ποιοτική και όχι τόσο ποσοτική αξία.

Πίνακας 7. Στοιχειακή ανάλυση μη σιλανιοποιημένων επιφανειών (% βάρος)

	Si	N	C	O	
Si ₃ N ₄ untreated	87,68%	12,32%			100,00%
Si ₃ N ₄ NaOH-treated	80,93%	15,99%	7,29%	1,25%	99,99%
Si ₃ N ₄ HNO ₃ -treated	83,74%	9,62%	6,35%	0,44%	100,14%
Si ₃ N ₄ HF-treated	79,89%	10,56%	8,93%	0,74%	100,11%
Si ₃ N ₄ piranha-treated	84,21%	9,70%	6,74%	0,07%	100,70%

Πίνακας 8. Στοιχειακή ανάλυση σιλανιοποιημένων επιφανειών (% βάρος)

	Si	N	C	O	
Si3N4 untreated + GOPTS	92,19%	7,82%			100,00%
Si3N4 NaOH-treated + GOPTS	75,00%	17,57%	5,95%	1,94%	99,97%
Si3N4 HNO3-treated + GOPTS	79,89%	12,18%	7,18%	0,90%	100,15%
Si3N4 HF-treated + GOPTS	80,90%	9,03%	8,54%	1,54%	100,00%
Si3N4 piranha-treated + GOPTS	81,68%	8,90%	8,50%	1,00%	100,07%

Υπάρχει παρουσία άνθρακα τόσο στις σιλανιοποιημένες όσο και στις μη σιλανιοποιημένες επιφάνειες. Στις πρώτες θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία του σιλανίου, όμως η διαφορά από τις δεύτερες δεν είναι τόσο μεγάλη ώστε να δικαιολογεί κάτι τέτοιο. Η παρουσία του άνθρακα είναι πιθανό να οφείλεται στη μέθοδο στερέωσης των δειγμάτων στο δειγματοφορέα.

Τέλος, παρά το ποσοστό αβεβαιότητας, είναι θετικό το γεγονός ότι δεν καταγράφηκε άνθρακας και οξυγόνο σε μη κατεργασμένες επιφάνειες, με ή χωρίς σιλάνιο.

- Μικροσκοπία φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού αξιοποιήθηκε για την έμμεση επιβεβαίωση της πρόσδεσης του σιλανίου. Από τη βιβλιογραφία [100] εφαρμόστηκαν δεδομένες συνθήκες αντίδρασης της εποξειδικής ομάδας που φέρει το σιλάνιο GOPTS με την ομάδα θειόλης που διαθέτει ένα ορισμένο απταμερές. Το εν λόγω απταμερές φέρει φθορίζουσα ομάδα (TexasRed), μέσω της οποίας μπορεί να ανιχνευθεί με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Πειραματική διαδικασία

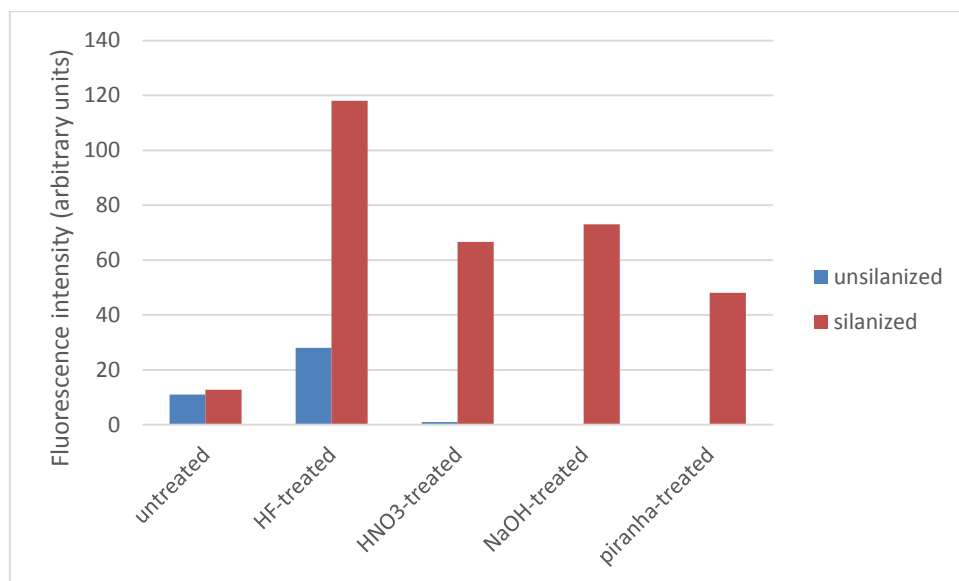
Σε επιφάνειες από κάθε χημική κατεργασία που προαναφέρθηκε, με και χωρίς σιλάνιο, προστέθηκε διάλυμα με δίκλωνο προϋβριδοποιημένο απταμερές με δραστική ομάδα θειόλης και φθορίζουσα ομάδα TexasRed σε συγκέντρωση 10 μM. Σημειώνεται ότι το

TexasRed φθορίζει σε μήκος κύματος 613 nm. [66] Η αντίδραση αφέθηκε να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό χώρο για τουλάχιστον 12 ώρες. Στη συνέχεια, όλες οι επιφάνειες εκπλύθηκαν ήπια με διάλυμα αλάτων (wash buffer, 10mM NaCl & 5mM Tris), στέγνωσαν σε ροή αζώτου και παρατηρήθηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου Leica DMRA2. Το φίλτρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το N3 που εκπέμπει στην ερυθρή περιοχή και ο χρόνος έκθεσης ήταν 3 sec. Το προϋβριδοποιημένο απταμερές έφερε την παρακάτω αλληλουχία:

Αλληλουχία απταμερούς: 5' – [ThiC6] GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA – 3'

Αλληλουχία συμπληρωματικού κλώνου: 5' – CCCACACCCTTT [TxRd] – 3'

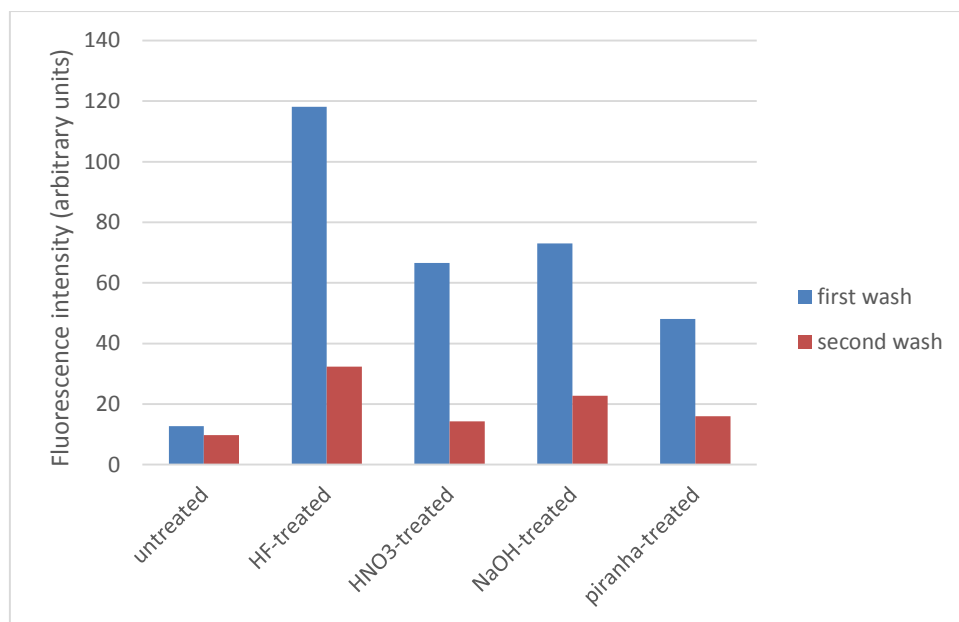
Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ότι το απταμερές δεν κατόρθωσε να προσδεθεί σε μη σιλανιοποιημένες επιφάνειες, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο. Ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει το σήμα φθορισμού, όπως αυτό ποσοτικοποιήθηκε σε αυθαίρετες μονάδες μέσω του λογισμικού imagej. Το σήμα στις μη σιλανιοποιημένες επιφάνειες δεν είναι παντού μηδενικό λόγω μικρής συγκράτησης του απταμερούς μέσω μηχανισμών προσρόφησης.



Σχήμα 1. Σήμα φθορισμού από την πρόσδεση απταμερούς τροποποιημένου με θειόλη σε επιφάνειες σιλανιοποιημένες και μη

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μία δεύτερη, εντονότερη, έκπλυση με δωδεκυλοθειικό νάτριο (sds) 0,5%. Η έκπλυση αυτή απομάκρυνε την ποσότητα απταμερούς που είχε

παραμένει στην επιφάνεια λόγω φυσικής προσρόφησης. Το σήμα στις μη σιλανιοποιημένες επιφάνειες μηδενίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Όσον αφορά στις σιλανιοποιημένες επιφάνειες, παρατηρήθηκε μεταβολή (μείωση του σήματος) για τους ίδιους λόγους.



Σχήμα 2. Σήμα φθορισμού από την πρόσδεση απταμερούς τροποποιημένου με θειόλη σε σιλανιοποιημένες επιφάνειες μετά από διαδοχικές εκπλύσεις

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, η δεύτερη έκπλυση των επιφανειών προκάλεσε απομάκρυνση των προσδεμένων βιομορίων, η οποία εκφράζεται με μείωση του σήματος φθορισμού. Αυτό σημαίνει ότι η πρόσδεση στην επιφάνεια δεν ήταν τόσο ισχυρή, αλλά πιθανώς οφείλεται σε προσρόφηση στην επιφάνεια. Ωστόσο, επισημαίνεται ότι η έκπλυση με sds ήταν ιδιαίτερα έντονη δοκιμασία και είναι θετικό το γεγονός ότι παρέμειναν μόρια προσδεμένα στην επιφάνεια, ακόμα και μετά από αυτή την έκπλυση.

- Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR Spectroscopy)

Οι επιφάνειες, σιλανιοποιημένες και μη, εξετάστηκαν, ακόμα, με φασματοσκοπία υπερύθρου. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR). Αναλύθηκαν επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου 1x1 cm², στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί κάποια από τις κατεργασίες που

προαναφέρθηκαν. Αναλύθηκαν ακόμα δείγματα στα οποία μετά την κατεργασία πραγματοποιήθηκε σιλανιοποίηση.

Ωστόσο, τα φάσματα που λήφθηκαν δε διαφοροποιούνται μεταξύ τους παρά τη διαφορετική φύση των επιφανειών. Θεωρείται ότι η εφαρμογή αυτής της αναλυτικής τεχνικής δεν έφερε αποτελέσματα λόγω χαμηλής συγκέντρωσης των υδροξυλομάδων και των μορίων σιλανίου στην επιφάνεια και παράλληλα χαμηλής ευαισθησίας της συσκευής. Για το λόγο αυτό, δεν παρατίθενται εδώ τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Στο Παράρτημα 3 παρατίθεται ενδεικτικά ένα από τα φάσματα που λήφθηκαν. Σημειώνεται, τέλος, ότι το φασματόμετρο υπεριώθρου που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Jasco, μοντέλο 4200.

- Ανάλυση φθορισμού με ακτίνες x (X-ray Fluorescence (XRF))

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση φθορισμού με ακτίνες x. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν είναι αξιοποιήσιμα δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη διαφοροποίηση, ενώ παράλληλα δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθούν όλα τα στοιχεία ενδιαφέροντος. Στο Παράρτημα 4 παρατίθεται ενδεικτικά ένα από τα φάσματα που λήφθηκαν.

- Φασματοσκοπία RAMAN

Αντίστοιχα, με τη φασματοσκοπία υπεριώθρου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με φασματοσκοπία RAMAN, από την οποία δεν προέκυψαν παρουσιάσιμα αποτελέσματα λόγω πολύ μικρής συγκέντρωσης των μορίων στην επιφάνεια.

Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να αναφερθεί αρχικά η ικανοποιητική διατήρηση της τραχύτητας όπως προκύπτει από τα δεδομένα του AFM.

Επιπλέον, το απταμερές δεν παρουσιάζει πρόσδεση σε μη σιλανιοποιημένες επιφάνειες. Το υψηλότερο ποσοστό απταμερούς συγκρατείται από την επιφάνεια που είναι κατεργασμένη με HF. Ωστόσο, λόγω σημαντικής συγκράτησης νερού και ανομοιομορφίας της επιφάνειας στο σημείο όπου προσδέεται το απταμερές, αλλά και με συνεκτίμηση του χαμηλού ποσοστού μεταβολής της τραχύτητας από τα δεδομένα του AFM, επιλέχθηκε το υδροξείδιο του νατρίου για χημική τροποποίηση στα επόμενα πειράματα, καθώς ήταν αυτό που συγκέντρωσε τα περισσότερα πλεονεκτήματα, χωρίς

ωστόσο να παρουσιάζει τη βέλτιστη συμπεριφορά έναντι των υπόλοιπων μεθόδων χημικής κατεργασίας σε κάποια αναλυτική τεχνική.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από την ανάλυση SEM-EDX, οι επιφάνειες δε διαφέρουν ουσιαστικά στη μορφολογία τους. Η στοιχειακή ημιποσοτική ανάλυση έδωσε σχετικά αναμενόμενα αποτελέσματα.

Ενότητα 2

Αφλατοξίνη B1

Εισαγωγή

Σκοπός αυτής της ενότητας ήταν η δημιουργία και η μελέτη ενός βιοαισθητήρα με στόχο κατ' αρχάς τον εντοπισμό και εν συνεχεία την ποσοτικοποίηση της παρουσίας της αφλατοξίνης B1. Η τοξίνη εντοπίζεται από το απταμερές το οποίο δημιουργήθηκε αποκλειστικά για αυτό το σκοπό και το οποίο ακινητοποιείται σε επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου μετά από μία σειρά χημικών αντιδράσεων.

Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα

Η μία εκ των δύο τοξινών που ερευνήθηκαν είναι η αφλατοξίνη B1. Σε επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου έγινε χημική τροποποίηση με NaOH με σκοπό τη δημιουργία υδροξυλίων ικανών προς αντίδραση. Ακολούθησε σιλανιοποίηση με χρήση του σιλανίου GOPTS. Στη συνέχεια, έγινε η πρόσδεση του κατάλληλου απταμερούς για τη συγκεκριμένη τοξίνη.

Το απταμερές προέκυψε από τη βιβλιοθήκη SELEX και είχε την αλληλουχία:

5' – GTTGGGCACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACACA [Thi C3] – 3'

Ως δραστική ομάδα στο άκρο του φέρει ομάδα θειόλης, η οποία μπορεί να αντιδράσει απευθείας με την ελεύθερη εποξειδική ομάδα του σιλανίου. [102] Η αντίδραση αφήνεται να γίνει σε υγρό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 12 ώρες (overnight).

Η αφλατοξίνη B1 δε φέρει φθορίζουσα ομάδα. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη συμπληρωματικού κλώνου, ώστε να ανιχνευθεί μέσω αυτού η πρόσδεση της τοξίνης στο απταμερές. Η προσθήκη του συμπληρωματικού κλώνου στο απταμερές

μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, είτε με προϋβριδοποίηση και κατόπιν πρόσδεση του απταμερούς στην επιφάνεια, είτε με διαδοχική υβριδοποίηση, δηλαδή πρόσδεση του απταμερούς στο σιλάνιο και κατόπιν προσθήκη της συμπληρωματικής αλυσίδας σε νέα αντίδραση. Σε κάθε περίπτωση συμμετέχουν υγρά διαλύματα, τα οποία απαιτούν υγρό περιβάλλον ώστε να αποφευχθεί η κατακρήμνιση των αντιδρώντων. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Η αλληλουχία του συμπληρωματικού κλώνου είναι η παρακάτω:



Η συντομογραφία TxRd αντιπροσωπεύει τη φθορίζουσα ουσία Texas Red, η οποία εκπέμπει στα 613 nm. [66]

Δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί συγκεντρώσεων απταμερούς και συμπληρωματικού κλώνου. Έγιναν δοκιμές με συγκεντρώσεις απταμερούς 1μM, 10μM, 25μM και 50μM, συγκεντρώσεις συμπληρωματικού κλώνου 1μM, 10μM και 20μM και, ενδεικτικά, διαδοχική υβριδοποίηση.

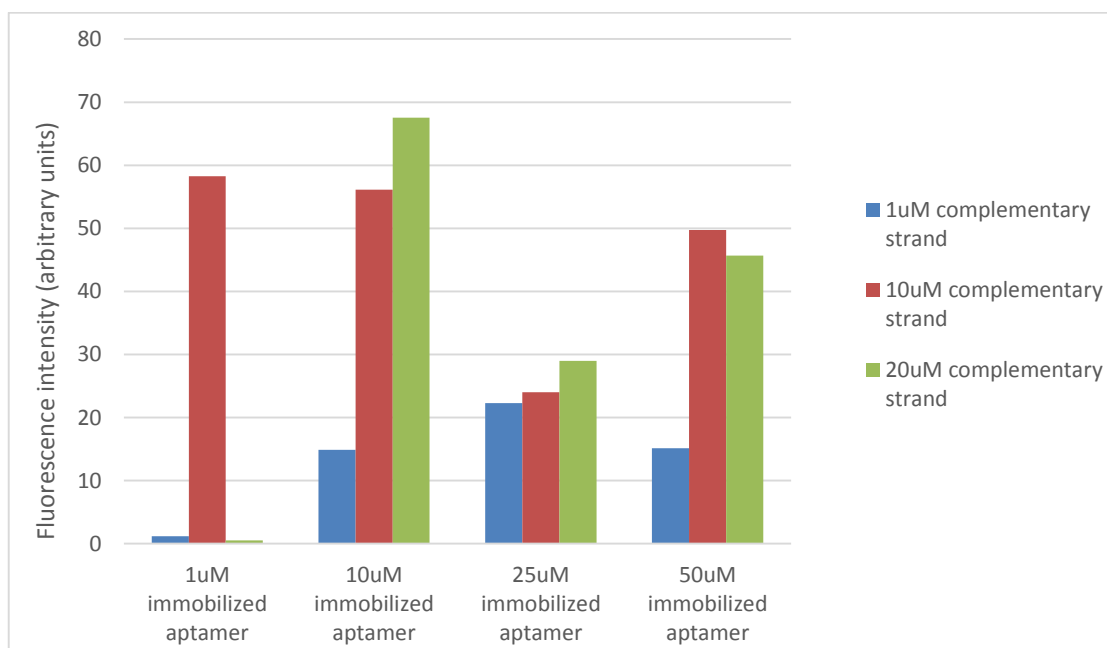
Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται λεπτομερέστερα στη συνέχεια.

- Οι επιφάνειες Si_3N_4 1x1cm βυθίζονται σε υδατικό διάλυμα NaOH 1M για 1h και σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, γίνεται έκπλυση με ddH₂O και στέγνωμα σε ροή αερίου αζώτου.
- Ακολουθεί σιλανιοποίηση σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε στην αντίστοιχη παράγραφο.
- Στην περίπτωση της διαδοχικής υβριδοποίησης επάνω στην επιφάνεια, γίνεται προσθήκη σταγόνων διαλύματος απταμερούς με την επιθυμητή συγκέντρωση και η αντίδραση αφήνεται overnight. Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση με υδατικό διάλυμα αλάτων (phosphate buffer (pH 7) +10mM KCl +5mM MgCl₂). Αφού στεγνώσει η επιφάνεια, καλύπτεται με διάλυμα του συμπληρωματικού στην επιθυμητή συγκέντρωση και αφήνεται να αντιδράσει για 10 min.
- Στην περίπτωση της προϋβριδοποίησης, τα διαλύματα απταμερούς και συμπληρωματικού στις επιθυμητές συγκεντρώσεις τοποθετούνται μαζί σε φιαλίδιο, το οποίο εισάγεται σε συσκευή ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 90 °C για μερικά λεπτά επιτρέπει την αποδιάταξη των βρόχων και τη λύση των δεσμών υδρογόνου που μπορεί να έχουν τυχαία δημιουργηθεί. Στη συνέχεια, το φιαλίδιο αφήνεται να ψυχθεί μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η μείωση της θερμοκρασίας βοηθά στην επαναδιάταξη των αλυσίδων, με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων (υβριδοποίηση). Επιπλέον, κατά την ψύξη του φιαλιδίου πραγματοποιείται φυγοκέντριση για λίγα δευτερόλεπτα ώστε να κατακρημνιστούν οι ατμοί που δημιουργήθηκαν και να επανέλθει το διάλυμα στην επιθυμητή συγκέντρωση. Το προϋβριδοποιημένο μόριο είναι πλέον έτοιμο να προσδεθεί στην επιφάνεια,

φυσικά με τον ίδιο τρόπο, αλλά με διαφορετική στερεοχημεία. Η αντίδραση αφήνεται να γίνει τουλάχιστον για 12 ώρες (overnight).

- Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, ακολουθεί έκπλυση της επιφάνειας με διάλυμα αλάτων (για παράδειγμα, phosphate buffer) και τα δείγματα εξετάζονται στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Οι εικόνες λήφθηκαν με φίλτρο Red N3, λόγω ύπαρξης της φθορίζουσας ομάδας Texas Red στο συμπληρωματικό κλώνο, για χρόνο έκθεσης 3 sec. Στη συνέχεια, οι εικόνες επεξεργάστηκαν με χρήση του προγράμματος imagej, ώστε να δοθεί μία (αυθαίρετη) αριθμητική τιμή στην ένταση του φθορισμού κάθε εικόνας για λόγους σύγκρισης μεταξύ τους. Από τα δεδομένα αυτά προέκυψε το ακόλουθο σχήμα.



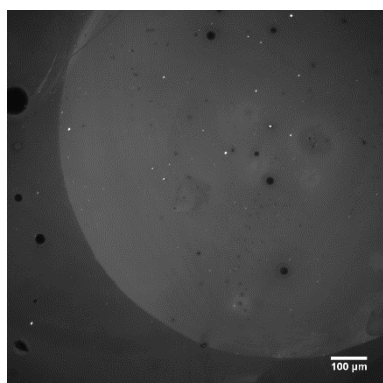
Σχήμα 3. Δοκιμές συνδυασμών συγκεντρώσεων απταμερούς και συμπληρωματικού κλώνου

Παρότι το ισχυρότερο σήμα, όσον αφορά στο συμπληρωματικό κλώνο, προέκυψε για συγκέντρωση 20μM, παρατηρείται πολύ μικρή μεταβολή στην ένταση του σήματος φθορισμού μεταξύ 10μM και 20μM συμπληρωματικού, η οποία μάλιστα είναι άλλοτε θετική και άλλοτε αρνητική. Επομένως, θεωρούμε βέλτιστη τη συγκέντρωση των 10μM για το συμπληρωματικό κλώνο.

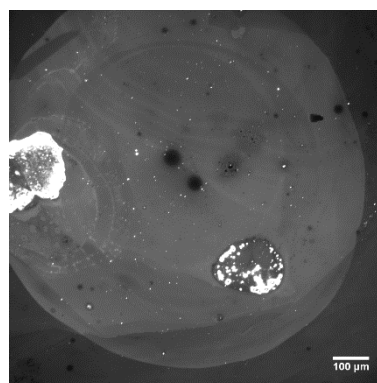
Όσον αφορά στο ακινητοποιημένο απταμερές, παρατηρείται ισχυρό σήμα στο συνδυασμό συγκεντρώσεων 1μM – 10μM απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου.

Αναφέρεται, ωστόσο, ότι η ένταση του σήματος είναι πλασματική και όχι πραγματική, καθώς οι περιοχές αντίδρασης στην επιφάνεια δε φαίνονταν σαφώς καθορισμένες. Αντιθέτως, η συμπληρωματική αλληλουχία είχε συγκρατηθεί (προφανώς με ασθενείς δυνάμεις) σε όλη την επιφάνεια και όχι μόνο στις περιοχές πρόσδεσης του απταμερούς, παρέχοντας έτσι αναληθή αποτελέσματα.

Συνολικά, οι καλύτεροι συνδυασμοί συγκεντρώσεων απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου θεωρούνται οι 10μM – 10μM και 50μM – 10μM για τη διαδοχική υβριδοποίηση.



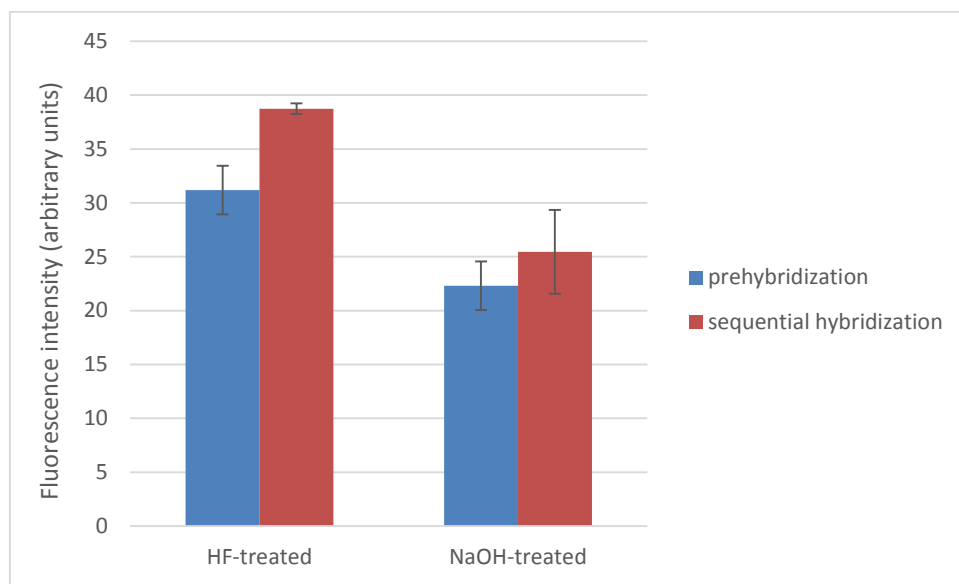
Εικόνα 12. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού διαδοχικής υβριδοποίησης για συγκεντρώσεις απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου 10μM – 10μM



Εικόνα 13. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού διαδοχικής υβριδοποίησης για συγκεντρώσεις απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου 50μM – 10μM

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου 10μM – 10μM με προϋβριδοποίηση και διαδοχική υβριδοποίηση για να προσδιοριστεί η επίδραση του τρόπου υβριδοποίησης στο τελικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, το πείραμα πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα και σε επιφάνεια κατεργασμένη με HF, εκτός από αυτή που κατεργάστηκε με NaOH. Σκοπός ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του είδους της χημικής κατεργασίας. Η κατεργασία με HF έγινε για 3 min και διάλυμα HF 1% σε θερμοκρασία δωματίου, όπως περιεγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα.

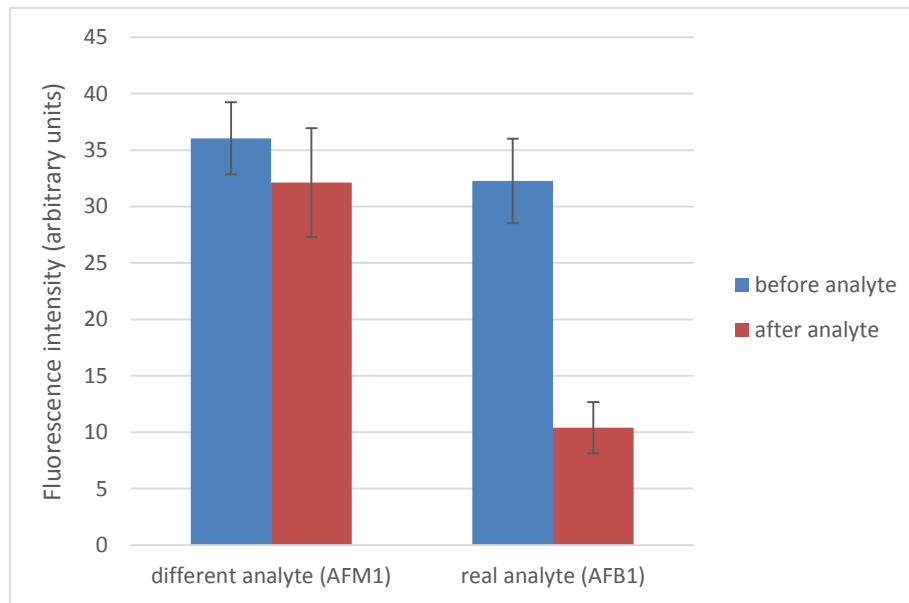
Από την πειραματική διαδικασία και τις επεξεργασμένες εικόνες του μικροσκοπίου φθορισμού προέκυψαν τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Σχήμα 4. Σύγκριση σήματος φθορισμού σε διαφορετικές επιφάνειες και διαφορετικές μεθόδους υβριδοποίησης

Παρατηρείται ότι η επιφάνεια που κατεργάστηκε με HF έδωσε, και στις δύο περιπτώσεις υβριδοποίησης, υψηλότερο σήμα φθορισμού, σε σύγκριση με την επιφάνεια που κατεργάστηκε με NaOH. Ωστόσο, η επιφάνεια αυτή συγκράτησε μεγαλύτερο ποσοστό νερού συγκριτικά με την επιφάνεια που κατεργάστηκε με NaOH. Σημειώνεται επίσης ότι οι επιφάνειες με NaOH παρουσίασαν συνολικά πιο ομοιόμορφες εικόνες. Για το λόγο αυτό, τα επόμενα πειράματα έγιναν σε επιφάνειες κατεργασμένες με NaOH, κατά τις γνωστές συνθήκες. Επισημαίνεται, τέλος, ότι η διαδοχική υβριδοποίηση έδωσε, και στις δύο περιπτώσεις κατεργασίας, πιο ομοιόμορφες επιφάνειες με σαφή όρια και, όπως είναι φανερό από το σχήμα, ισχυρότερο σήμα φθορισμού.

Το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι η πραγματική δοκιμή με τον αναλύτη (αφλατοξίνη B1). Σε επιφάνειες κατεργασμένες με NaOH γίνεται πρόσδεση απταμερούς και συμπληρωματικού κλώνου με διαδοχική υβριδοποίηση σε συγκεντρώσεις 10μM και 10μM, αντίστοιχα, ως απόρροια των προηγούμενων πειραμάτων. Κατόπιν, προστίθεται ο πραγματικός αναλύτης (αφλατοξίνη B1) για έλεγχο της αναγνώρισής του και ένας πλασματικός αναλύτης (αφλατοξίνη M1) για έλεγχο της εκλεκτικότητας της διάταξης. Οι αναλύτες χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 1mg/mL, διαλυμένοι σε DMSO, για 40 min. Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα αλάτων, παρατήρηση των επιφανειών σε μικροσκόπιο φθορισμού για χρόνο έκθεσης 3 sec και φίλτρο Red N3 και, στη συνέχεια, επεξεργασία των εικόνων που λήφθηκαν ώστε να ποσοτικοποιηθεί η σύγκριση μεταξύ τους.



Σχήμα 5. Σύγκριση σήματος φθορισμού πριν και μετά την έκθεση σε αναλύτες

Στην περίπτωση της AFM1, το σήμα παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστο από την παρουσία της τοξίνης, γεγονός που υποδηλώνει την εκλεκτικότητα του βιοαισθητήρα. Στην περίπτωση του πραγματικού αναλύτη, αναμένεται μείωση του σήματος φθορισμού με την επιτυχή πρόσδεση της τοξίνης. Ο λόγος είναι ότι ο φθορισμός υπάρχει στο συμπληρωματικό κλώνο. Παρουσία του αναλύτη, ο συμπληρωματικός κλώνος απομακρύνεται αφήνοντας το απταμερές «ελεύθερο» να δεσμεύσει την τοξίνη. Πράγματι, στο παραπάνω σχήμα παρατηρείται μείωση του σήματος φθορισμού του συμπληρωματικού κλώνου, δηλαδή απομάκρυνσή του, μετά την έκθεση της επιφάνειας στην τοξίνη.

Συμπεράσματα

- Για το διαδοχικά υβριδοποιημένο απταμερές και τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, παρατηρήθηκε ισχυρότερο σήμα φθορισμού, δηλαδή μέγιστη συγκέντρωση προσδεμένου υβριδοποιημένου απταμερούς, για συγκεντρώσεις απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου 10μM – 10μM και 50μM – 10μM.
- Η διαδοχική υβριδοποίηση παρέχει περισσότερο ομοιόμορφες επιφάνειες σε σύγκριση με τις επιφάνειες που προκύπτουν από προϋβριδοποίηση. Επιπλέον, για

τη διαδοχική υβριδοποίηση είναι μεγαλύτερο το σήμα φθορισμού, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία περισσότερων συμπληρωματικών μορίων και, κατ' επέκταση, μορίων απταμερούς στην επιφάνεια. Επομένως, θεωρείται η διαδοχική υβριδοποίηση ως η βέλτιστη μέθοδος υβριδοποίησης για τις δεδομένες συνθήκες.

- Κατεργασία των επιφανειών με HF οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απταμερούς που κατορθώνει να προσδεθεί στην επιφάνεια, μεγαλύτερη δέσμευση νερού και μεγαλύτερη ανομοιομορφία συγκριτικά με την κατεργασία με NaOH. Ως απόρροια αυτού, επιλέγεται η κατεργασία με NaOH για τη συνέχεια των πειραμάτων.
- Από τη συμπεριφορά του βιοαισθητήρα παρουσία της αφλατοξίνης B1 και μίας διαφορετικής τοξίνης, επιβεβαιώνεται η εκλεκτικότητα της διάταξης και η σωστή λειτουργία της, δεδομένου ότι ο φθορισμός παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητος παρουσία της διαφορετικής τοξίνης (δεν απομακρύνθηκε η συμπληρωματική αλληλουχία), ενώ παρουσία του αναλύτη ο συμπληρωματικός κλώνος απομακρύνθηκε (μείωση σήματος) για να δεσμευτεί ο αναλύτης από το απταμερές, όπως αναμένεται.

Ενότητα 3

Ωχρατοξίνη A

Εισαγωγή

Σε αυτό το μέρος της πειραματικής διαδικασίας, σχεδιάστηκε και ελέγχθηκε η πρόσδεση ενός διαφορετικού αναλύτη, της ωχρατοξίνης A, στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Ακολουθώντας αντίστοιχη διαδικασία με την αφλατοξίνη B1, έγιναν πειράματα για την ωχρατοξίνη A με σκοπό την εύρεση των συνθηκών που οδηγούν σε μεγιστοποίηση του σήματος φθορισμού, δηλαδή στη μέγιστη συγκέντρωση σημείων που μπορούν να ανιχνεύσουν και να δεσμεύσουν την τοξίνη.

Σημειώνεται ότι η ωχρατοξίνη A παρουσιάζει αυτοφθορισμό, επομένως ορισμένα πειράματα αποσκοπούν στον άμεσο εντοπισμό της τοξίνης και όχι στον έμμεσο, μέσω μείωσης φθορισμού του συμπληρωματικού κλώνου που απομακρύνεται παρουσία της τοξίνης. Επιπλέον σε αυτή τη σειρά πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης με στόχο την αύξηση της ενεργής επιφάνειας του βιοαισθητήρα, δηλαδή αύξηση των σημείων πρόσδεσης των απταμερών. Περισσότερα μόρια απταμερών μπορούν να αυξήσουν την ποσότητα της τοξίνης που ανιχνεύεται, συνεπώς να αυξήσουν την ευαισθησία της διάταξης.

Πραγματοποιήθηκαν πολλές δοκιμές πρόσδεσης δενδριμερών, ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση και γενιά. Επισημαίνεται ότι οι βέλτιστες τιμές καθορίζονται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι το είδος του μορίου ή του απταμερούς που θα προσδεθεί στο δενδριμερές, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων που μπορεί να προκύψουν. Ωστόσο, δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθεί κάποια τεχνική ώστε να αξιολογηθεί η πρόσδεση του PAMAM άμεσα. Αντιθέτως, χρησιμοποιήθηκαν χρωστικές (φθορίζουσες ουσίες) και απταμερή φέροντα φθορίζουσες ομάδες, μόρια τα οποία είναι δυνατό να προσδεθούν στο δενδριμερές και να ανιχνευθούν με μικροσκοπία φθορισμού. Φυσικά, αυτό εισάγει νέες παραμέτρους, όπως η συγκέντρωση της ουσίας, η ένταση του φθορισμού της χρωστικής ή της φθορίζουσας ομάδας, η διαλυτοποίηση της χρωστικής και λοιπά.

Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα

FITC

Η πρώτη χρωστική που χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της προσθήκης PAMAM στην επιφάνεια και την ποσοτική σύγκριση των δενδριμερών ήταν το FITC (fluorescence isothiocyanate). Για το FITC έγιναν επιπλέον αρκετές δοκιμές για τη διερεύνηση της επίδρασης του διαλύτη της σκόνης αλλά και του μέσου που χρησιμοποιείται για την έκπλυση στο τέλος της αντίδρασης PAMAM-FITC, ώστε να σταματήσει η αντίδραση και να απομακρυνθεί όση ουσία δεν αντέδρασε.

Στη βιβλιογραφία [64] βρέθηκαν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες το FITC διαλύεται σε ακετόνη σε συγκέντρωση 1 mg/mL. Επιπλέον, στη βιβλιογραφία αναφέρεται διαλυτοποίηση του FITC σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO). [103] [104] [105] [106] Παρατηρήθηκε ακόμα ότι το FITC είναι διαλυτό και σε υδατικό διάλυμα βορικού οξέος (borate buffer), αλλά σε χαμηλότερη συγκέντρωση.

Κατά την πειραματική διαδικασία, η φθορίζουσα ουσία FITC σε μορφή σκόνης διαλύθηκε σε DMSO. Κατόπιν, το ήδη διαλυμένο FITC αραιώθηκε σε υδατικό διάλυμα βορικού οξέος (borate buffer) 0,05M (pH=8,5) μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0,1mg/mL. Το στάδιο αυτό βοηθά στην πρόσδεση του διαλυμένου FITC στις ελεύθερες αμινομάδες της επιφάνειας.

Σε επιφάνειες με PAMAM δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια πιπέτας σημειακές σταγόνες από FITC. Οι επιφάνειες φυλάχθηκαν σε κλειστό τρυβλίο με υγρασία και σε σκιερό χώρο για μία ώρα. Γενικά, κατά τη χρήση του FITC, απαιτείται ελαχιστοποίηση του φωτός ώστε να διατηρηθεί ο φθορισμός της χρωστικής, καθώς έχει παρατηρηθεί εξασθένηση του φθορισμού όσο αυξάνεται η έκθεση σε φωτεινό περιβάλλον (photobleaching).

Η έκπλυση της επιφάνειας είναι επίσης σημαντική, όπως αποδείχτηκε από τα συγκεκριμένα πειράματα. Έκπλυση με DMSO προκαλεί σημαντικές μεταβολές στο σήμα του φθορισμού. Αντίθετα, έκπλυση με ήπιο υδατικό διάλυμα (χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα βορικού οξέος 0,05M) επιτρέπει την ομοιομορφία της επιφάνειας. Η έκπλυση κρίνεται απαραίτητη ώστε να απομακρυνθεί η περισσευούμενη ποσότητα FITC που δεν αντέδρασε.

Μετά από κάθε πείραμα της προκαταρκτικής μελέτης, ακολούθησε η παρατήρηση των επιφανειών στο μικροσκόπιο φθορισμού. Το μικροσκόπιο ήταν τύπου LEICA DMRA2. Το φίλτρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GFP και ο χρόνος έκθεσης 5 sec, ενώ χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του FITC, των διαλυμάτων έκπλυσης, αλλά και του PAMAM στο υπόστρωμα. Γενικά, ήταν δυνατή η διάκριση και η εξαγωγή συμπερασμάτων για το μέσο διαλυτοποίησης της χρωστικής και έκπλυσης των

επιφανειών στο τέλος της αντίδρασης. Παρά όμως το μεγάλο χρόνο έκθεσης, τα αποτελέσματα ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ασθενή και μη παρουσιάσιμα. Συνολικά, το FITC κρίνεται ανεπαρκές για τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

FAM

Αντίστοιχα με το FITC, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με το FAM (6-Fluorescein Phosphoramidite). Η χρωστική αυτή είναι διαλυτή σε ακετονιτρίλιο και χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 20μΜ. [107] Και σε αυτή την περίπτωση, το σήμα ήταν εξαιρετικά ασθενές.

Φθορίζοντα βιομόρια

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικές γενιές (generations) δενδριμερών στην ίδια συγκέντρωση και παράλληλα δοκιμές με διαφορετικές συγκεντρώσεις δενδριμερών της ίδιας γενιάς. Η πρόσδεση των δενδριμερών έγινε σε επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου σιλανιοποιημένες κατά τη συνήθη διαδικασία και κατεργασμένες με υδροξείδιο του νατρίου NaOH 1M για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η σύγκριση μεταξύ των επιφανειών έγινε με χρήση απταμερών και αντίστοιχων συμπληρωματικών κλώνων οι οποίοι έφεραν φθορίζουσα ομάδα. Η αλληλουχία των απταμερών επιλέχθηκε από τη βιβλιοθήκη SELEX σύμφωνα με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για το απταμερές της αφλατοξίνης B1. Σε αυτή την περίπτωση όμως, ο αναλύτης τον οποίο καλούνταν τα απταμερή να ανιχνεύσουν ήταν η ωχρατοξίνη A. Επιλέχθηκε ενδεικτικά προϋβριδοποίηση για το απταμερές και τη συμπληρωματική αλληλουχία.

Στη μία σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0,2%, 0,5%, 1%, 5%, 10% και 20% για δενδριμερές PAMAM γενιάς G2. Το PAMAM διαλυμένο σε μεθανόλη και στις κατάλληλες συγκεντρώσεις προστέθηκε στην επιφάνεια σε ποσότητα επαρκή για την κάλυψή της, ώστε να αντιδράσει με την ελεύθερη εποξειδική ομάδα του σιλανίου στο υπόστρωμα νιτριδίου του πυριτίου. Η επιφάνεια καλύφθηκε αμέσως με μία δεύτερη επιφάνεια δημιουργώντας μία διαμόρφωση «sandwich». [108] Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε overnight σε θερμοκρασία 2-8 °C, σε τρυβλίο κλειστό με parafilm και συνθήκες αυξημένης υγρασίας για να αποτραπεί η εξάτμιση της μεθανόλης και η κατακρήμνιση των δενδριμερών στην επιφάνεια. Εκτός από αυτή τη διάταξη, παρατηρήθηκε μετά από δοκιμές ότι ακόμα και χωρίς τη διαμόρφωση «sandwich» η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προϋπόθεση ότι η επιφάνεια παραμένει καθόλη τη διάρκεια της αντίδρασης σε περιβάλλον αυξημένης υγρασίας ώστε να δυσχεραίνεται η εξάτμιση της μεθανόλης. Την επόμενη μέρα, έγινε έκπλυση με

μεθανόλη ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του PAMAM που δεν αντέδρασε και οι επιφάνειες τοποθετήθηκαν σε ροή αζώτου για στέγνωμα.

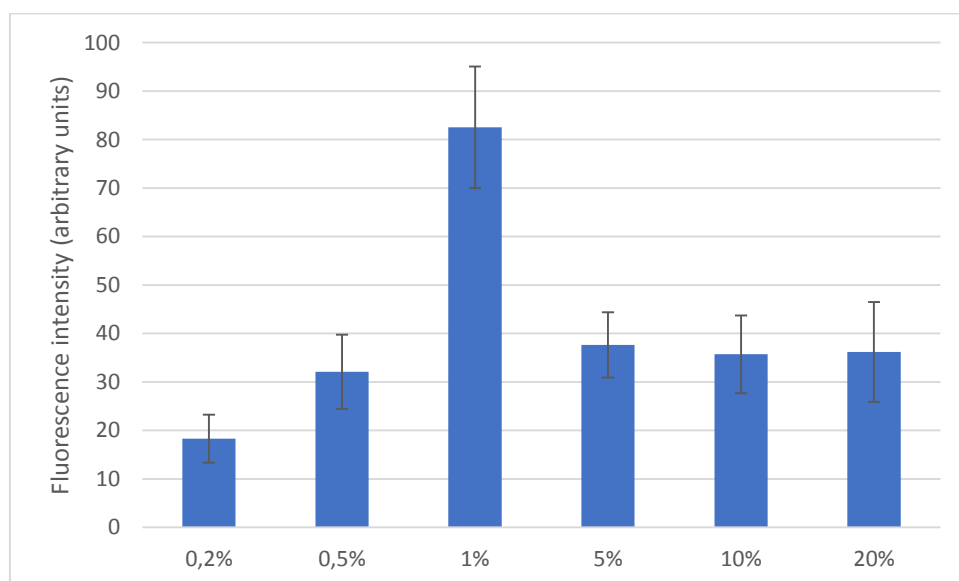
Για να είναι δυνατή η πρόσδεση του απταμερούς μέσω της αμινομάδας του, ήταν αναγκαία η προσθήκη ενός συνδέτη μικρού μήκους, ώστε να είναι δυνατή η αντίδραση με αμίνες και στα δύο άκρα αυτού. Ο συνδέτης που επιλέχθηκε ήταν η γλουτεραλδεΐδη. Οι επιφάνειες καλύφθηκαν με υδατικό διάλυμα γλουτεραλδεΐδης 2,5% v/v και αφέθηκαν να αντιδράσουν για 1h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, εκπλύθηκαν με ddH₂O.

Έγινε η προσθήκη του απταμερούς, προϋβριδοποιημένου με το συμπληρωματικό κλώνο σε συγκεντρώσεις 50μM και 1μM, αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτές που παρουσιάζονται παρακάτω.

Απταμερές: 5' – [AmC12] GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA – 3'

Συμπληρωματικός κλώνος: 5' – CCCACACCCTTT [TxRd] – 3'

Την επόμενη μέρα, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με διάλυμα αλάτων (wash buffer) και εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού ανιχνεύοντας τη φθορίζουσα ομάδα TexasRed του συμπληρωματικού κλώνου, που εκπέμπει στα 615 nm. Χρησιμοποιήθηκε φίλτρο N3 και χρόνος έκθεσης 3 sec. Οι εικόνες που λήφθηκαν από το μικροσκόπιο φθορισμού ποσοτικοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος imagej. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.

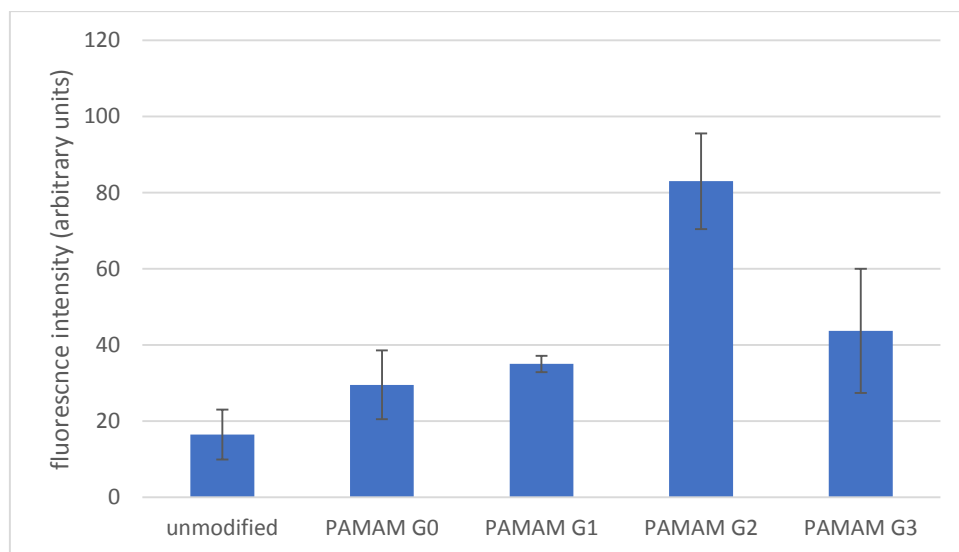


Σχήμα 6. Σύγκριση σήματος φθορισμού διαφορετικών συγκεντρώσεων PAMAM γενιάς G2

Παρατηρείται ότι δεν αυξάνεται το σήμα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του PAMAM, αντιθέτως υπάρχει μία μέγιστη τιμή και κατόπιν το σήμα μειώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης μέχρι μία σταθερή τιμή. Αυτό αποδίδεται σε φαινόμενα στερεοχημικών παρεμποδισμών στην επιφάνεια και στον κορεσμό της σε δεδομένη συγκέντρωση. Με άλλα λόγια, τα δενδριμερή καταλαμβάνουν χώρο στην επιφάνεια και προσδένονται με τέτοιο τρόπο ώστε περίπου σε 1% συγκέντρωση υπάρχει η δυνατότητα να προσδεθεί ο μέγιστος αριθμός μορίων.

Η αντίστοιχη σειρά πειραμάτων με διαφοροποίηση στις γενιές του PAMAM και σταθερή συγκέντρωση έδωσε παρόμοια αποτελέσματα. Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρήθηκαν ακριβώς οι ίδιες και χρησιμοποιήθηκε PAMAM συγκέντρωσης 1% από γενιές G0, G1, G2 και G3. Επίσης, έγινε προσθήκη προϋβριδοποιημένου απταμερούς και σε επιφάνεια μη τροποποιημένη με PAMAM (unmodified). Τα ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα από το μικροσκόπιο φθορισμού βρίσκονται συγκεντρωμένα στο παρακάτω σχήμα.

Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται μεγιστοποίηση του σήματος για δεδομένες συνθήκες και κατόπιν πτώση αυτού παρά την προσθήκη δενδριμερών με μεγαλύτερο αριθμό δραστικών ομάδων. Το φαινόμενο αποδίδεται και πάλι σε στερεοχημική παρεμπόδιση, καθώς αύξηση της γενιάς συνεπάγεται αύξηση του μεγέθους του μορίου και του αριθμού των δραστικών θέσεων αλλά και μεγαλύτερη εγγύτητα μεταξύ τους. Επισημαίνεται ακόμα ότι τα PAMAM G0 και G1 δε φέρουν σφαιρική μορφή αλλά περισσότερο γραμμική. Αυτό μειώνει σημαντικά τις παρεμποδίσεις, αλλά το κάθε μόριο εκ κατασκευής δε διαθέτει πολλά δραστικά σημεία για την πρόσδεση του απταμερούς.



Σχήμα 7. Σύγκριση σήματος φθορισμού διαφορετικών γενεών PAMAM σε συγκέντρωση 1%

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων επιλέχθηκαν οι γενιές 0 και 2, καθώς η γενιά 3 δεν έδωσε καλά αποτελέσματα λόγω αυξημένης υδροφιλικότητας που παρεμπόδιζε τη συνέχεια των πειραμάτων. Το νερό που είχε συγκρατήσει το PAMAM είχε πιθανώς δεσμευτεί στις κοιλότητες του δενδριμερούς, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα, παραδείγματος χάρη σε ροή αζώτου. Όσον αφορά στη γενιά 1, δεν εξετάστηκε περαιτέρω καθώς τα αποτελέσματα που έδωσε δε διέφεραν σημαντικά από αυτά της γενιάς 0. Η γενιά 0 επιλέχθηκε έναντι τη γενιάς 1 για λόγους καθαρότερης σύγκρισης μεταξύ αυτής και της γενιάς 2.

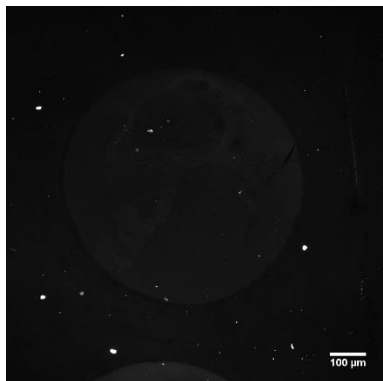
Έγινε επιλογή μεταξύ των παραπάνω αποτελεσμάτων και τα πειράματα επαναλήφθηκαν με διαδοχική υβριδοποίηση. Αρχικά, επιλέχθηκε μόνο η βέλτιστη συγκέντρωση και γενιά, όπως προέκυψε από τα προηγούμενα, δηλαδή PAMAM G2 1%, για διαδοχική υβριδοποίηση με σκοπό να εξεταστεί σε πρώτο στάδιο μία επιμέρους παράμετρος.

Στη διαδοχική υβριδοποίηση γίνεται διαδοχικά η πρόσδεση του απταμερούς στην επιφάνεια και κατόπιν η πρόσδεση του συμπληρωματικού κλώνου στα προσδεμένα απταμερή (υβριδοποίηση). Του σταδίου πρόσδεσης του συμπληρωματικού κλώνου μπορεί να προηγηθεί ένα στάδιο «μπλοκαρίσματος» (blocking) των δραστικών θέσεων που δε δέσμευσαν μόρια απταμερούς, ώστε να περιοριστεί η πρόσδεση του συμπληρωματικού κλώνου μόνο στη συμπληρωματική αλληλουχία και όχι σε τυχαία σημεία της επιφάνειας λόγω άλλων ασθενών δεσμών. Υπενθυμίζεται ότι οι διαθέσιμες δραστικές θέσεις δεν είναι αμινομάδες του απταμερούς αλλά γίνεται η υπόθεση ότι η γλουτεραλδεΐδη έχει δεσμεύσει όλες τις αμινομάδες αφήνοντας διαθέσιμες μόνο τις αλδεΐδομάδες που φέρει η ίδια. Το στάδιο μπλοκαρίσματος των δραστικών θέσεων είναι η παράμετρος που εξετάστηκε προτού δοκιμαστούν περισσότεροι συνδυασμοί διαδοχικής υβριδοποίησης.

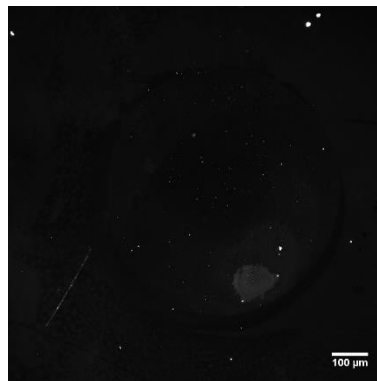
Εξετάστηκε η αναγκαιότητα ή μη της διαδικασίας blocking στη διαδικασία της διαδοχικής υβριδοποίησης. Χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες PAMAM G2 1%. Η πειραματική διαδικασία τροποποιήθηκε, κατά συνέπεια, με την προσθήκη αιθανολαμίνης συγκέντρωσης 1mM για 30 min μετά την ολοκλήρωση πρόσδεσης του απταμερούς και την έκπλυση της επιφάνειας με υδατικό διάλυμα αλάτων. Ακολούθησε έκπλυση με ddH₂O και προσθήκη του συμπληρωματικού κατά τις συνήθεις συνθήκες (15 min, έκπλυση με υδατικό διάλυμα αλάτων και λοιπά). Φυσικά, εξετάστηκε και επιφάνεια χωρίς την προαναφερθείσα διαδικασία αλλά με απευθείας προσθήκη του συμπληρωματικού κλώνου.

Τα αποτελέσματα συνολικά ήταν χειρότερα χωρίς τη διαδικασία blocking. Επιπλέον, η προσθήκη αιθανολαμίνης ενίσχυσε τη διατήρηση του σχήματος των σταγόνων του συμπληρωματικού κλώνου και δεν επέτρεψε την τυχαία πρόσδεσή του στην επιφάνεια.

Πιστοποιείται επομένως η αναγκαιότητα μπλοκαρίσματος των δραστικών θέσεων στην επιφάνεια.



Εικόνα 14. Σημείο με προσδεμένο απταμερές στην επιφάνεια μετά την προσθήκη αιθανολαμίνης



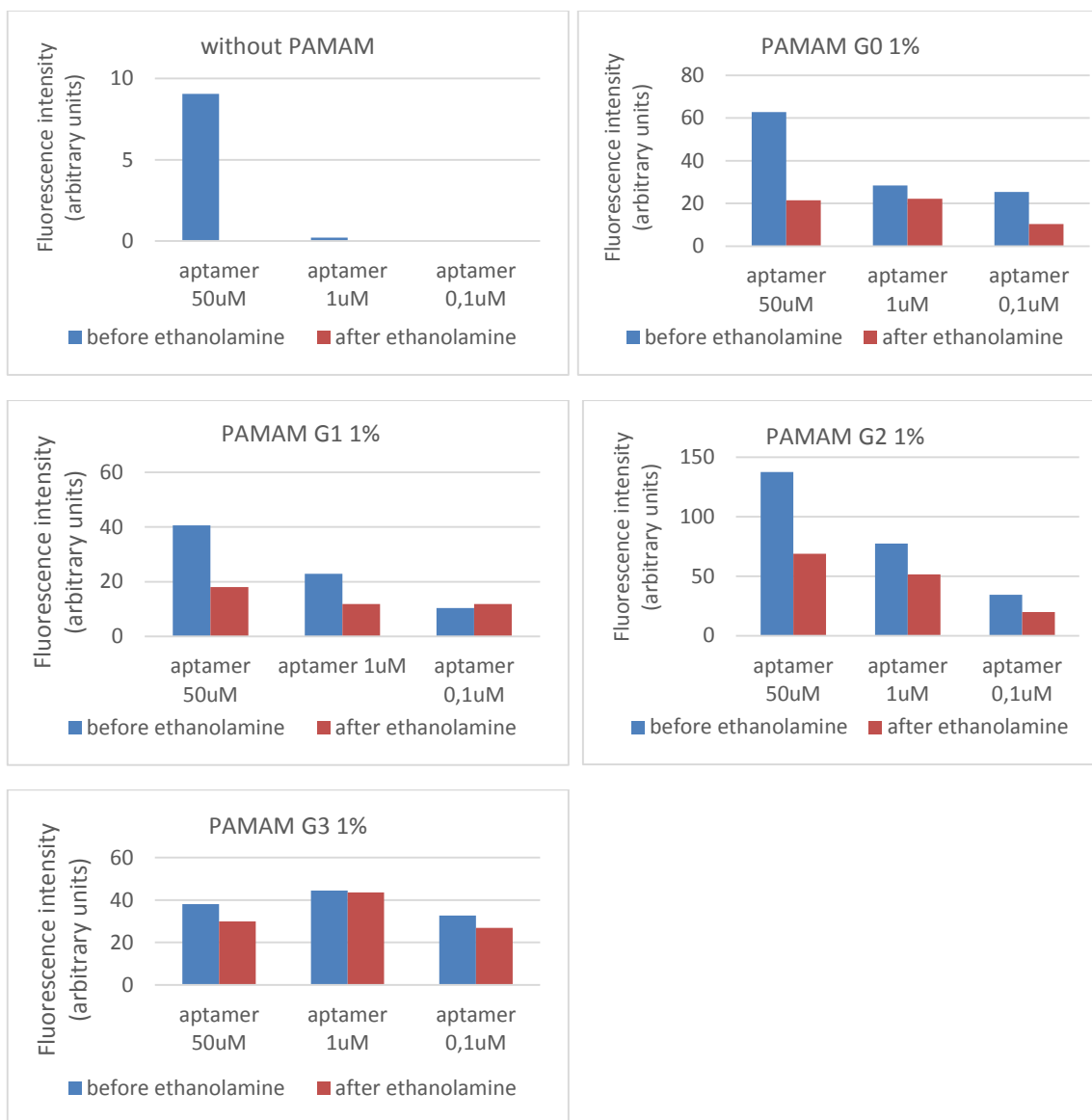
Εικόνα 15. Σημείο με προσδεμένο απταμερές στην επιφάνεια χωρίς προσθήκη αιθανολαμίνης

Σε αυτό το σημείο διευκρινίζεται ότι για τη διεξαγωγή του παραπάνω πειράματος χρησιμοποιήθηκε καινούρια αλληλουχία απταμερούς, η οποία έφερε χρωστική στο ελεύθερο άκρο της (Cyanine5). Υπενθυμίζεται ότι στα προηγούμενα πειράματα το απταμερές δεν ήταν σημασμένο, αλλά φθορισμό έφερε μόνο ο συμπληρωματικός κλώνος. Η χρήση του σημασμένου απταμερούς προσφέρει το πλεονέκτημα της άμεσης μελέτης, και όχι έμμεσης μέσω του συμπληρωματικού κλώνου. Η αλληλουχία του απταμερούς είναι η εξής:

5' – [Cyanine5] GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA [Am C7] – 3'

Ο συμπληρωματικός κλώνος είναι ο ίδιος με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα πειράματα.

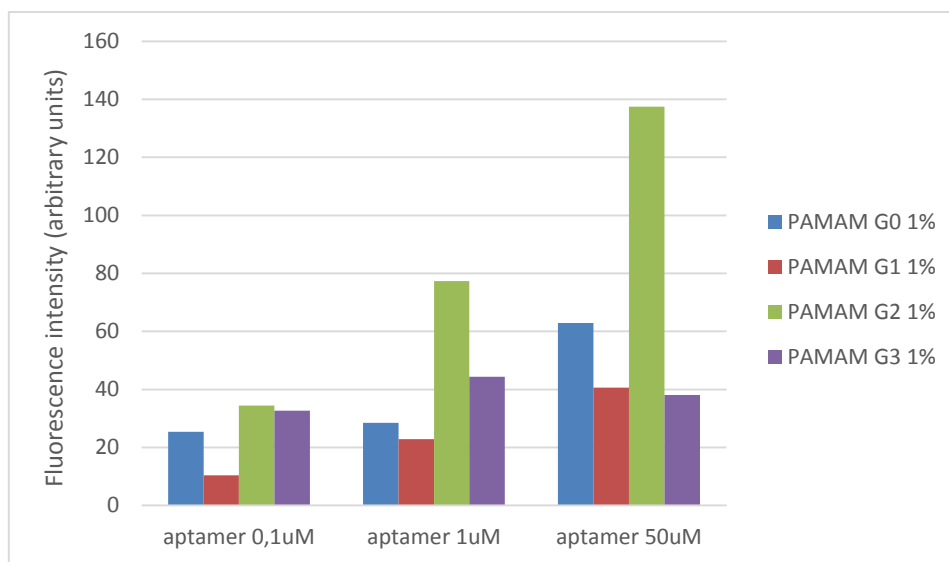
Επιπρόσθετα, η χρήση της καινούριας αλληλουχίας απταμερούς οδήγησε στην ακόλουθη παρατήρηση. Κατά την προσθήκη αιθανολαμίνης παρατηρήθηκε μείωση του σήματος φθορισμού (του απταμερούς), συνεπώς απομάκρυνση των ασθενώς προσδεμένων απταμερών. Η παρατήρηση αυτή έγινε το έναυσμα για μερικά ακόμα πειράματα πρόσδεσης φθορίζοντος απταμερούς και παρατήρηση του φθορισμού πριν και μετά την αιθανολαμίνη για διάφορες συγκεντρώσεις απταμερούς. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα.



Σχήμα 8 α-ε. Σύγκριση σήματος φθορισμού πριν και μετά την προσθήκη αιθανολαμίνης σε διαφορετικές γενιές PAMAM

Συγκεντρώνοντας όλα τα παραπάνω δεδομένα (προ αιθανολαμίνης), μπορούν να προκύψουν ενδιαφέροντα δεδομένα σχετικά με τη συγκέντρωση κορεσμού της επιφάνειας σε απταμερές. Τα δεδομένα αυτά είναι χρήσιμα ώστε να γνωρίζουμε εάν τα πειράματα διεξάγονται σε συνθήκες μέγιστης πρόσδεσης του απταμερούς. Μόνο σε αυτές τις συνθήκες μπορεί να γίνει λόγος για στερεοχημική παρεμπόδιση στην επιφάνεια. Στο παρακάτω σχήμα βρίσκονται συγκεντρωμένα όλα τα παραπάνω δεδομένα (αγνοώντας την αιθανολαμίνη), με σκοπό την ποσοτικοποίηση της

μεταβολής στην επιφάνεια καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του απταμερούς που προσδένεται.

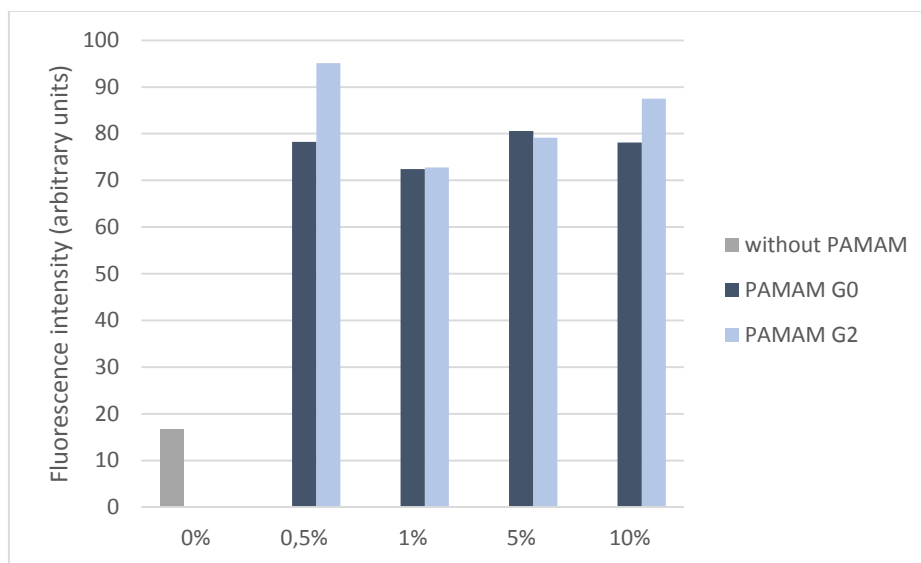


Σχήμα 9. Σύγκριση σήματος φθορισμού διαφόρων συγκεντρώσεων φθορίζοντων απταμερών προσδεμένων σε διαφορετικές γενιές PAMAM

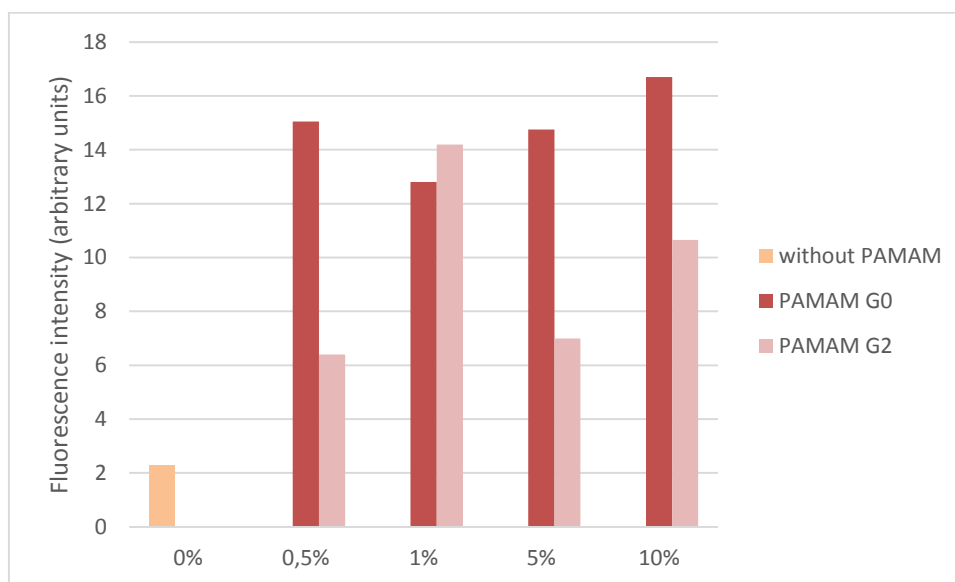
Παρατηρείται ότι για τις γενιές 0, 1 και 2 υπάρχει αύξηση του σήματος φθορισμού, όσο αυξάνει η συγκέντρωση του απταμερούς. Επομένως, όλο και περισσότερα μόρια απταμερούς μπορούν να προσδεθούν στην επιφάνεια, τουλάχιστον μέχρι τη συγκέντρωση των 50μM. Ωστόσο, η γενιά 3 διαθέτει περισσότερο ογκώδη μόρια με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται αξιόλογη μεταβολή στο σήμα φθορισμού παρά την αύξηση της συγκέντρωσης για περισσότερο από 1μM.

Στο σημείο αυτό υπάρχουν οι προϋποθέσεις ώστε να δοκιμαστούν κάποιοι συνδυασμοί με διαδοχική υβριδοποίηση. Για λόγους που προαναφέρθηκαν, τα πειράματα περιορίστηκαν σε γενιές PAMAM 0 και 2. Επίσης, όσον αφορά στις συγκεντρώσεις απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου, αυτές είναι 50μM – 1μM και πριν την υβριδοποίηση προηγείται η διαδικασία μπλοκαρίσματος των δραστικών θέσεων με αιθανολαμίνη. Η συγκέντρωση 50μM για το απταμερές επιλέχθηκε ώστε να υπάρχει η μέγιστη δυνατή πρόσδεση από όσες συγκεντρώσεις μελετήθηκαν. Σημειώνεται ότι και οι δύο αλληλουχίες που υβριδοποιήθηκαν (απταμερές και συμπληρωματική) έφεραν φθορίζουσα ομάδα (Cyanine5 και TexasRed, αντίστοιχα), επομένως αξιοποιήθηκαν και οι δύο κατά τη μελέτη των επιφανειών.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα ακόλουθα διαγράμματα.



Σχήμα 10. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για PAMAM G0 και G2 και διαδοχική υβριδοποίηση

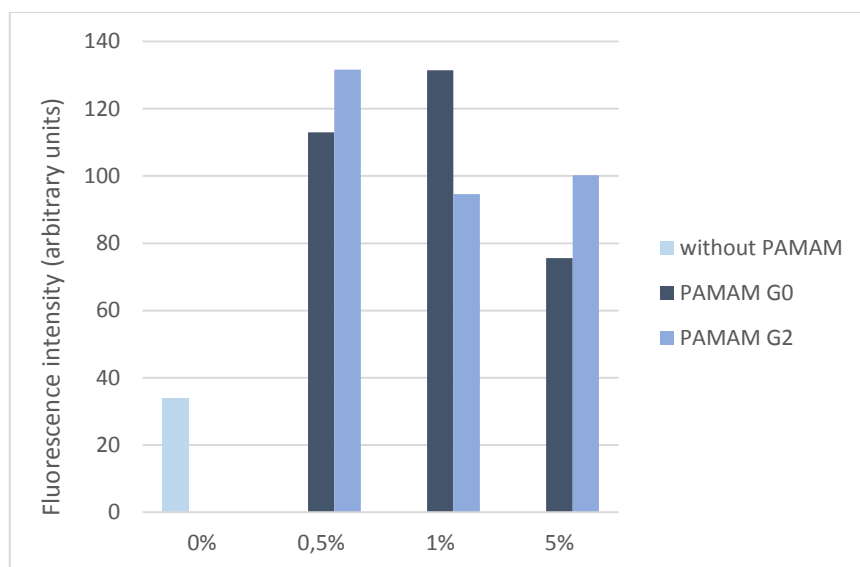


Σχήμα 11. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο N3) για PAMAM G0 και G2 και διαδοχική υβριδοποίηση

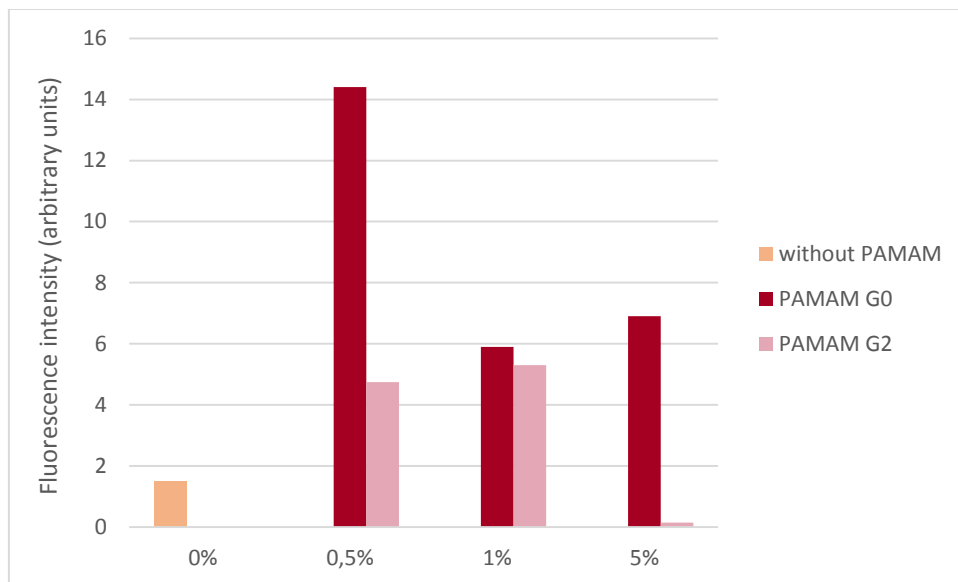
Από τα διαγράμματα δεν μπορεί να εξαχθεί σαφής τάση υπεροχής της γενιάς 0 ή της γενιάς 2 του PAMAM, ενώ δεν παρατηρήθηκε ούτε καθαρά αυξητική τάση ή τάση μείωσης με δεδομένη μεταβολή της συγκέντρωσης του δενδριμερούς. Αυτά ισχύουν και για τα δύο φθορίζοντα μόρια που ήταν εφικτό να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Σημειώνεται ότι ο λόγος για τον οποίο εξετάστηκε και ο φθορισμός του συμπληρωματικού κλώνου, εκτός του απταμερούς, ήταν επειδή σε άλλες περιπτώσεις δεν είναι διαθέσιμο φθορίζον απταμερές, επομένως η σύγκριση μπορεί να γίνει μόνο

έμμεσα μέσω του συμπληρωματικού κλώνου. Η μέγιστη συγκέντρωση απταμερούς παρατηρήθηκε για χαμηλή συγκέντρωση του PAMAM G2. Ωστόσο, η διαφοροποίηση στις υπόλοιπες τιμές δεν είναι τόσο μεγάλη και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων δε θεωρείται ιδιαίτερα αξιόπιστη.

Πραγματοποιήθηκε μία παρόμοια σειρά αποτελεσμάτων με προϋβριδοποιημένο απταμερές, ώστε να γίνει σύγκριση στη συμπεριφορά των δύο τρόπων υβριδοποίησης. Και εδώ, αξιοποιήθηκαν και οι δύο φθορίζουσες ομάδες. Οι συγκεντρώσεις του απταμερούς και του συμπληρωματικού κλώνου, καθώς και ο χρόνος έκθεσης (3 sec) διατηρήθηκαν ίδια για λόγους άμεσης σύγκρισης. Τα διαγράμματα που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στη συνέχεια.



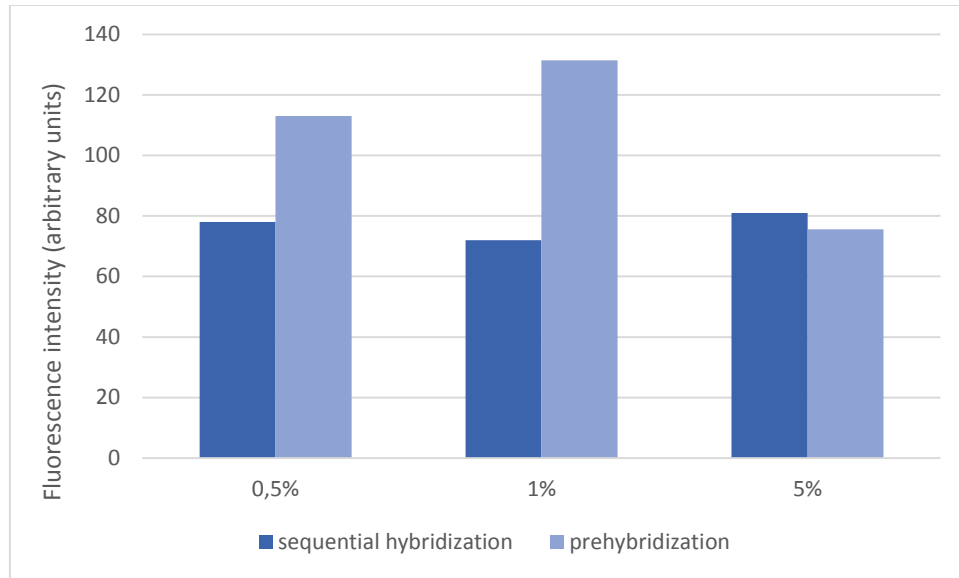
Σχήμα 12. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για PAMAM G0 και G2 και προϋβριδοποίηση



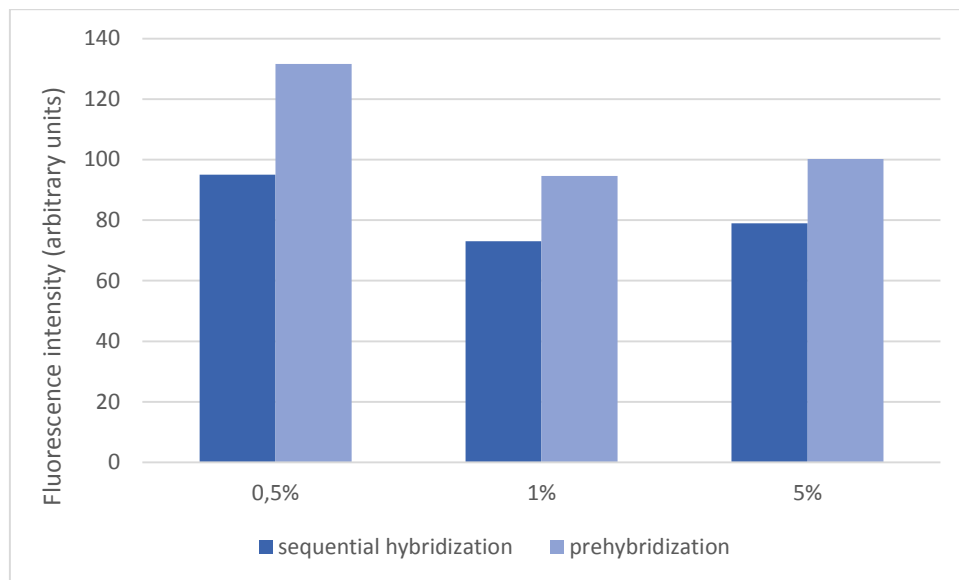
Σχήμα 13. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο N3) για PAMAM G0 και G2 και προϋβριδοποίηση

Και στην περίπτωση της προϋβριδοποίησης δεν παρατηρείται σαφής τάση μεταβολής του φθορισμού, συνεπώς της συγκέντρωσης του απταμερούς ή του συμπληρωματικού κλώνου στην επιφάνεια.

Στη συνέχεια, τα παραπάνω δεδομένα ανακατανέμονται με σκοπό να προκύψει νέο διάγραμμα ξεχωριστά για κάθε γενιά PAMAM για σύγκριση μεταξύ διαδοχικής υβριδοποίησης και προϋβριδοποίησης. Παρακάτω παρουσιάζονται διαγράμματα μόνο για το φθορισμό του απταμερούς, καθώς το σήμα φθορισμού του συμπληρωματικού κλώνου είναι φανερά χαμηλότερο, στις περισσότερες περιπτώσεις της προϋβριδοποίησης. Ωστόσο, από τα διαγράμματα φθορισμού του απταμερούς που ακολουθούν, προκύπτει ότι το σήμα φθορισμού, επομένως η συγκέντρωση του απταμερούς στην επιφάνεια, είναι υψηλότερο για την προϋβριδοποίηση, αντίθετα από τις ενδείξεις του συμπληρωματικού κλώνου.

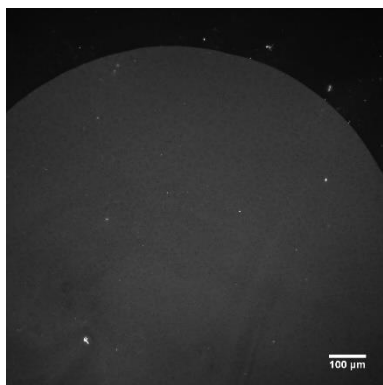


Σχήμα 14. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Υ5) για PAMAM G0 και σύγκριση τρόπων υβριδοποίησης

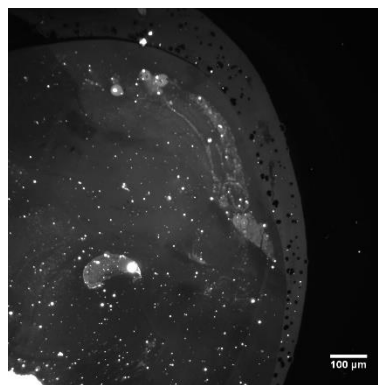


Σχήμα 15. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Υ5) για PAMAM G2 και σύγκριση τρόπων υβριδοποίησης

Από τα παραπάνω δεδομένα δεν επιβεβαιώνεται ότι το PAMAM G2 1% είναι το βέλτιστο. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θεωρούνται λιγότερο αξιόπιστα από τα προηγούμενα (προϋβριδοποίησης) λόγω σημαντικά μικρότερης ομοιομορφίας στις επιφάνειες, όπως φαίνεται από τις παρακάτω εικόνες. Για το λόγο αυτό, στα επόμενα πειράματα θεωρείται ως βέλτιστο το PAMAM G2 1%.



Εικόνα 16. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού με PAMAM G2 1% (Σχήματα 6 και 7)



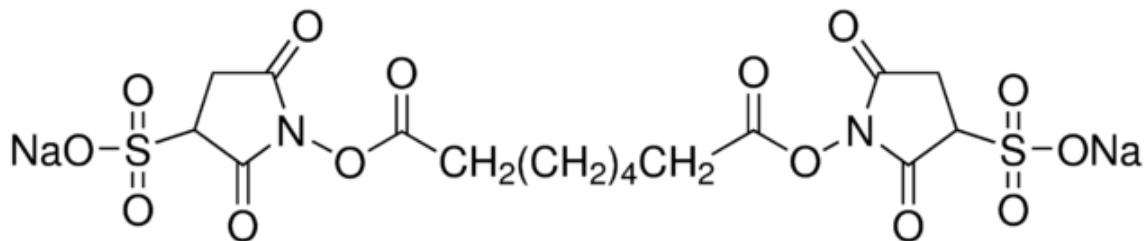
Εικόνα 17. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού με PAMAM G2 1% (Σχήματα 11, 13 και 15)

Παραλλαγές

Μέχρι στιγμής η κεντρική ιδέα των πειραμάτων ήταν ο έλεγχος της επίδρασης του υποστρώματος μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση και τη γενιά των δενδριμερών. Ωστόσο, η συγκέντρωση του αναλύτη που δύναται να δεσμευτεί δεν επηρεάζεται μόνο από το δενδριμερές (παρακάτω θα αντικατασταθούν από πολυσακχαρίτες για αντίστοιχα πειράματα) αλλά από όλα τα στάδια κατά τα οποία προστίθεται ένα νέο μόριο στην επιφάνεια. Έτσι σε αυτή την παράγραφο εξετάστηκε –όχι ενδελεχώς– το κατά πόσο μπορεί να επηρεάζει τη διαδικασία κάποιο ενδιάμεσο μόριο μεταξύ του δενδριμερούς και του αναλύτη. Σημειώνεται ότι σε κάθε περίπτωση η σύγκριση έγινε μόνο στις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τα πειράματα με PAMAM, δηλαδή σύγκριση με PAMAM G2 1% και προϋβριδοποίηση.

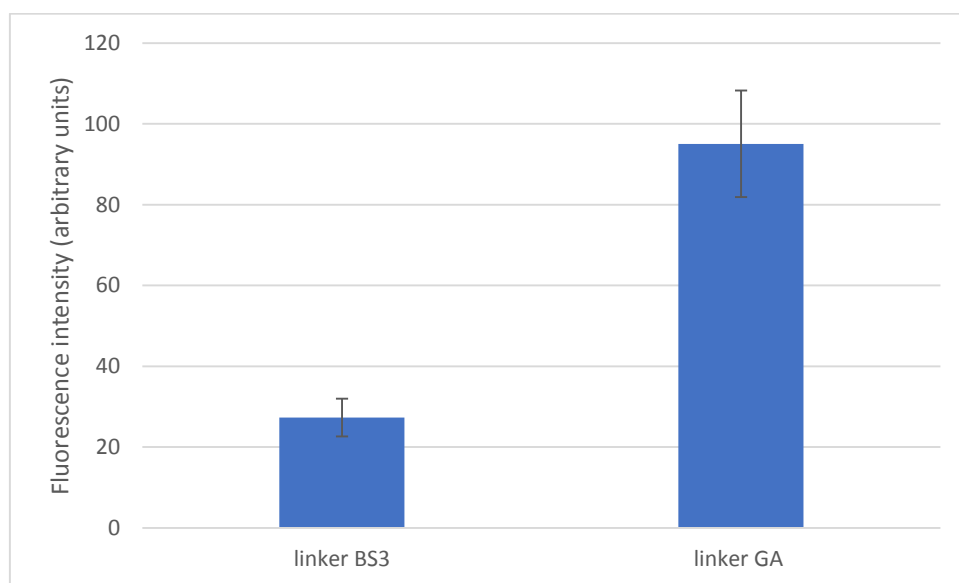
Παραλλαγή 1

Ο συνδέτης που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα πειράματα, αλλά και στην πλειονότητα των αναφορών της βιβλιογραφίας, είναι η γλουτεραλδεΐδη, η οποία είναι ένα μικρού μήκους μόριο με απλή γραμμική μορφή. Η γλουτεραλδεΐδη αντικαταστάθηκε από έναν άλλο συνδέτη, με σημαντικά πιο περίπλοκη μορφή, που καταλαμβάνει αξιόλογο όγκο στο χώρο. Αυτό θα συνεπάγεται και μεγαλύτερη στερεοχημική παρεμπόδιση, εφόσον τα μόρια του δενδριμερούς ή/και του σιλανίου δεν είναι σημαντικά αραιά προσδεμένα στην επιφάνεια. Ο συνδέτης που επιλέχθηκε ήταν το suberic acid bis(3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester) sodium salt, ή σε συντομογραφία BS3.



Εικόνα 18. Χημικός τύπος BS3

Για τη διαδικασία προσθήκης του συγκεκριμένου μορίου στο δενδριμερές ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο πρόσδεσης για συνδέτες με την ίδια δραστική ομάδα και στα δύο άκρα (homobifunctional crosslinkers) της Proteochem. [109] Το BS3 διαλυτοποιήθηκε σε νερό [110] και προστέθηκε στην επιφάνεια μετά την πρόσδεση του PAMAM, όπου αφέθηκε να αντιδράσει για 1h σε συγκέντρωση 2,5% και σε θερμοκρασία δωματίου (για λόγους άμεσης σύγκρισης με τη γλουτεραλδεΐδη). Κατόπιν, μετά την έκπλυση του συνδέτη που δεν αντέδρασε, έγινε η προσθήκη του προϋβριδοποιημένου απταμερούς σε συγκεντρώσεις 50μM – 1μM κατά τη συνήθη διαδικασία και οι επιφάνειες εξετάστηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού. Το φίλτρο δε μεταβλήθηκε (Y5), αλλά ούτε και ο χρόνος έκθεσης (3 sec) για λόγους άμεσης σύγκρισης. Τα ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα φαίνονται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 16. Σήμα φθορισμού απταμερούς (φίλτρο Y5) για διαφορετικούς συνδέτες

Όπως ήταν αναμενόμενο, στην περίπτωση του BS3 το σήμα φθορισμού είναι χαμηλότερο. Είναι λογικό ένας ογκωδέστερος συνδέτης (υποκαταστάτης της γλουτεραλδεϋδης) να μπορεί να δεσμεύσει λιγότερα μόρια στις δραστικές του θέσεις λόγω παρεμποδίσεων μεταξύ των μορίων στο χώρο.

Παραλλαγή 2

Στη δεύτερη παραλλαγή αντικαταστάθηκε το ίδιο το απταμερές, μεταβάλλοντας το πλήθος των βάσεων στην αλληλουχία της αλυσίδας, δηλαδή το μήκος του. Το απταμερές που είχε χρησιμοποιηθεί σε όλα τα προηγούμενα πειράματα είχε μήκος 36 βάσεων. Για τις ανάγκες αυτού του πειράματος δημιουργήθηκαν ένα μικρότερου μήκους απταμερές 21 βάσεων και ένα μεγαλύτερου μήκους απταμερές 98 βάσεων. Ωστόσο, σημειώνεται ότι τα απταμερή αυτά δε φέρουν φθορίζουσα ομάδα, επομένως η σύγκριση έγινε μόνο έμμεσα, μέσω του φθορισμού του συμπληρωματικού κλώνου (TexasRed). Επιπλέον, το πείραμα πραγματοποιήθηκε τόσο σε συνθήκες διαδοχικής υβριδοποίησης, όσο και σε συνθήκες προϋβριδοποίησης. Όμως, σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε κοινό «υπόστρωμα» με PAMAM G2 1%.

Οι αλληλουχίες των καινούριων απταμερών και των αντίστοιχων συμπληρωματικών αλυσίδων είναι:

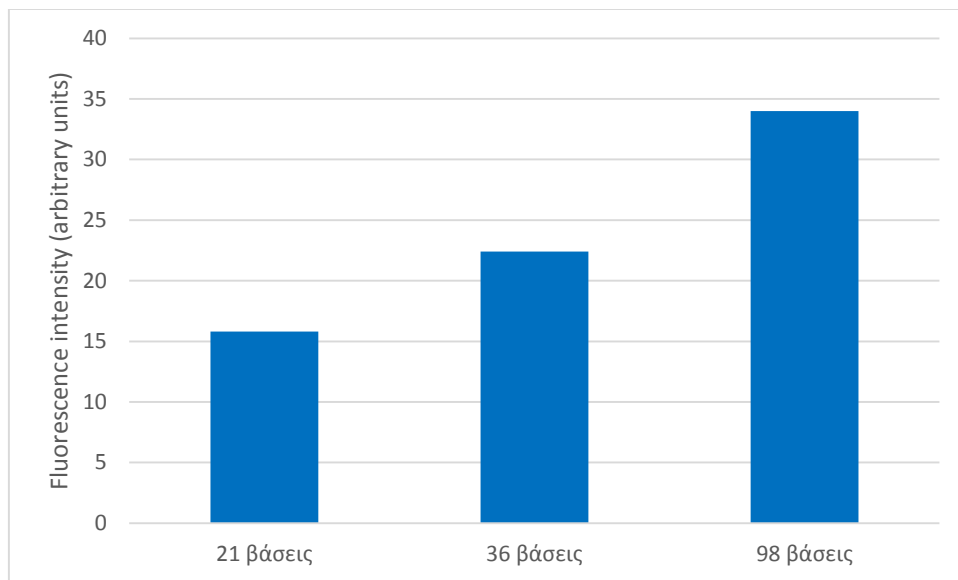
Απταμερές μικρότερου μήκους: 5' – ACTGCTAGAGATTTTCCACAT [Am C3] – 3'

Συμπληρωματικός κλώνος: 5' – TCTCTAGCT [TxRd] – 3'

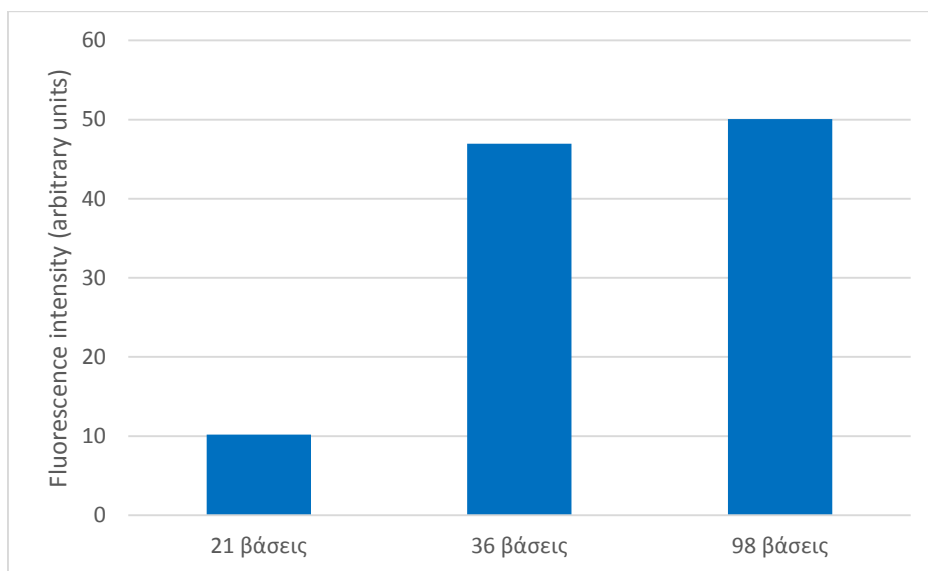
Απταμερές μεγαλύτερου μήκους: 5' – GGG AGG ACG AAG CGG AAC GTA TGG TAT ATG AGG CTC GAT CAG GGA ATG AAC ATA GAG TAA GAA GGG TTA GCG TCG GGT CTC AGA AGA CAC GCC CGA CA [Am C7] – 3'

Συμπληρωματικός κλώνος: 5' – GATCGAGCCTCATT [TxRd] – 3'

Σκοπός ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του ίδιου του απταμερούς στη διαδικασία δέσμευσης της τοξίνης (στην προκειμένη περίπτωση του συμπληρωματικού κλώνου). Αναμένεται μεγαλύτερο μήκος απταμερούς να δεσμεύει το μόριο σε μεγαλύτερη απόσταση από την επιφάνεια, με αποτέλεσμα μικρότερες στερεοχημικές παρεμποδίσεις, κάτι το οποίο εκφράζεται με αυξημένο σήμα φθορισμού. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Σχήμα 17. Σήμα φθορισμού συμπληρωματικού κλώνου (φίλτρο N3) για διαφορετικά μήκη απταμερών και προϋβριδοποίηση



Σχήμα 18. Σήμα φθορισμού συμπληρωματικού κλώνου (φίλτρο N3) για διαφορετικά μήκη απταμερών και διαδοχική υβριδοποίηση

Όπως είναι φανερό από τα διαγράμματα, η τάση είναι αυξητική για μεγαλύτερο μήκος απταμερούς, όπως ήταν αναμενόμενο. Μάλιστα, η τάση αυτή σημειώνεται και για τις δύο περιπτώσεις υβριδοποίησης (διαδοχική υβριδοποίηση και προϋβριδοποίηση). Σημειώνεται, τέλος, ότι οι χρόνοι έκθεσης διέφεραν στις δύο περιπτώσεις. Στην περίπτωση της προϋβριδοποίησης, χρόνος έκθεσης 3 sec έδωσε καλά αποτελέσματα,

κάτι το οποίο δε συνέβη στην περίπτωση της διαδοχικής υβριδοποίησης. Εκεί το σήμα ήταν εξαιρετικά έντονο με αποτέλεσμα να αλλοιώνει τις εικόνες. Συνεπώς, οι εικόνες λήφθηκαν με χρόνο έκθεσης 1 sec στη διαδοχική υβριδοποίηση και ποσοτικοποιήθηκαν κατά τα γνωστά.

Συμπεράσματα

Οι δοκιμές με χρωστικές δεν κατέληξαν σε αξιόπιστα και παρουσιάσιμα αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε εξασθενημένο σήμα των χρωστικών, μπορεί όμως να αποδοθεί και σε ελάχιστη πρόσδεση λόγω παρεμποδίσεων, δεδομένου ότι τα μόρια και των δύο χρωστικών είναι αρκετά ογκώδη και περιλαμβάνουν δακτυλίους και πλήθος ατόμων. Εάν επομένως λίγα μόρια κατόρθωσαν να προσδεθούν στην επιφάνεια, είναι λογικό επακόλουθο το σήμα φθορισμού να είναι ασθενές. Αντίθετα, τα φθορίζοντα βιομόρια παρείχαν πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Βασικό συμπέρασμα πάντως των πειραμάτων με τη φθορίζουσα ουσία FITC είναι ότι το DMSO χρησιμεύει στη διαλυτοποίηση της ουσίας και το υδατικό διάλυμα βορικού οξέος συνεισφέρει στην πρόσδεση στην επιφάνεια.

Στην προϋβριδοποίηση με PAMAM προέκυψε ως βέλτιστη γενιά η G2 και βέλτιστη συγκέντρωση το 1%. Στη διαδοχική υβριδοποίηση, δεν παρατηρήθηκε σαφής τάση μεταβολής του σήματος φθορισμού, ούτε υπήρξαν ξεκάθαρα δεδομένα για το βέλτιστο συνδυασμό γενιάς και συγκέντρωσης. Το γενικό συμπέρασμα είναι το άκρο ακινητοποίησης του απταμερούς στην επιφάνεια επηρεάζει σημαντικά τη δομή και τις αναδιπλώσεις του στο χώρο, και κατά συνέπεια, την πρόσδεση της συμπληρωματικής αλληλουχίας.

Πιστοποιήθηκε η αναγκαιότητα κάλυψης των ενεργών θέσεων που δεν αντέδρασαν αμέσως μετά την πρόσδεση του απταμερούς στη διαδοχική υβριδοποίηση.

Επίσης, προέκυψε ότι ο βέλτιστος συνδυασμός συγκεντρώσεων απταμερούς – συμπληρωματικού κλώνου είναι 50μM – 1μM για την επίτευξη της μέγιστης πρόσδεσης.

Από το πείραμα αντικατάστασης του συνδέτη εξάγεται το συμπέρασμα ότι ογκώδη μόρια προκαλούν σημαντικές στερεοχημικές παρεμποδίσεις μειώνοντας δραματικά τη συγκέντρωση του απταμερούς που προσδέεται.

Τέλος, μεγαλύτερο μήκος απταμερούς μειώνει τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις με πιθανή δυνατότητα αύξησης της ποσότητας της τοξίνης που μπορεί να δεσμευτεί, και μάλιστα ανεξάρτητα από τον τρόπο υβριδοποίησης.

Ενότητα 4

Πολυσακχαρίτες

Εισαγωγή

Εκτός από τη χρήση δενδριμερών για την αύξηση του αριθμού των δραστικών ομάδων, έχει αναφερθεί η ακινητοποίηση πολυσακχαριτών σε επιφάνειες με χημικό τρόπο για τον ίδιο σκοπό. [111] [112] [113] [114] Επίσης, έχει αναφερθεί η ακινητοποίηση πολυσακχαριτών και με διαφορετικούς τρόπους, όπως με φωτο-ακινητοποίηση (photo-immobilization), που όμως απομακρύνονται από το θέμα της παρούσας εργασίας. [115] Οι μονοσακχαρίτες κατά τον πολυμερισμό τους διαμορφώνουν τα λεγόμενα δίκτυα πολυσακχαριτών, τα οποία είναι τριδιάστατες δομές στο χώρο με επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες και πλήθος ενεργών κέντρων, δεδομένου ότι κάθε μονομερές δεσμεύει δραστικές ομάδες για την πρόσδεση του με άλλα μονομερή αλλά ταυτόχρονα «αφήνει» και κάποιες δραστικές ομάδες διαθέσιμες για διαφορετικές αντιδράσεις.

Διεξαγωγή πειραμάτων – Αποτελέσματα

Χιτοζάνη

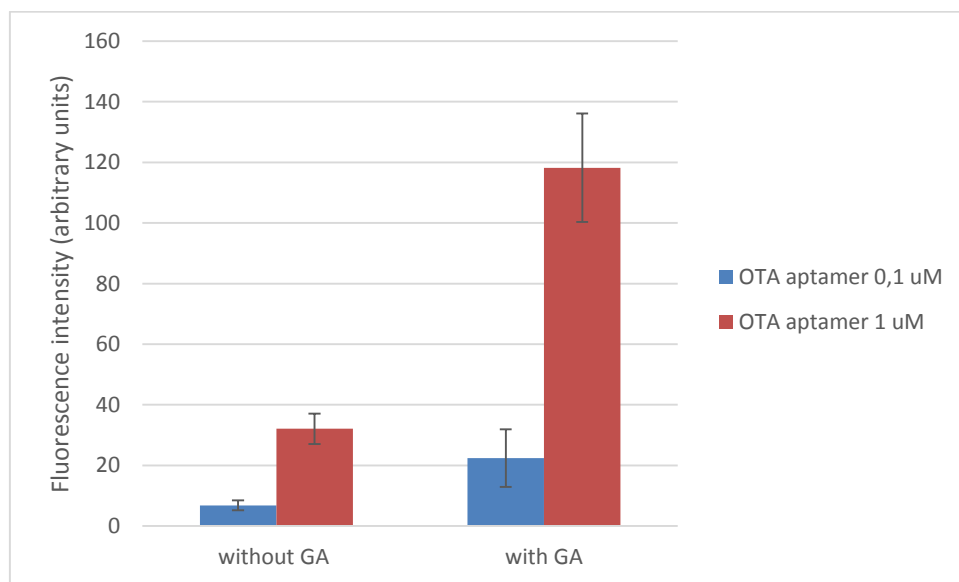
Η χιτοζάνη είναι διαθέσιμη σε στερεά κατάσταση, συνεπώς απαιτείται διαλυτοποίηση για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό των πειραμάτων της παρούσας εργασίας. Η χιτοζάνη διαλυτοποιήθηκε σε αραιό οξικό οξύ, σύμφωνα με το φύλλο ταυτότητας της ουσίας [116] και σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές. [117] [118] Χρησιμοποιήθηκε 1 g χιτοζάνης και οξικό οξύ συγκέντρωσης 0,2M. Η διαλυτοποίηση έγινε σε θερμοκρασία 60 °C υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση για μερικές ώρες. Όταν η αδιάλυτη ποσότητα σταμάτησε να μεταβάλλεται, το διάλυμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, ώστε να παραληφθεί διαυγές διάλυμα οξικού οξέος-χιτοζάνης. Θεωρείται ότι η τελική περιεκτικότητα του διαλύματος σε χιτοζάνη είναι 0,5% w/v.

Από τη σειρά πειραμάτων της ωχρατοξίνης A, προέκυψε ότι η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε για PAMAM γενιάς 2 και συγκέντρωσης 1% (στην προϋβριδοποίηση). Αντικαθιστώντας το PAMAM με χιτοζάνη, τα πειράματα επαναλήφθηκαν με σκοπό να γίνει άμεση σύγκριση των δύο ως προς τη συγκέντρωση του απταμερούς που μπορούν να δεσμεύσουν.

Επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου κατεργασμένες με NaOH 1M και σιλανιοποιημένες κατά τη συνήθη διαδικασία, καλύφθηκαν με επαρκή ποσότητα διαλύματος χιτοζάνης-οξικού οξέος, όπως παρασκευάστηκε (0,5 w/v σε οξικό οξύ 0,2M), και η αντίδραση αφέθηκε να πραγματοποιηθεί για τουλάχιστον 12 ώρες σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας και θερμοκρασία 2-8 °C. Στη συνέχεια, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με ddH₂O. Στη μία επιφάνεια έγινε προσθήκη γλουτεραλδεΐδης 2,5% για 1h και κατόπιν η επιφάνεια εκπλύθηκε με ddH₂O. [111] [119] Στο επόμενο στάδιο, προστέθηκε στις επιφάνειες, με και χωρίς γλουτεραλδεΐδη, το απταμερές της ωχρατοξίνης A με φθορίζουσα ομάδα Cyanine5 (Cy5) σε συγκεντρώσεις 0,1μM και 1μM.

Η πρόσδεση αφέθηκε να πραγματοποιηθεί για τουλάχιστον 12 ώρες σε υγρό περιβάλλον. Την επόμενη ημέρα, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με διάλυμα αλάτων (wash buffer) και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Λήφθηκαν εικόνες με χρόνο έκθεσης 3 sec και φίλτρο Y5. Στη συνέχεια, το σήμα φθορισμού της ουσίας Cyanine5 ποσοτικοποιήθηκε μέσω του λογισμικού imagej και προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα.

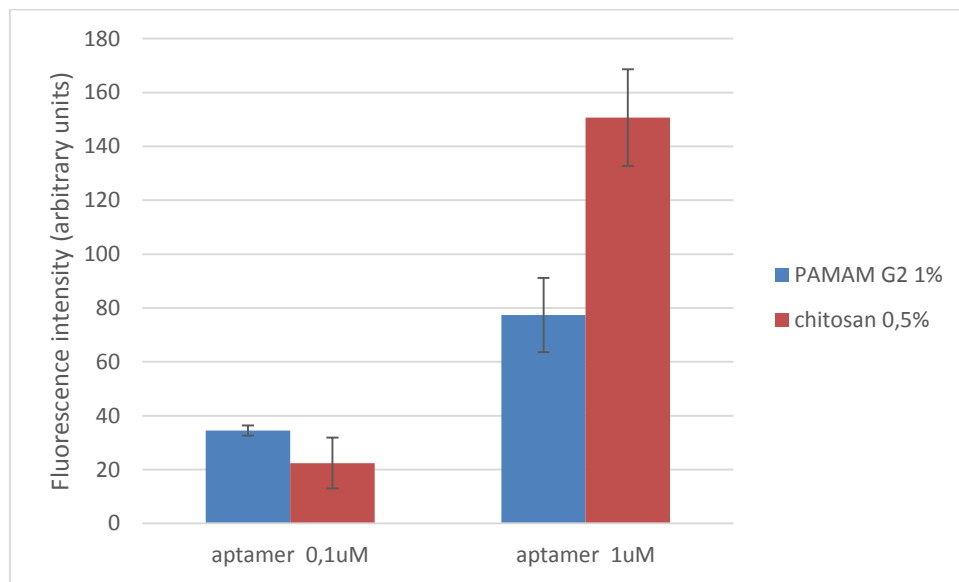


Σχήμα 19. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς OTA σε επιφάνειες τροποποιημένες με διάλυμα χιτοζάνης, με και χωρίς συνδέτη (γλουτεραλδεΐδη)

Και για τις δύο συγκεντρώσεις απταμερούς, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο σήμα φθορισμού στην περίπτωση που προστέθηκε η γλουτεραλδεΐδη ως συνδέτης. Πιστοποιείται επομένως η αναγκαιότητα χρήσης του συνδέτη αυτού. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερο σήμα στην περίπτωση της συγκέντρωσης 1μM απταμερούς σε σύγκριση με τη συγκέντρωση 0,1μM.

Σημειώνεται ακόμα ότι δοκιμάστηκε και προσθήκη γλουτεραλδεΐδης στο διάλυμα της χιτοζάνης (εκτός επιφάνειας) στις ίδιες συγκεντρώσεις και συνθήκες, με σκοπό να καλυφθεί στη συνέχεια η επιφάνεια με την ήδη τροποποιημένη χιτοζάνη και να γίνει σύγκριση και με αυτή τη σειρά της πειραματικής διαδικασίας. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της μίας ώρας που διεξαγόταν η αντίδραση, οι αμινομάδες της χιτοζάνης, πλήρως ελεύθερες στο διάλυμα, αντέδρασαν με τη γλουτεραλδεΐδη σε τέτοιο βαθμό, ώστε παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ιξώδους του διαλύματος λόγω του πλήθους των δεσμών που δημιουργήθηκαν (crosslinking), με αποτέλεσμα να μην είναι πλέον δυνατή η συνέχεια του πειράματος.

Κατόπιν, ήταν εφικτή η σύγκριση του δενδριμερούς PAMAM με τη χιτοζάνη ως προς τη συγκέντρωση του απταμερούς που μπορούν να δεσμεύσουν. Η σύγκριση παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα. Οι πειραματικές συνθήκες διατηρήθηκαν κατά το δυνατόν ίδιες.

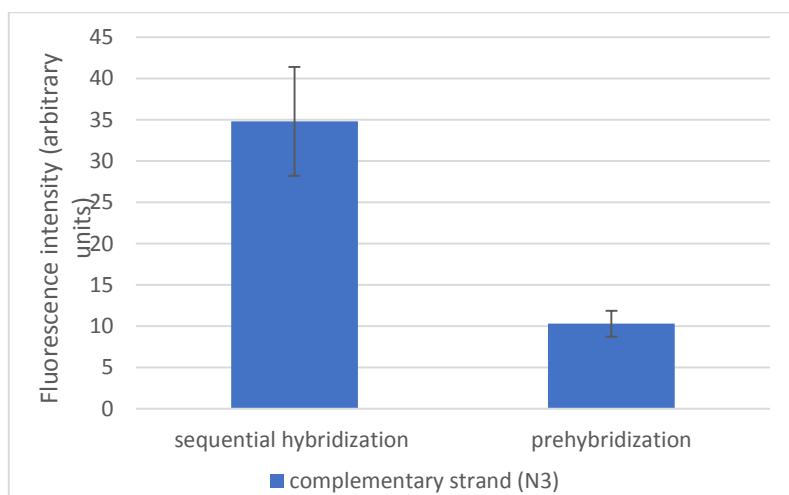


Σχήμα 20. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς προσδεμένου σε PAMAM και χιτοζάνη

Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει σαφής τάση υπεροχής του δενδριμερούς ή του πολυσακχαρίτη, αλλά η δυνατότητα πρόσδεσης του απταμερούς εξαρτάται άμεσα από

τη συγκέντρωσή του. Για χαμηλότερη συγκέντρωση απταμερούς (0,1μM), στο PAMAM προσδένεται μεγαλύτερη ποσότητα απταμερούς, όπως υπονοεί το ισχυρότερο σήμα φθορισμού. Αντίθετα, για συγκέντρωση απταμερούς μεγαλύτερη (1μM), η χιτοζάνη δίνει σημαντικά διαφορετικά αποτελέσματα συγκρατώντας περισσότερο απταμερές στην επιφάνεια.

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε υβριδοποίηση του απταμερούς με συμπληρωματική αλληλουχία. Η συγκέντρωση του απταμερούς επιλέχθηκε να είναι 50μM, ώστε να διασφαλιστεί η μέγιστη πρόσδεση απταμερούς στην επιφάνεια λόγω κορεσμού. Η συγκέντρωση του συμπληρωματικού κλώνου ήταν 1μM. Έγιναν δοκιμές προϋβριδοποίησης και διαδοχικής υβριδοποίησης, σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία, για σύγκριση των δύο μεθόδων. Ο συμπληρωματικός κλώνος έφερε τη φθορίζουσα ομάδα TexasRed, η οποία ανιχνεύεται στο μικροσκόπιο φθορισμού με το φίλτρο Red-N3. Ο χρόνος έκθεσης ήταν 1 sec, καθώς το σήμα ήταν αρκετά ισχυρό για να προκύψουν «μετρήσιμα» και παρουσιάσιμα αποτελέσματα σε χρόνο έκθεσης 3 sec.



Σχήμα 21. Σύγκριση διαδοχικής υβριδοποίησης και προϋβριδοποίησης για επιφάνεια τροποποιημένη με χιτοζάνη – φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου

Από το παραπάνω γράφημα προκύπτει ότι το ισχυρότερο σήμα φθορισμού προήλθε από τη διαδοχική υβριδοποίηση, παρά το μεγαλύτερο περιθώριο αβεβαιότητας της τιμής. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στις στερεοχημικές παρεμποδίσεις που είναι ισχυρότερες στην περίπτωση απόπειρας πρόσδεσης στην επιφάνεια ενός δίκλωνου, αντί ενός μονόκλωνου, μορίου.

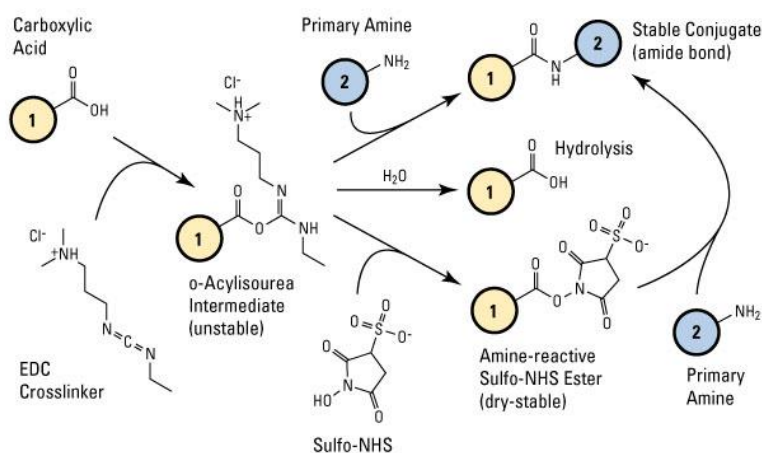
Σημειώνεται ακόμα ότι λήφθηκαν εικόνες με το φθορισμό του απταμερούς (Cyanine 5), οι οποίες δεν ήταν δυνατό να ποσοτικοποιηθούν καθώς το σήμα ήταν εξαιρετικά ισχυρό.

Υαλουρονικό οξύ

Αντίστοιχη πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε για έναν ακόμα πολυσακχαρίτη, το υαλουρονικό οξύ. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων προηγήθηκε η διαλυτοποίηση του υαλουρονικού οξέος σε νερό μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0,3% w/v. [120] Σημειώνεται ότι αυτή η συγκέντρωση είναι στην ίδια τάξη μεγέθους με τη συγκέντρωση της διαλυτοποιημένης χιτοζάνης (0,5% w/v), γεγονός που επιτρέπει τη σύγκριση μεταξύ των δύο πολυσακχαριτών.

Κατ' απόλυτη αντιστοιχία, σε επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου κατεργασμένες με υδατικό διάλυμα NaOH 1M και σιλανιοποιημένες προστέθηκε ποσότητα διαλυτοποιημένου υαλουρονικού οξέος 0,3% w/v καλύπτοντας την επιφάνεια για τουλάχιστον 12 ώρες σε υγρό περιβάλλον και θερμοκρασία 2-8 °C. Ακολούθησε έκπλυση με ddH₂O. Κατόπιν, αντί για γλουτεραλδεΐδη, έγινε τροποποίηση με EDC-NHS, ώστε να αξιοποιηθούν οι διαθέσιμες ομάδες καρβοξυλίου που διαθέτει. Για την τροποποίηση με EDC-NHS, ακολουθήθηκαν πρωτόκολλα της βιβλιογραφίας. [121] [122] [123]

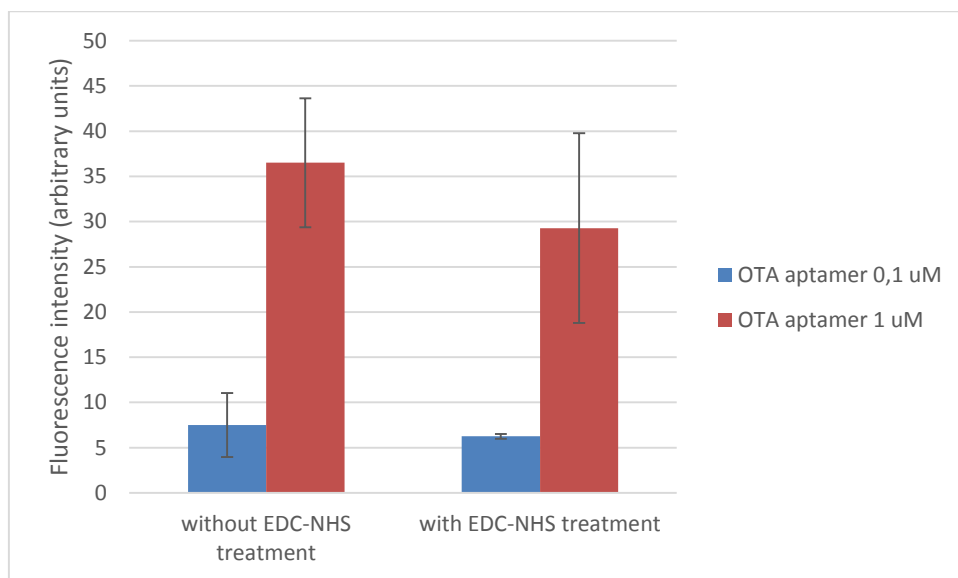
Σε επιφάνειες τροποποιημένες με υαλουρονικό οξύ, έγινε ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων με διάλυμα 0,1M MES (2-morpholino-ethanesulfonic acid) (pH=4,5), το οποίο περιείχε 0,4M EDC (1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)-carbodiimide hydrochloride) και 0,1M NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) σε ίσους όγκους για 15 min. Ακολούθησε έκπλυση με ddH₂O και, κατόπιν, έγινε προσθήκη διαλύματος PBS για 30 min.



Εικόνα 19. Πρωτόκολλο σύζευξης EDC-NHS

Στη συνέχεια, σε επιφάνειες με και χωρίς τροποποίηση με EDC-NHS προστέθηκε απταμερές της ωχρατοξίνης A σε συγκεντρώσεις 0,1μM και 1μM. Το απταμερές έφερε

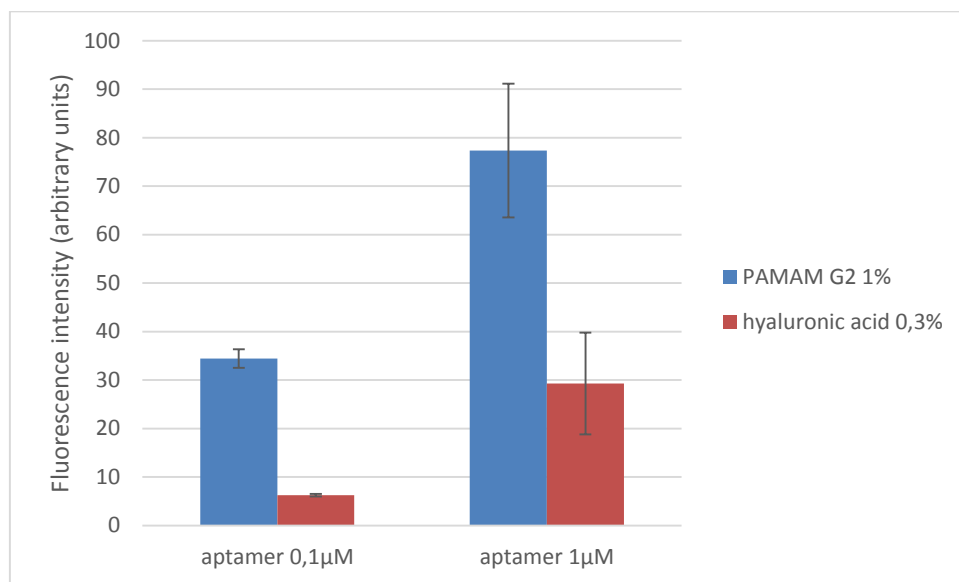
αμίνη στο ένα άκρο της αλυσίδας (5') για πρόσδεση στην επιφάνεια και τη φθορίζουσα ομάδα Cyanine5 (Cy5) στο ελεύθερο άκρο (3') για την ανίχνευσή του με φθορισμό. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για τουλάχιστον 12 ώρες σε υγρό περιβάλλον και θερμοκρασία 2-8 °C. Ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα αλάτων και παρατήρηση με μικροσκόπιο φθορισμού με χρήση φίλτρου Y5 και χρόνο έκθεσης 3 sec. Με χρήση του λογισμικού imagej, προέκυψε το παρακάτω συγκριτικό σχήμα.



Σχήμα 22. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς OTA σε επιφάνειες τροποποιημένες με διάλυμα υαλουρονικού οξέος, με και χωρίς τροποποίηση σύζευξης (crosslinking)

Από τα ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα προκύπτει ότι, ανεξάρτητα από τη διαδικασία τροποποίησης της επιφάνειας, συγκέντρωση απταμερούς 0,1μM αποδεικνύεται ανεπαρκής για να καλύψει τις διαθέσιμες θέσεις. Μεγαλύτερη συγκέντρωση απταμερούς παρουσίασε μεγαλύτερο σήμα φθορισμού, συνεπώς υπήρχε περιθώριο για πρόσδεση περισσότερων μορίων απταμερούς. Όσον αφορά στην αναγκαιότητα κατεργασίας με EDC-NHS, δε φαίνεται ότι προσφέρει ιδιαίτερα, αλλά το σήμα φθορισμού στην εφαρμογή ή μη της συγκεκριμένης κατεργασίας θεωρείται περίπου ίσο, λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο περιθώριο σφάλματος που είχε η μέτρηση.

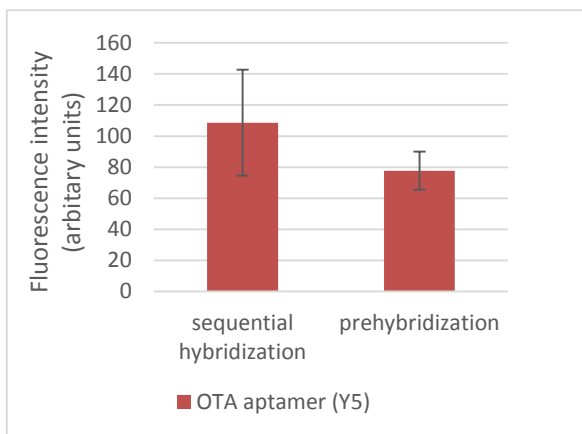
Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του δενδριμερούς PAMAM με το υαλουρονικό οξύ ως προς τη συγκέντρωση του απταμερούς που μπορούν να δεσμεύσουν. Χρησιμοποιήθηκε φίλτρο Y5 και χρόνος έκθεσης 3 sec. Σημειώνεται, ακόμα, ότι στην επιφάνεια με υαλουρονικό οξύ ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο τροποποίησης με EDC-NHS λόγω των βιβλιογραφικών αναφορών. Η σύγκριση παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα.



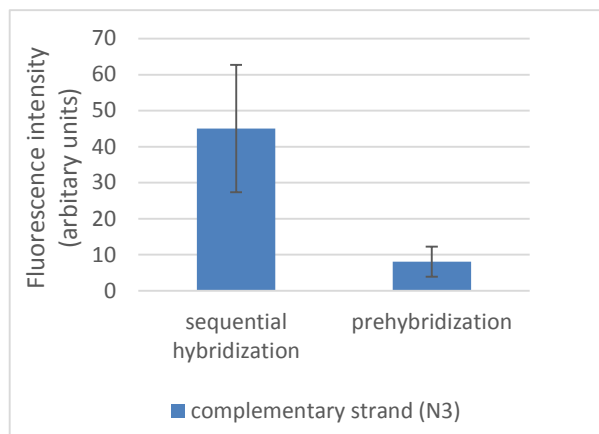
Σχήμα 23. Σύγκριση σήματος φθορισμού απταμερούς προσδεμένου σε PAMAM και υαλουρονικό οξύ

Από το παραπάνω σχήμα, παρατηρείται ότι το PAMAM έχει τη δυνατότητα δέσμευσης μεγαλύτερης ποσότητας απταμερούς, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, σε σύγκριση με το υαλουρονικό οξύ.

Στη συνέχεια, ακολουθώντας αντίστοιχη λογική με τη χιτοζάνη, δοκιμάστηκε υβριδοποίηση του απταμερούς με συμπληρωματική αλληλουχία. Η συγκέντρωση του απταμερούς επιλέχθηκε να είναι 50μM, ώστε να διασφαλιστεί η μέγιστη πρόσδεση απταμερούς στην επιφάνεια λόγω κορεσμού. Η συγκέντρωση του συμπληρωματικού κλώνου ήταν 1μM. Έγιναν δοκιμές προϋβριδοποίησης και διαδοχικής υβριδοποίησης για σύγκριση των δύο μεθόδων. Σε όλες τις επιφάνειες προηγήθηκε τροποποίηση με EDC-NHS. Ο συμπληρωματικός κλώνος έφερε τη φθορίζουσα ομάδα TexasRed, η οποία ανιχνεύεται στο μικροσκόπιο φθορισμού με το φίλτρο Red-N3. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε φθορίζον απταμερές με χρωστική Cy5, το οποίο ανιχνεύεται με φίλτρο Y5. Ο χρόνος έκθεσης ήταν σε κάθε περίπτωση 3 sec. Οι εικόνες που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού imagej.



Σχήμα 24. Σύγκριση διαδοχικής υβριδοποίησης και προϋβριδοποίησης για επιφάνεια τροποποιημένη με υαλουρονικό οξύ- φθορισμός απταμερούς



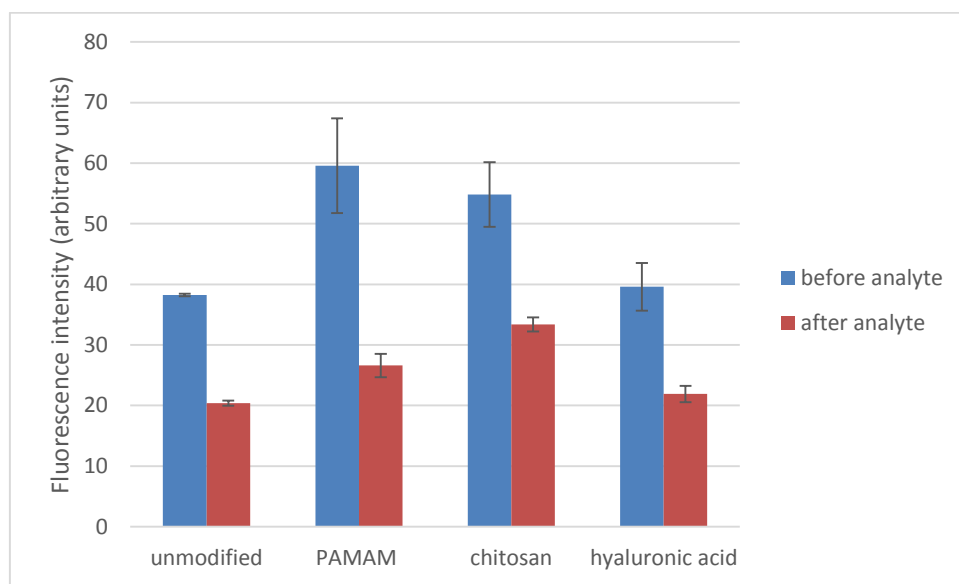
Σχήμα 25. Σύγκριση διαδοχικής υβριδοποίησης και προϋβριδοποίησης για επιφάνεια τροποποιημένη με υαλουρονικό οξύ- φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου

Γενικά, παρατηρείται ισχυρότερο σήμα στην περίπτωση της διαδοχικής υβριδοποίησης για επιφάνεια τροποποιημένη με υαλουρονικό οξύ στις δεδομένες συνθήκες.

Συνολική σύγκριση μεθόδων τροποποίησης – έλεγχος δέσμευσης αναλύτη OTA

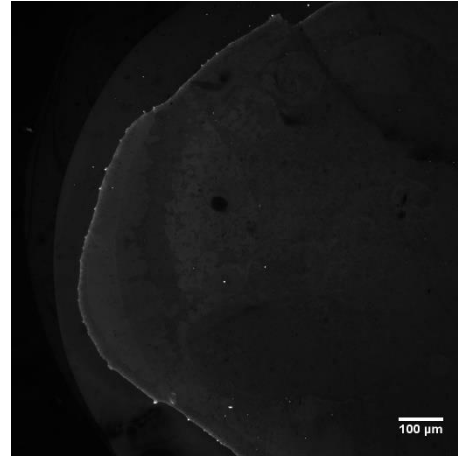
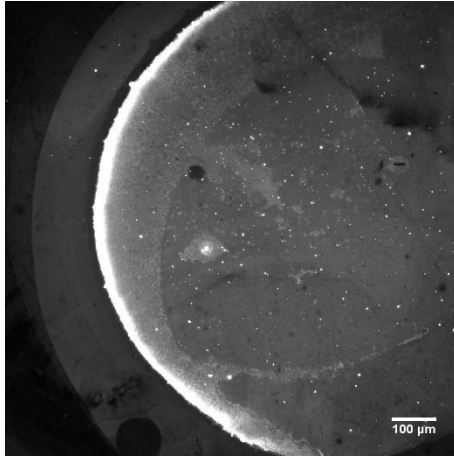
Στο σημείο αυτό γίνεται συνολική σύγκριση για τις βέλτιστες συνθήκες μεταξύ τροποποίησης με δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης, χιτοζάνη, υαλουρονικό οξύ και μη τροποποιημένες επιφάνειες. Η σύγκριση γίνεται με βάση τη διαφορά σήματος φθορισμού του συμπληρωματικού κλώνου (δηλαδή την απομάκρυνσή του) πριν και μετά την προσθήκη του αναλύτη (ωχρατοξίνη Α). Όσον αφορά στο είδος της υβριδοποίησης, η βέλτιστη μέθοδος σε καθεμία από τις περιπτώσεις που εξετάζονται βρέθηκε ότι ήταν η διαδοχική υβριδοποίηση, με εξαίρεση την περίπτωση του PAMAM, όπου ήταν η προϋβριδοποίηση. Η σύγκριση γίνεται μεταξύ των βέλτιστων περιπτώσεων συνολικά, επομένως παραβλέπεται ο διαφορετικός τρόπος υβριδοποίησης. Εξάλλου, στη διαδοχική υβριδοποίηση με PAMAM, προέκυψε σημαντικά υψηλό αποτέλεσμα για PAMAM G2 0,5%, το οποίο θα μπορούσε να θεωρηθεί βέλτιστο εάν η υπεροχή του ήταν σαφέστερη, ενώ δεν απέχει σημαντικά ως τάξη μεγέθους από το 1%. Σημειώνεται, τέλος, ότι το απταμερές που προστίθεται δε φέρει φθορίζουσα ομάδα.

Οι επιφάνειες τροποποιήθηκαν όπως στις προηγούμενες περιγραφές και σύμφωνα με τη διαδικασία από την οποία προέκυψαν τα καλύτερα αποτελέσματα για κάθε περίπτωση. Οι συγκεντρώσεις του απταμερούς και του συμπληρωματικού κλώνου ήταν 50μΜ και 1μΜ, αντίστοιχα. Η τοξίνη προστέθηκε σε συγκέντρωση 1g/L για χρόνο 40 min και στη συνέχεια εκπλύθηκε με νερό. Οι επιφάνειες παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο N3 και χρόνο έκθεσης 1 sec πριν και μετά την έκθεση στον αναλύτη. Από την επεξεργασία των εικόνων που λήφθηκαν, προέκυψε το ακόλουθο σχήμα.

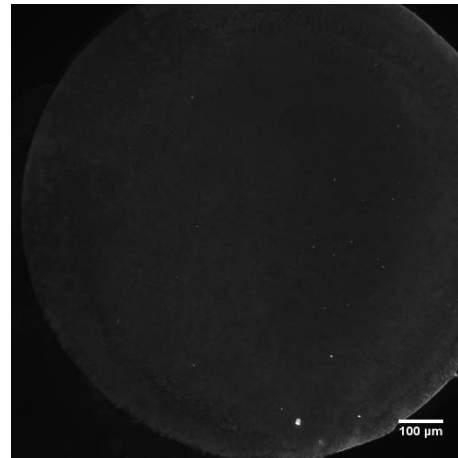
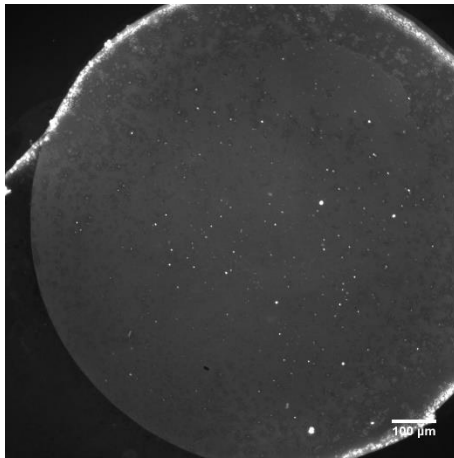


Σχήμα 26. Σήμα φθορισμού συμπληρωματικού κλώνου πριν και μετά την έκθεση στον αναλύτη (τοξίνη OTA)

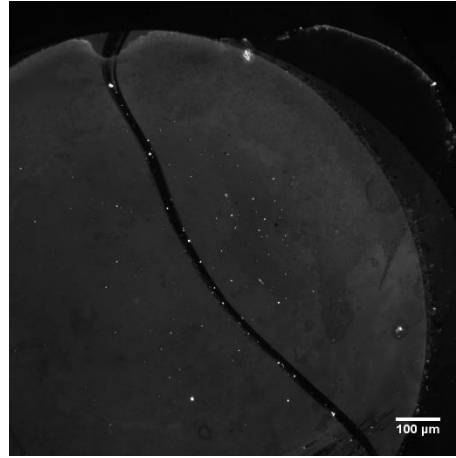
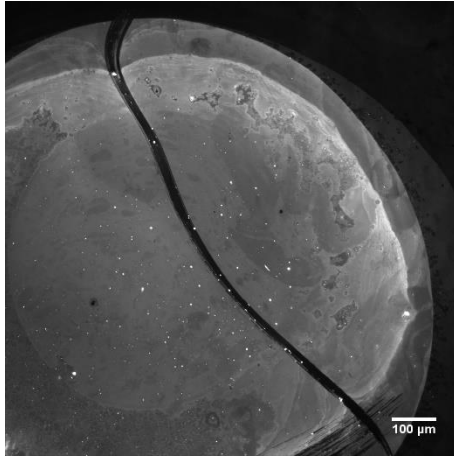
Παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει μείωση του σήματος, γεγονός που υποδηλώνει την απομάκρυνση του συμπληρωματικού κλώνου παρουσία της τοξίνης. Αυτό αποτελεί επιβεβαίωση ότι η διάταξη λειτουργεί σωστά. Η μεγαλύτερη ποσότητα δεσμευμένου συμπληρωματικού κλώνου (υψηλότερο σήμα πριν τον αναλύτη), αλλά και η μεγαλύτερη απομάκρυνση αυτού (διαφορά σήματος πριν και μετά τον αναλύτη) παρατηρείται στην περίπτωση του PAMAM. Οι εικόνες που ακολουθούν δείχνουν το φθορισμό του συμπληρωματικού κλώνου (φίλτρο N3) πριν και μετά την προσθήκη του αναλύτη (τοξίνη OTA).



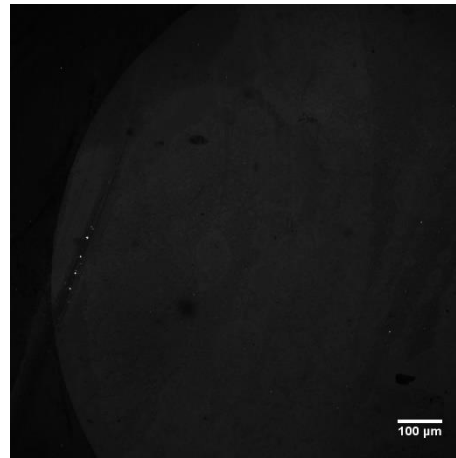
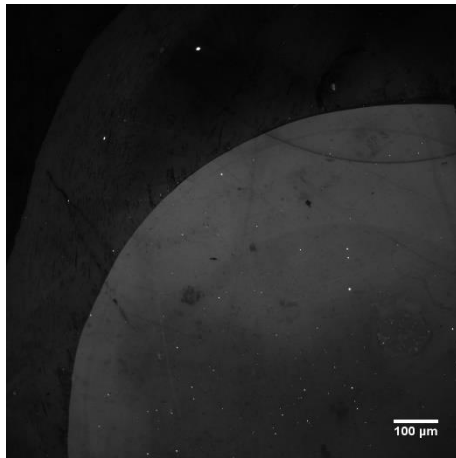
Εικόνα 20 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο απευθείας στο σιλάνιο



Εικόνα 21 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο σε PAMAM



Εικόνα 22 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο σε χιτοζάνη



Εικόνα 23 α και β. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού (φθορισμός συμπληρωματικού κλώνου) πριν και μετά την προσθήκη αναλύτη για απταμερές προσδεμένο σε υαλουρονικό οξύ

Επιπλέον, εκμεταλλευόμενοι τον αυτοφθορισμό της τοξίνης OTA λήφθηκαν εικόνες με φίλτρο DAPI A4 και μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης με σκοπό τον άμεσο εντοπισμό της ίδιας της τοξίνης. Δυστυχώς, δεν προέκυψαν εικόνες παρουσιάσιμες ή με δυνατότητα ποσοτικοποίησης για εξαγωγή κάποιου γραφήματος.

Συμπεράσματα

Στα συμπεράσματα της ενότητας των πολυσακχαριτών αναφέρεται ότι δεν υπάρχει σαφής τάση υπεροχής της χιτοζάνης ή του PAMAM, αλλά η δυνατότητα πρόσδεσης του απταμερούς εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωσή του καθενός. Όσον αφορά στο υαλουρονικό οξύ, εξάγεται το συμπέρασμα ότι συγκρατεί λιγότερο απταμερές σε σύγκριση με το PAMAM λόγω χαμηλότερου σήματος.

Ο βέλτιστος τρόπος υβριδοποίησης είναι η διαδοχική υβριδοποίηση και για τους δύο πολυσακχαρίτες που εξετάστηκαν.

Επίσης, αναφέρεται ότι για τη χιτοζάνη κρίθηκε αναγκαίο το στάδιο πρόσδεσης συνδέτη (γλουτεραλδεΐδη), σε αντίθεση με την κατεργασία με EDC-NHS για το υαλουρονικό οξύ.

Τέλος, όσον αφορά στη συνολική συμπεριφορά για τις βέλτιστες συνθήκες του καθένος, από το τελευταίο γράφημα προκύπτει ότι το PAMAM όχι μόνο παρουσιάζει την καλύτερη συμπεριφορά λόγω μέγιστου σήματος φθορισμού, αλλά και τη μέγιστη μείωση σήματος, η οποία ερμηνεύεται ως συμπληρωματικός κλώνος που απομακρύνθηκε παρουσία του αναλύτη. Είναι λογικό λοιπόν να υποτεθεί ότι το PAMAM στις δεδομένες συνθήκες κατόρθωσε να δεσμεύσει μεγαλύτερη ποσότητα τοξίνης.

III. Γενικά συμπεράσματα

Η επιθυμητή δομή σχηματίστηκε επιτυχώς στο υπόστρωμα νιτριδίου του πυριτίου, αλλά αυτό επιβεβαιώνεται μόνο έμμεσα μέσω των χημικών αντιδράσεων και των παρατηρήσεων στο τελικό στάδιο (πρόσδεση απταμερούς και/ή συμπληρωματικού κλώνου και παρατήρηση του φθορισμού). Στα ενδιάμεσα στάδια δεν ήταν δυνατή η μελέτη της επιφάνειας (στοιχειακή ανάλυση, μορφολογικές διαφορές, μελέτη σε επίπεδο μορίων) με άμεσο τρόπο και αδιάσειστα στοιχεία.

Τα δενδριμερή παρουσιάζουν πολύ καλή συμπεριφορά ως προς τη σταθερότητα, αλλά και την αποδοτικότητά τους στην πρόσδεση μεγάλου αριθμού βιομορίων.

Παρόλο που τα απταμερή έχουν τη δυνατότητα να προσδεθούν απευθείας επάνω στο σιλάνιο, η χρήση των δενδριμερών και των πολυσακχαριτών αυξάνει την ευαισθησία του αισθητήρα μέσω αύξησης των διαθέσιμων δραστικών θέσεων στην επιφάνεια.

Συνολικά, η διάταξη του βιοαισθητήρα φαίνεται να μπορεί να δεσμεύσει την τοξίνη για την οποία είναι σχεδιασμένη. Ωστόσο, και εδώ υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις και όχι αποδείξεις, ενώ δεν υπάρχει κανένα στοιχείο για το ποσοστό της τοξίνης που δεσμεύεται.

IV. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η εργασία αυτή «αγγίζει» ορισμένες παραμέτρους, όμως σίγουρα δεν εξαντλεί τα δεδομένα που μπορούν να αποκτηθούν και να οδηγήσουν σε βελτιστοποίηση της διάταξης.

Όσον αφορά στην αρχική μελέτη της τροποποίησης των επιφανειών, μπορούν να πραγματοποιηθούν περισσότερο εκτεταμένα πειράματα με διαφορετικούς χρόνους, συγκεντρώσεις και μέσα χημικής κατεργασίας. Περισσότερες συνθήκες θα μπορούσαν να δώσουν μία καλύτερη εικόνα για τη συμπεριφορά της επιφάνειας. Επίσης, πειράματα για τη μέτρηση της γωνίας επαφής (contact angle) θα μπορούσαν να διεξαχθούν για τη μελέτη της διαβροχής των επιφανειών μετά από κάθε κατεργασία.

Περαιτέρω έρευνα θα μπορούσε να γίνει στη μελέτη της επιφάνειας μετά την κατεργασία, ακόμα και μετά τη σιλανιοποίηση. Θα ήταν χρήσιμη μία στοιχειακή ανάλυση με τις κατάλληλες μεθόδους. Προτείνεται επομένως η μελέτη της επιφάνειας με XPS, ή ακόμα και με ελλειψομετρία. [124] Ακόμα, αν η σιλανιοποίηση γίνει σε ένα μέρος της επιφάνειας, θα μπορούσε ενδεχομένως να αξιοποιηθεί κάποια μέθοδος όπως η προφίλομετρηση ή η AFM προκειμένου να μετρηθεί το ύψος του σιλανίου.

Μία παράμετρος που ελέγχθηκε ελάχιστα στα πειράματα της παρούσας εργασίας, σε σημείο να μην έχει προκύψει σαφής τάση ή παρουσιάσιμα αποτελέσματα, είναι κατά πόσο επηρεάζει την απόδοση της διάταξης ο χρόνος που μεσολαβεί από τη σιλανιοποίηση μέχρι τη συμμετοχή της επιφάνειας σε επόμενες αντιδράσεις (παραδείγματος χάρη, προσθήκη PAMAM), καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσής της.

Μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να γίνουν με περισσότερες γενιές δενδριμερών, αλλά και μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων. Κατ' αντιστοιχία, θα μπορούσαν να εξεταστούν σε μεγαλύτερο βάθος οι πολυσακχαρίτες που αναφέρθηκαν, αλλά και επιπλέον μόρια πέραν αυτών.

Οι ελεύθερες αμινομάδες των δενδριμερών θα μπορούσαν να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση ηλιανθίνης (methyl orange). Οι αμινομάδες μεταβάλλουν το φορτίο τους με μεταβολή του pH και η ηλιανθίνη έχει τη δυνατότητα να τις αποκόπτει ώστε να μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με χρήση φασματοφωτόμετρου. [125] [126]

Μία ακόμη παράμετρος που επιδέχεται σημαντικές τροποποιήσεις είναι τα βιομόρια, δηλαδή τα απταμερή, στα οποία μπορεί να μεταβληθεί όχι μόνο η συγκέντρωσή τους, αλλά και η καθαυτή δομή τους (αλληλουχία βάσεων, είδος δραστικής ομάδας τροποποίησης για την ακινητοποίησή τους), όπως επίσης και το άκρο από το οποίο ακινητοποιούνται στην επιφάνεια.

Στη συνέχεια, απαιτείται οπωσδήποτε καλύτερη παραμετροποίηση των πειραμάτων με την τοξίνη. Σε επόμενο στάδιο, προτείνονται πειράματα με μικρότερο χρόνο έκθεσης στην τοξίνη (στην παρούσα μελέτη ο χρόνος είναι 40 λεπτά) και χαμηλότερη συγκέντρωση (1 g/L αποτελεί εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση για τοξίνη, ιδιαίτερα σε τρόφιμα). Επιπλέον, τόσο στην περίπτωση της αφλατοξίνης Β1, όσο και στην περίπτωση της ωχρατοξίνης Α, υπάρχουν ενδείξεις ότι μόρια της τοξίνης δεσμεύτηκαν από το εκάστοτε απταμερές, αλλά οι ενδείξεις αυτές είναι μόνο έμμεσες, ενώ δεν υπάρχει καμία ένδειξη για το ποσοστό της τοξίνης που δεσμεύτηκε. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για πραγματικές εφαρμογές, καθώς το ζητούμενο είναι, όχι απλώς η πιστοποίηση παρουσίας της τοξίνης στα τρόφιμα, αλλά και η ακριβής πληροφορία της συγκέντρωσής της. Προτείνεται συνεπώς περαιτέρω έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση. Ένα τελευταίο σημείο προς μελέτη που προτείνεται είναι η εκλεκτικότητα της ΟΤΑ, κατ' αντιστοιχία με τον έλεγχο εκλεκτικότητας της AFB1. Όπως είναι φυσικό, μετά από εκτεταμένη μελέτη των παραπάνω, προτείνεται ο έλεγχος της συμπεριφοράς του βιοαισθητήρα σε πραγματικές συνθήκες, δηλαδή σε τρόφιμα.

Τέλος, η μελέτη δε θα μπορούσε να είναι ολοκληρωμένη εάν δεν πραγματοποιηθεί οικονομική ανάλυση σε ερευνητικό επίπεδο και σε επίπεδο πραγματικής in-situ εφαρμογής.

V. Βιβλιογραφία

- [1] Commission of the European Communities, "The Rapid Alert System for Food and Feed 2011 Annual Report," 2012.
- [2] "Biosensors," *Nature*. .
- [3] Γ. Κόκκοτας, "Μελέτη θορύβου διατάξεων μικροηλεκτρονικών αισθητήρων," Πανεπιστήμιο Πατρών, 2010.
- [4] A. Mandal, "Biosensors," 2014. [Online]. Available: <http://www.news-medical.net/health/What-are-Biosensors.aspx>.
- [5] Agricultural University of Athens, "Βιοαισθητήρες." [Online]. Available: <http://www.aua.gr/gr/dep/bio/lab/enzym/HP18.htm>.
- [6] K. De Vos, I. Bartolozzi, E. Schacht, P. Bienstman, and R. Baets, "Silicon-on-Insulator microring resonator for sensitive and label-free biosensing," *Opt. Express*, vol. 15, no. 12, pp. 7610–7615, 2007.
- [7] Apollo Photonics, "APSS Apollo Application Note on Microring Resonator - Computer-Aided Design and Simulation." Ontario.
- [8] Boston University, "Microring resonator biosensors." [Online]. Available: <http://physics.bu.edu/research/description/16>.
- [9] A. Ksendzov and Y. Lin, "Integrated optics ring-resonator sensors for protein detection," *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 24, pp. 3344–3346, 2005.
- [10] W. Bogaerts *et al.*, "Silicon microring resonators," *Laser Photonics Rev.*, vol. 6, no. 1, pp. 47–73, 2012.
- [11] A. D. Ellington and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.," *Nature*, vol. 346, no. 6287, pp. 818–22, 1990.
- [12] X. Ma *et al.*, "Selection, identification, and application of Aflatoxin B1 aptamer," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 238, no. 6, pp. 919–925, 2014.
- [13] X. Ni, M. Castanares, A. Mukherjee, and S. E. Lupold, "Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 27, pp. 4206–4214, 2012.
- [14] Q. Zhao, X. Geng, and H. Wang, "Fluorescent sensing ochratoxin A with single fluorophore-labeled aptamer," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 19, pp. 6281–6286, 2013.
- [15] Food and Agriculture Organization of the United Nations, "Mycotoxins," *Food safety and quality*. [Online]. Available: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/en/>.

- [16] D. Bhatnagar, J. Yu, and K. C. Ehrlich, "Toxins of filamentous fungi," *Chem. Immunol.*, vol. 81, pp. 167–206, 2002.
- [17] S. Marin, A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, and V. Sanchis, "Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 60, pp. 218–237, 2013.
- [18] E. M. Binder, L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl, and J. Richard, "Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients," *Anim. Feed Sci. Technol.*, vol. 137, no. 3–4, pp. 265–282, 2007.
- [19] IARC, "Monographs of the evaluation of carcinogenic risk to human. Some traditional medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene," 2002.
- [20] "COMMISSION REGULATION (EC) No 165/2010 of 26 February 2010," 2010.
- [21] "COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006," 2006.
- [22] "Mycotoxins." [Online]. Available: http://www.mycotoxins.info/myco_info/consum_regu.html.
- [23] W. B. Shim, M. J. Kim, H. Mun, and M. G. Kim, "An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 62, pp. 288–294, 2014.
- [24] Y. Huang, S. Zhao, Z.-F. Chen, M. Shi, and H. Liang, "Amplified fluorescence polarization aptasensors based on structure-switching-triggered nanoparticles enhancement for bioassays," *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 48, no. 60, pp. 7480–2, 2012.
- [25] R. Lawley, "Ochratoxins," 2013. .
- [26] Food and Environmental Hygiene Department - Government of Hong Kong, "Ochratoxin A in food," 2006.
- [27] A. E. el Khoury and A. Atoui, "Ochratoxin A: General overview and actual molecular status," *Toxins (Basel)*, vol. 2, no. 4, pp. 461–493, 2010.
- [28] EFSA, "Opinion on the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related in Ochratoxin A in food," 2006.
- [29] V. Ostry, F. Malir, and J. Ruprich, "Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin," *Toxins (Basel)*, vol. 5, no. 9, pp. 1574–1586, 2013.
- [30] Directorate-General Health and Consumer Protection, "Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States," 2002.
- [31] "COMMISSION REGULATION (EC) No 1137/2015 of 13 July 2015," 2015.
- [32] A. De Girolamo, M. McKeague, J. D. Miller, M. C. Derosa, and A. Visconti, "Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-

- based solid phase extraction column," *Food Chem.*, vol. 127, no. 3, pp. 1378–1384, 2011.
- [33] J. Chen, Z. Fang, J. Liu, and L. Zeng, "A simple and rapid biosensor for ochratoxin A based on a structure-switching signaling aptamer," *Food Control*, vol. 25, no. 2, pp. 555–560, 2012.
- [34] A. Rhouati, C. Yang, A. Hayat, and J. L. Marty, "Aptamers: A promising tool for ochratoxin a detection in food analysis," *Toxins (Basel)*, vol. 5, no. 11, pp. 1988–2008, 2013.
- [35] Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, "Understanding Silane Functionalization," *Department of Materials*, 2017. [Online]. Available: <https://www.ethz.ch/content/specialinterest/matl/surface/en/research/surface-functionalization/understanding-silane-functionalization.html>.
- [36] N. Aissaoui, L. Bergaou, J. Landoulsi, J.-F. Lambert, and S. Boujday, "Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption," *Langmuir*, vol. 28, pp. 656–665, 2012.
- [37] M. Zhu, M. Z. Lerum, and W. Chen, "How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica," *Langmuir*, vol. 28, no. 1, pp. 416–423, 2012.
- [38] A. B. González-Guerrero, M. Alvarez, A. G. Castaño, C. Domínguez, and L. M. Lechuga, "A comparative study of in-flow and micro-patterning biofunctionalization protocols for nanophotonic silicon-based biosensors," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 393, no. 1, pp. 402–410, 2013.
- [39] S. Beaucage, "Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications," *Curr. Med. Chem.*, vol. 8, no. 10, pp. 1213–1244, 2001.
- [40] K. Awsiuik *et al.*, "Protein adsorption and covalent bonding to silicon nitride surfaces modified with organo-silanes: Comparison using AFM, angle-resolved XPS and multivariate ToF-SIMS analysis," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 110, pp. 217–224, 2013.
- [41] A. Psarouli, A. Bourkoula, P. Petrou, K. Misiakos, N. Chaniotakis, and S. Kakabakos, "Covalent binding vs. adsorption of biomolecules on silicon nitride planar waveguides," *Procedia Eng.*, vol. 25, pp. 350–353, 2011.
- [42] J. Kim, J. Cho, P. M. Seidler, N. E. Kurland, and V. K. Yadavalli, "Investigations of chemical modifications of amino-terminated organic films on silicon substrates and controlled protein immobilization," *Langmuir*, vol. 26, no. 4, pp. 2599–2608, 2010.
- [43] Integrated DNA Technologies, "Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports," pp. 1–22, 2011.

- [44] W. Mai, "Fundamental Theory of Atomic Force Microscopy." [Online]. Available: <http://www.nanoscience.gatech.edu/zlwang/research/afm.html>.
- [45] "Τι είναι το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης;" *Physics4u*, 2003. [Online]. Available: <http://www.physics4u.gr/faq/forcemicroscope.html>.
- [46] G. Haydari, "AFM laboratory exercise for course on 'Nanostructured materials,'" Stockholm, 2012.
- [47] "No Title." [Online]. Available: http://www.nanotech-now.com/Art_Gallery/antonio-siber.htm.
- [48] D. Rugar and P. Hansma, "Atomic Force Microscopy," *Phys. Today*.
- [49] Β. Μπίνας and Γ. Κυριακίδης, "Εισαγωγή στην ηλεκτρονική μικροσκοπία." Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2014.
- [50] P. Eaton, "Frequently Asked Questions about Atomic Force Microscopy," *AFMHelp*, 2009. [Online]. Available: http://afmhelp.com/index.php?option=com_content&view=article&id=49&Itemid=55.
- [51] Δ. Στυλιανού, "Atomic Force Microscope - Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης." Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- [52] "Μέθοδοι χαρακτηρισμού υλικών," *Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών*, 2010. [Online]. Available: https://semfe.gr/files/users/413/meuodoi_xarakthρισμου_ylikwn-ask7_2010.pdf.
- [53] Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου and Α. Παππά, *Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης - Εργαστηριακές ασκήσεις*. Αθήνα, 2009.
- [54] Π. Γλέζος, "Ανάλυση μορφολογίας επιφάνειας με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης," Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, 2012.
- [55] D. a Skoog, F. J. Holler, and T. a Nieman, *Principles of instrumental analysis*. 1998.
- [56] R. Kellner, J. M. Mermet, M. Otto, and H. M. Widmer, *Analytical chemistry*. 1997.
- [57] Θ. Τσώλη, "Τα μικροσκόπια στο... μικροσκόπιο," *Το ΒήμαScience*.
- [58] Κ. Φασσέας, "Οπτικά (φωτονικά) μικροσκόπια," *Agricultural University of Athens*. [Online]. Available: http://www.aua.gr/fasseas/optika_mikroskopia.htm.
- [59] Πανεπιστήμιο Κρήτης, "Μικροσκοπία φθορισμού." .
- [60] IUPAC, *Compendium of chemical terminology - Gold book*. 2014.
- [61] University of Cyprus, "Μικροσκοπία." .
- [62] G. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, 3rd ed. 1996.

- [63] Dendritech, "PAMAM Dendrimers," 2015. [Online]. Available: <http://www.dendritech.com/pamam.html>.
- [64] I. Sigma-Aldrich, "Fluorescein isothiocyanate isomer I." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f7250?lang=en®ion=GR>.
- [65] "Fluorescein Isothiocyanate." [Online]. Available: [http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/\(webtds2\)/100276](http://www4.mpbio.com/ecom/docs/proddata.nsf/(webtds2)/100276).
- [66] Exiqon, "Oligonucleotide modifications." [Online]. Available: <http://www.exiqon.com/oligonucleotide-modifications>.
- [67] N. Duan, S. J. Wu, and Z. P. Wang, "An aptamer-based fluorescence assay for ochratoxin a," *Fenxi Huaxue/ Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 39, no. 3, pp. 300–304, 2011.
- [68] Environmental Protection Agency (EPA), "Chitosan; Poly-D-glucosamine (128930) Fact Sheet," 2001.
- [69] J. C. Linden, C. A. Gardner-Hughes, K. W. Knutson, and R. J. Stoner, "Organic disease control elicitors," *Agro Food Ind. Hi. Tech.*, vol. 11, no. 5, pp. 32–4, 2000.
- [70] P. Ducheyne, K. E. Healy, D. W. Grainger, D. W. Hutmacher, and C. J. Kirkpatrick, "Comprehensive biomaterials," in *Comprehensive Biomaterials*, Amsterdam, 2011, p. 229.
- [71] K. McCue, "New bandage uses biopolymer," 2003.
- [72] A. Woodmansey, "Chitosan Treatment of Sediment Laden Water – Washington State I-90 Issaquah Project," 2002.
- [73] S. F. Ausar, N. Passalacqua, L. F. Castagna, I. D. Bianco, and D. M. Beltramo, "Growth of milk fermentative bacteria in the presence of chitosan for potential use in cheese making," *Int. Dairy J.*, vol. 12, no. 11, pp. 899–906, 2002.
- [74] J. G. Fernandez and D. E. Ingber, "Manufacturing of large-scale functional objects using biodegradable chitosan bioplastic," *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 299, no. 8, pp. 932–938, 2014.
- [75] R. Stoner, "Progressive Plant Growing Has Business Blooming, Environmental and Agricultural Resources," 2006.
- [76] "Hyaluronic acid, sodium salt." [Online]. Available: [http://ornatural.com/chi/pdf/detox-firm/Sodium Hyaluronate.pdf](http://ornatural.com/chi/pdf/detox-firm/Sodium%20Hyaluronate.pdf).
- [77] M. W. Holmes, "Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size," *Biochem. J.*, vol. 250, no. 2, pp. 435–441, 1988.
- [78] "Hylira gel: Indications, side effects, warnings." [Online]. Available: drugs.com.

- [79] "Genitrix HY-50 Vet datasheet," 2011.
- [80] A. Tlili, M. A. Jarboui, A. Abdelghani, D. M. Fathallah, and M. A. Maaref, "A novel silicon nitride biosensor for specific antibody-antigen interaction," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 25, no. 4, pp. 490–495, 2005.
- [81] A. W. Flounders, D. L. Brandon, and A. H. Bates, "Immobilization of thiabendazole-specific monoclonal antibodies to silicon substrates via aqueous silanization," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 50, no. 3, pp. 265–284, 1995.
- [82] R. A. Williams and H. W. Blanch, "Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 9, no. 2, pp. 159–167, 1994.
- [83] J. Diao, D. Ren, J. R. Engstrom, and K. H. Lee, "A surface modification strategy on silicon nitride for developing biosensors," *Anal. Biochem.*, vol. 343, no. 2, pp. 322–328, 2005.
- [84] F. Cattaruzza *et al.*, "Controlled loading of oligodeoxyribonucleotide monolayers onto unoxidized crystalline silicon; fluorescence-based determination of the surface coverage and of the hybridization efficiency; parallel imaging of the process by Atomic Force Microscopy," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 4, 2006.
- [85] M. J. Bañuls, V. González-Pedro, C. A. Barrios, R. Puchades, and Á. Maquieira, "Selective chemical modification of silicon nitride/silicon oxide nanostructures to develop label-free biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 6, pp. 1460–1466, 2010.
- [86] A. B. Sieval, R. Linke, H. Zuilhof, and E. J. R. Sudhölter, "High-quality alkyl monolayers on silicon surfaces," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 19, pp. 1457–1460, 2000.
- [87] L.-H. Liu *et al.*, "Surface etching, chemical modification and characterization of silicon nitride and silicon oxide—selective functionalization of Si₃N₄ and SiO₂," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 28, no. 9, p. 94014, 2016.
- [88] T. D. To, A. T. Nguyen, K. N. T. Phan, A. T. T. Truong, T. C. D. Doan, and C. M. Dang, "Modification of silicon nitride surfaces with GOPES and APTES for antibody immobilization: computational and experimental studies," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 4, p. 45006, 2015.
- [89] P. Saengdee *et al.*, "Surface modification of silicon dioxide, silicon nitride and titanium oxynitride for lactate dehydrogenase immobilization," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 67, pp. 134–138, 2015.
- [90] M. Rosso, "Modification of Silicon Nitride and Silicon Carbide Surfaces for Food and Biosensor Applications - Chapter 1-2," Wageningen University, 2009.
- [91] F. Ghasemi, A. A. Eftekhar, D. S. Gottfried, X. Song, R. D. Cummings, and A. Adibi, "Self-referenced silicon nitride array microring biosensor for toxin detection using glycans at visible wavelength," 2013.

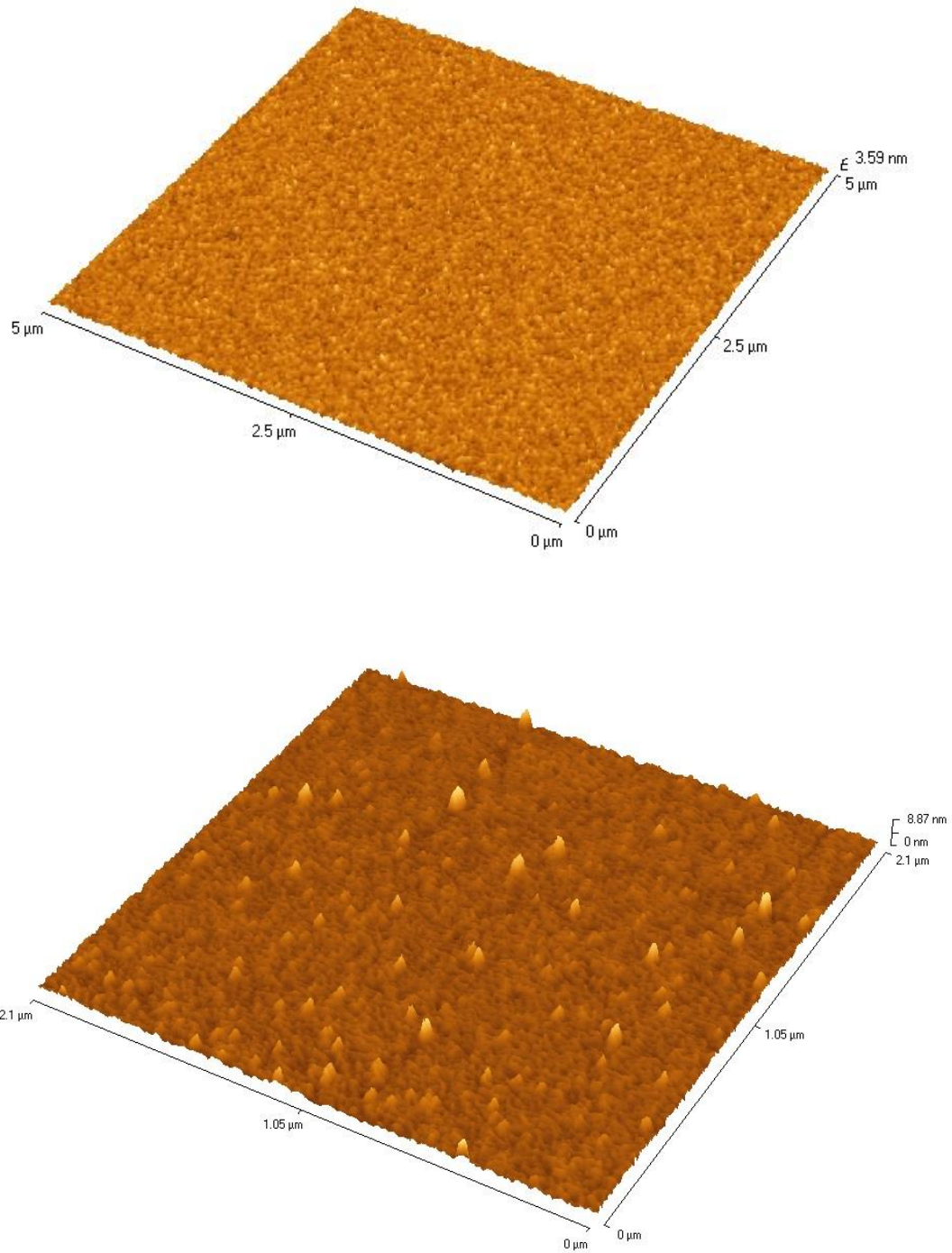
- [92] T. Sakata, M. Kamahori, and Y. Miyahara, "Immobilization of oligonucleotide probes on Si₃N₄ surface and its application to genetic field effect transistor," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 24, no. 6–8 SPEC. ISS., pp. 827–832, 2004.
- [93] M. Manning and G. Redmond, "Formation and characterization of DNA microarrays at silicon nitride substrates," *Langmuir*, vol. 21, no. 1, pp. 395–402, 2005.
- [94] L. Sirghi, "Plasma functionalization of nanoscopic probes - Hydroxylation of AFM probes," 2012.
- [95] A. Apetrei and L. Sirghi, "Stochastic adhesion of hydroxylated atomic force microscopy tips to supported lipid bilayers," *Langmuir*, vol. 29, no. 52, pp. 16098–16104, 2013.
- [96] Y. Coffinier *et al.*, "Covalent functionalization of silicon nitride surfaces by semicarbazide group," *Surf. Sci.*, vol. 601, no. 23, pp. 5492–5498, 2007.
- [97] W. Kern, "Overview and Evolution of Silicon Wafer Cleaning Technology," *Handb. Silicon Wafer Clean. Technol. 2nd Ed.*, vol. 137, no. 6, pp. 3–92, 2008.
- [98] G. L. Witucki, "A Silane Primer: Chemistry and Applications of Alkoxy Silanes," *J. coatings Technol.*, vol. 65, pp. 57–60, 1993.
- [99] Shin-Etsu Silicone, "Silane Coupling Agents," 2015. [Online]. Available: https://www.shinetsusilicone-global.com/catalog/pdf/SilaneCouplingAgents_e.pdf.
- [100] G. Tsekenis *et al.*, "Surface functionalization studies and direct laser printing of oligonucleotides toward the fabrication of a micromembrane DNA capacitive biosensor," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 175, pp. 123–131, 2012.
- [101] K. Χαριτίδης, "Ανάπτυξη και χαρακτηρισμός νανοδομών," Αθήνα, 2007.
- [102] M. C. Stuparu and A. Khan, "Thiol-epoxy 'click' chemistry: Application in preparation and postpolymerization modification of polymers," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 54, no. 19, pp. 3057–3070, 2016.
- [103] C. E. Soteropulos and H. K. Hunt, "Attaching biological probes to silica optical biosensors using silane coupling agents," *J. Vis. Exp.*, no. 63, 2012.
- [104] N. Oddone, A. I. Zambrana, M. Tassano, W. Porcal, P. Cabral, and J. C. Benech, "Cell uptake mechanisms of PAMAM G4-FITC dendrimer in human myometrial cells," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 7, 2013.
- [105] P. Lai, M. Shieh, C. Pai, C. Wang, and P. Lou, "Studies on the Intracellular Trafficking of PAMAM Dendrimer," *NSTI Nanotech*, vol. 1, pp. 232–235, 2005.
- [106] Y. Choi, T. Thomas, A. Kotlyar, M. T. Islam, and J. R. Baker, "Synthesis and functional evaluation of DNA-assembled polyamidoamine dendrimer clusters for

- cancer cell-specific targeting," *Chem. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–43, 2005.
- [107] I. Sigma-Aldrich, "6-Fluorescein Phosphoramidite." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/x01010hh?lang=en®ion=GR>.
- [108] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Drutschmann, D. Blohm, and D. Wöhrle, "DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 2, 2002.
- [109] Proteochem, "BS3 Protocol and Product Information Sheet," 2014. [Online]. Available: <http://www.proteochem.com/protocols/BS3-Product-Information-Sheet.pdf>.
- [110] I. Sigma-Aldrich, "Suberic acid bis(3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester) sodium salt." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s5799?lang=en®ion=GR>.
- [111] W. Suginta, P. Khunkaewla, and A. Schulte, "Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan," *Chem. Rev.*, vol. 113, no. 7, pp. 5458–5479, 2013.
- [112] T. Goren, N. D. Spencer, and R. Crockett, "Impact of chain morphology on the lubricity of surface-grafted polysaccharides," *RSC Adv.*, vol. 4, 2014.
- [113] W. G. Pitt, R. N. Morris, M. L. Mason, M. W. Hall, Y. Luo, and G. D. Prestwich, "Attachment of hyaluronan to metallic surfaces," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 68A, no. 1, pp. 95–106, 2004.
- [114] J. H. Elam, H. Nygren, and M. Stenberg, "Covalent coupling of polysaccharides to silicon and silicon rubber surfaces," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 18, no. 8, pp. 953–959, 1984.
- [115] A. Wang *et al.*, "Immobilization of polysaccharides on a fluorinated silicon surface," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 47, no. 1, pp. 57–63, 2006.
- [116] I. Sigma-Aldrich, "Chitosan." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448869?lang=en®ion=GR>.
- [117] G. Romanazzi, F. M. Gabler, D. Margosan, B. E. Mackey, and J. L. Smilanick, "Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape.," *Phytopathology*, vol. 99, no. 9, pp. 1028–1036, 2009.
- [118] Σ. Φίλιππα-Ράππη, "Διερεύνηση της χρήσης πυριτικής παιπάλης στη σύνθεση μονωτικών υλικών," Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2017.
- [119] O. A. C. Monteiro and C. Airoidi, "Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol.

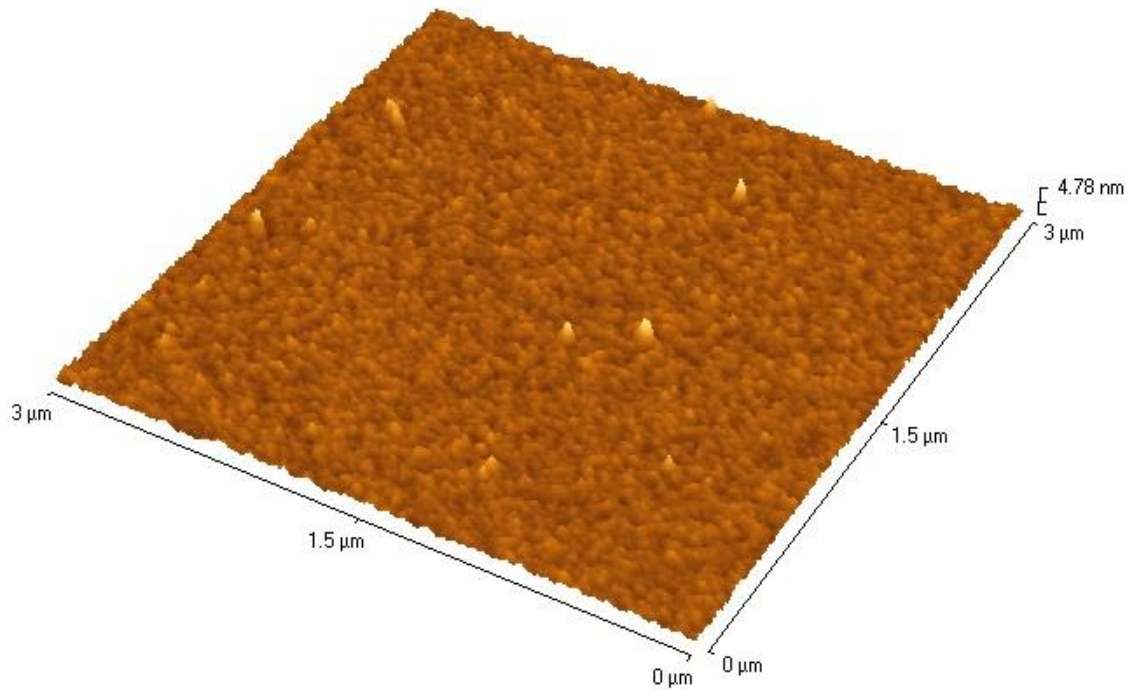
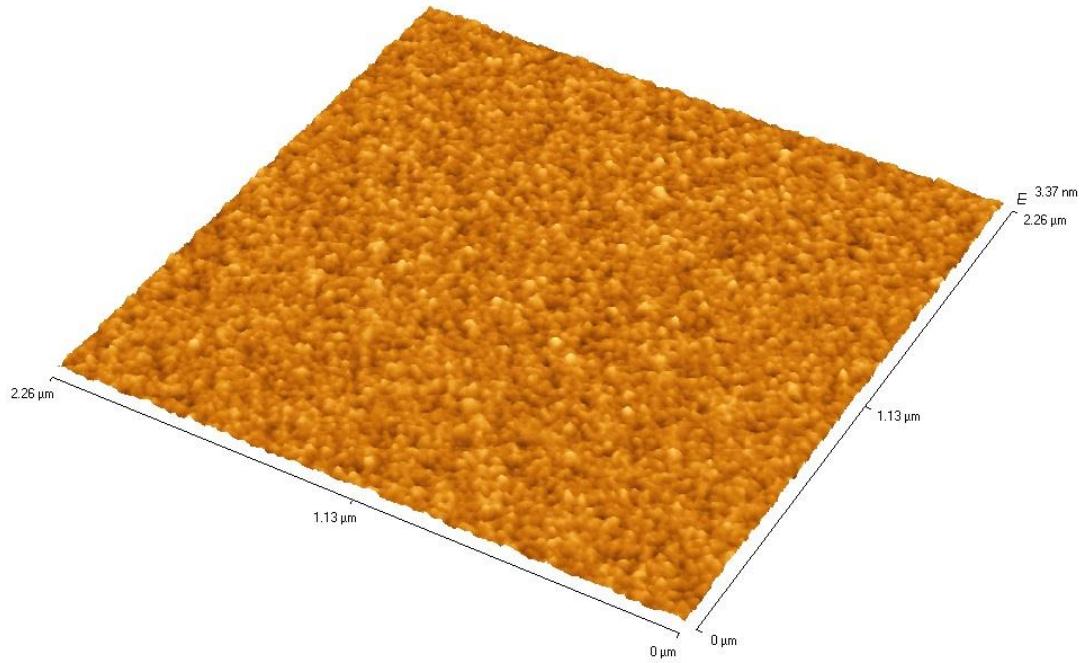
26, no. 2–3, pp. 119–128, 1999.

- [120] I. Sigma-Aldrich, "Hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi*." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/40583?lang=en®ion=GR>.
- [121] X. Liu, R. Huang, R. Su, W. Qi, L. Wang, and Z. He, "Grafting hyaluronic acid onto gold surface to achieve low protein fouling in surface plasmon resonance biosensors," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 15, pp. 13034–13042, 2014.
- [122] S. Petersen, S. Kaule, M. Teske, I. Minrath, K. P. Schmitz, and K. Sternberg, "Development and in vitro characterization of hyaluronic acid-based coatings for implant-associated local drug delivery systems," *J. Chem.*, vol. 2013, 2013.
- [123] J. W. Kuo, D. a Swann, and G. D. Prestwich, "Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides," *Bioconjug. Chem.*, vol. 2, no. 4, pp. 232–241, 1991.
- [124] H. Tompkins and E. A. Irene, *Handbook of Ellipsometry*. William Andrew, 2005.
- [125] A. Hartwig, M. Mulder, and C. A. Smolders, "Surface amination of poly(acrylonitrile)," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 52, no. C, pp. 65–78, 1994.
- [126] Z. Ma, Z. Mao, and C. Gao, "Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 60, no. 2, pp. 137–157, 2007.

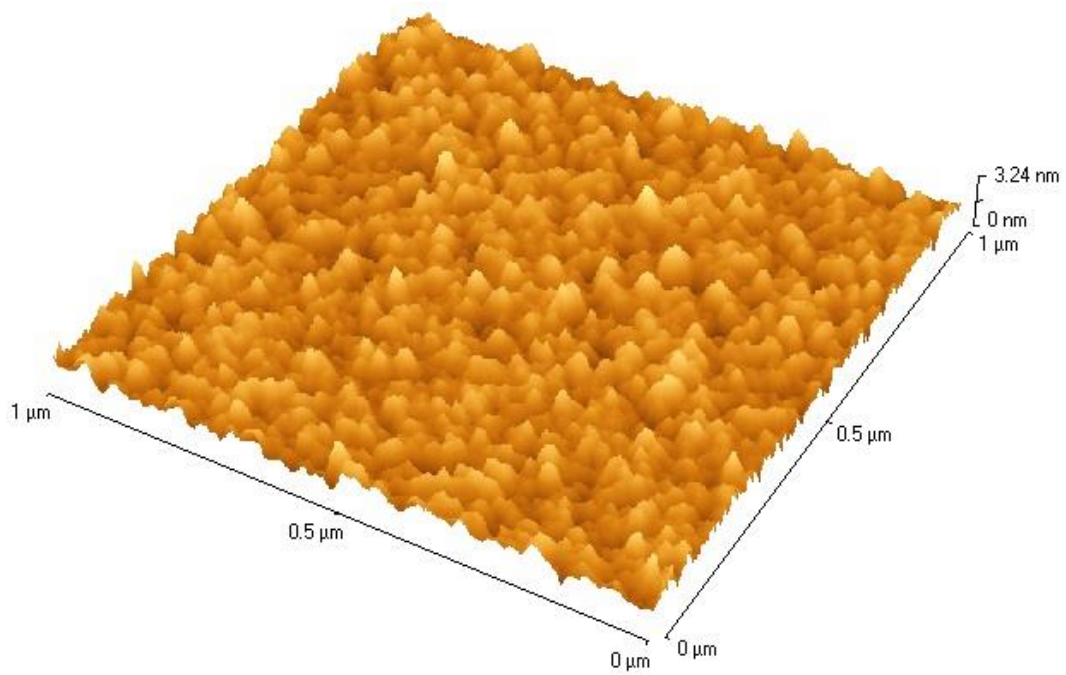
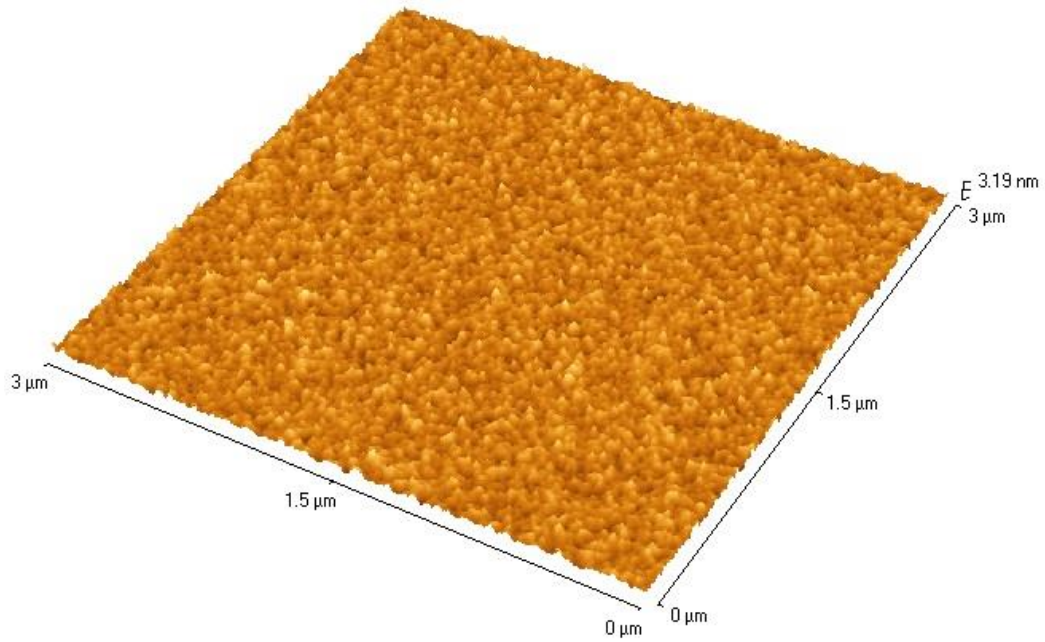
VI. Παράρτημα 1. – Εικόνες μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM)



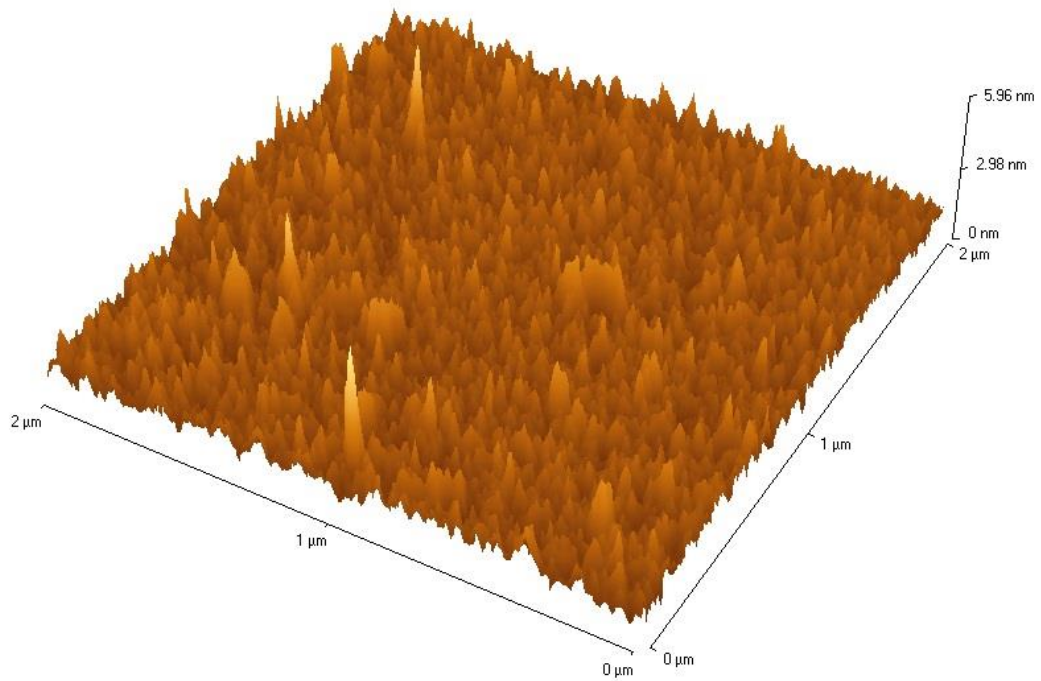
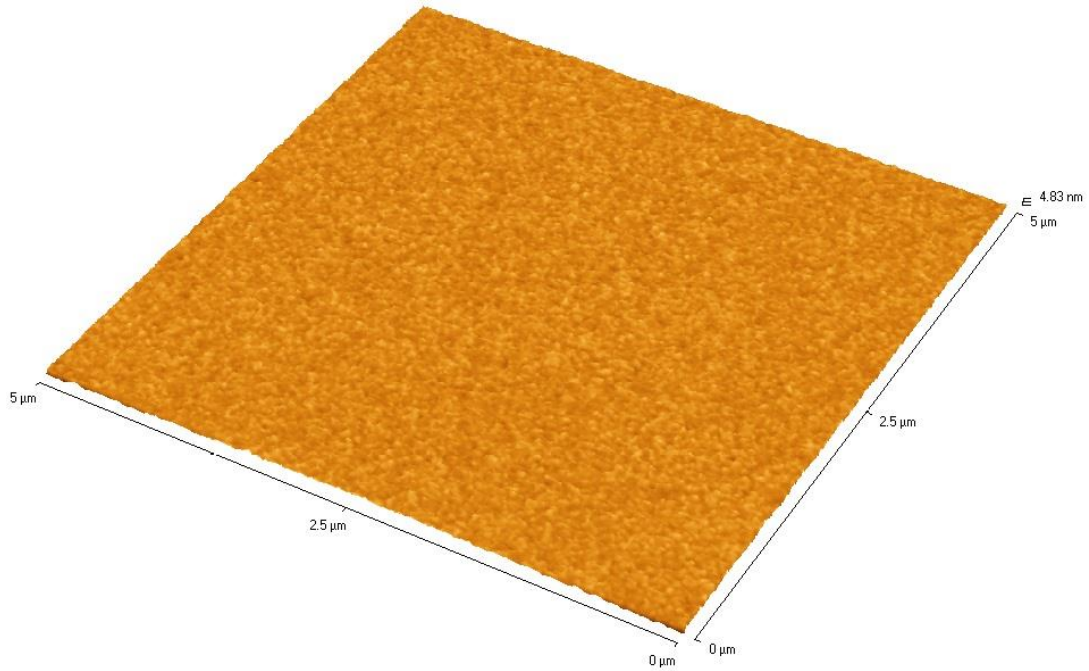
Εικόνα 1 α και β. Τριδιάστατη απεικόνιση επιφάνειας νιτριδίου του πυριτίου πριν και μετά την κατεργασία με HF



Εικόνα 2 α και β. Τριδιάστατη απεικόνιση επιφάνειας νιτριδίου του πυριτίου πριν και μετά την κατεργασία με HNO₃

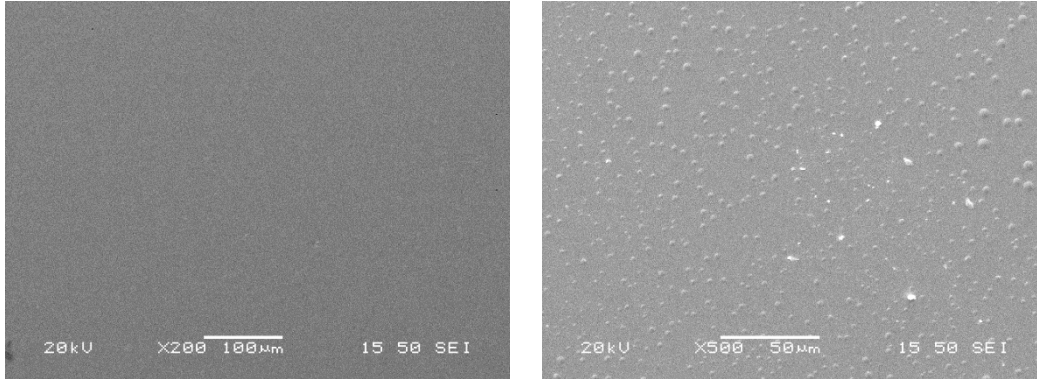


Εικόνα 3 α και β. Τριδιάστατη απεικόνιση επιφάνειας νιτριδίου του πυριτίου πριν και μετά την κατεργασία με NaOH

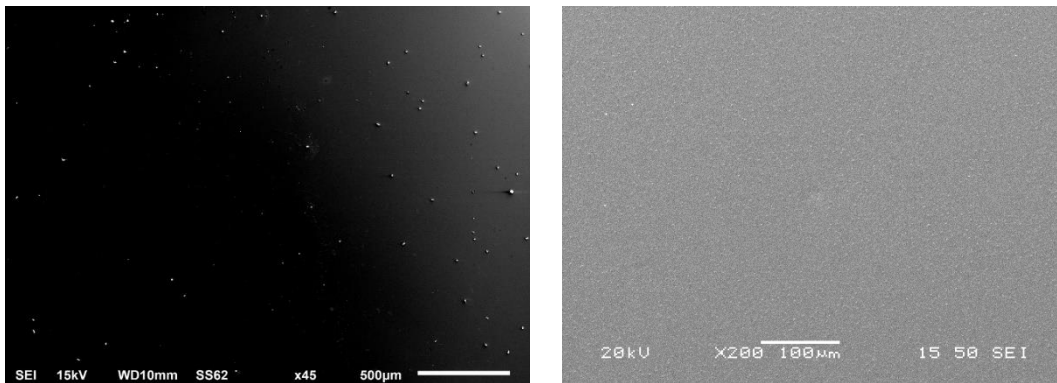


Εικόνα 4 α και β. Τριδιάστατη απεικόνιση επιφάνειας νιτριδίου του πυριτίου πριν και μετά την κατεργασία με piranha

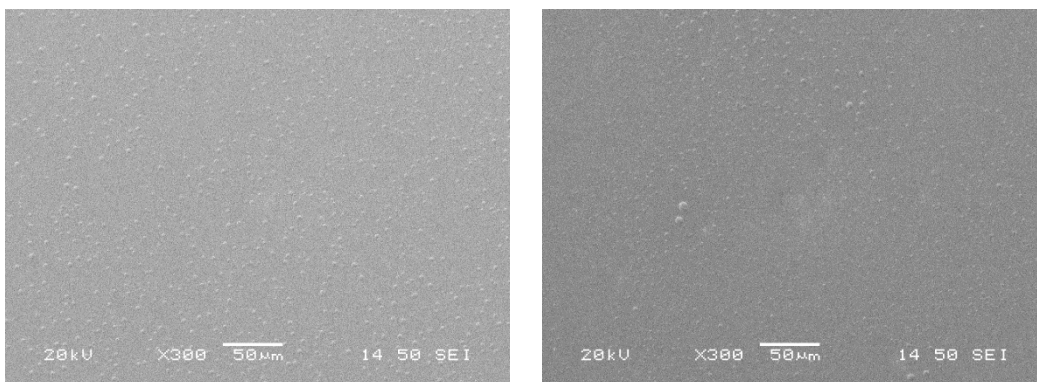
VII. Παράρτημα 2. – Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM)



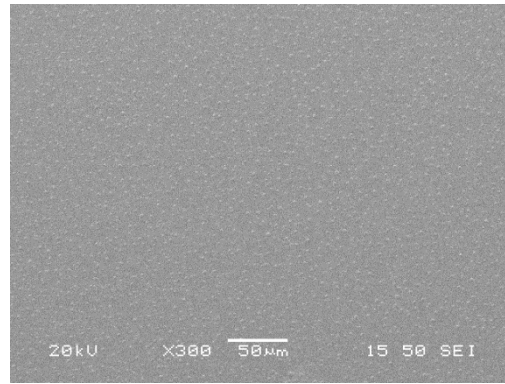
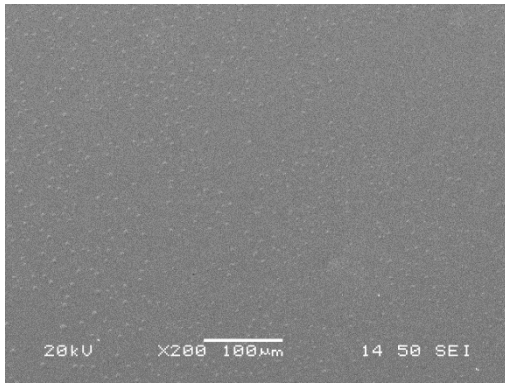
Εικόνα 1 α και β. Επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου πριν και μετά τη σιλανιοποίηση



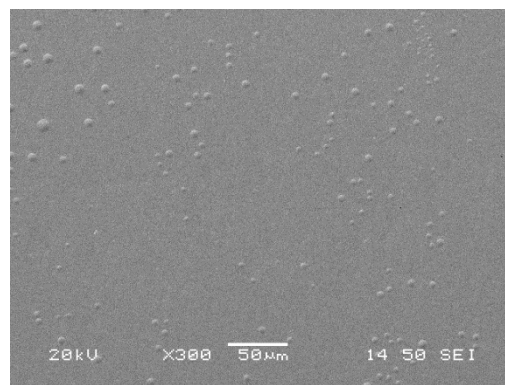
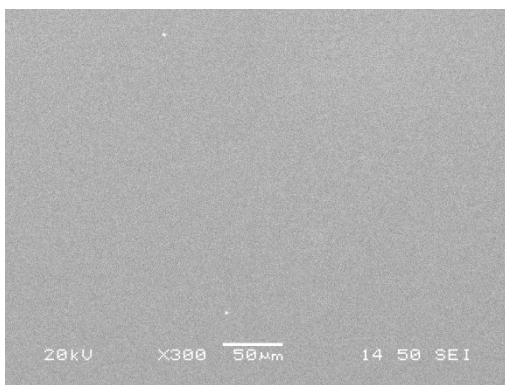
Εικόνα 2 α και β. Επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου κατεργασμένη με NaOH πριν και μετά τη σιλανιοποίηση



Εικόνα 3 α και β. Επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου κατεργασμένη με HNO₃ πριν και μετά τη σιλανιοποίηση

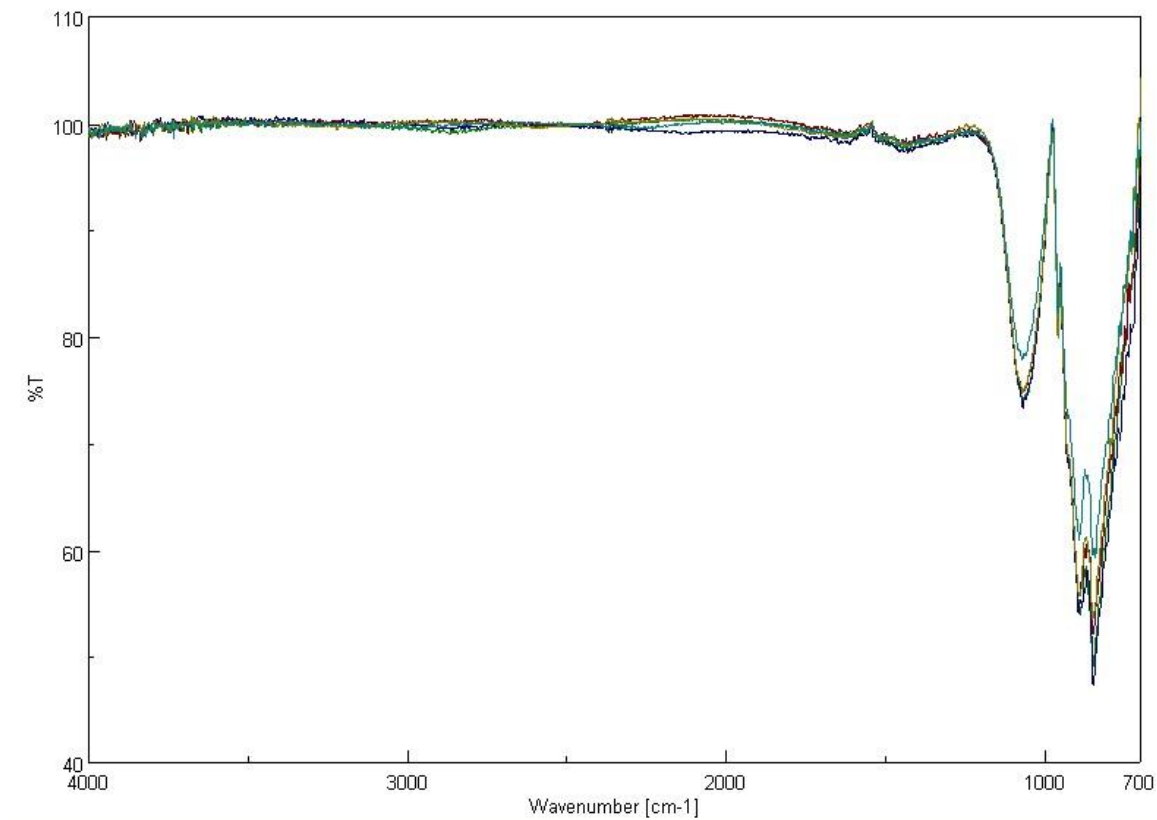


Εικόνα 4 α και β. Επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου κατεργασμένη με HF πριν και μετά τη σιλανιοποίηση



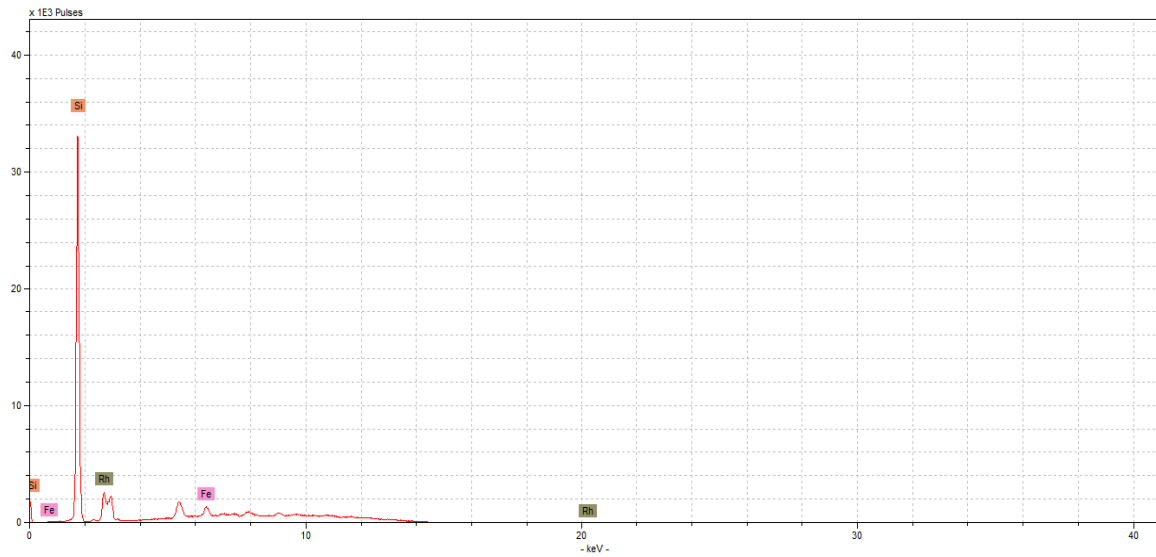
Εικόνα 5 α και β. Επιφάνεια νιτριδίου του πυριτίου κατεργασμένη με piranha πριν και μετά τη σιλανιοποίηση

VIII. Παράρτημα 3. – Φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR)



Εικόνα 1. Φάσματα υπέρυθρης φασματοσκοπίας όλων των σιλανιοποιημένων επιφανειών

ΙΧ. Παράρτημα 4. – Φάσμα φθορισμού ακτίνων x (XRF)

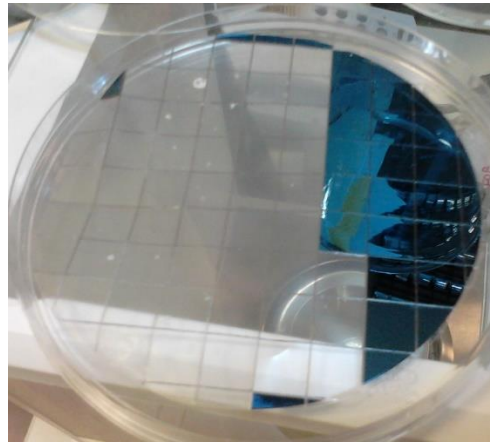


Εικόνα 1. Φάσμα φθορισμού ακτίνων x επιφάνειας κατεργασμένης με υδροξείδιο του νατρίου

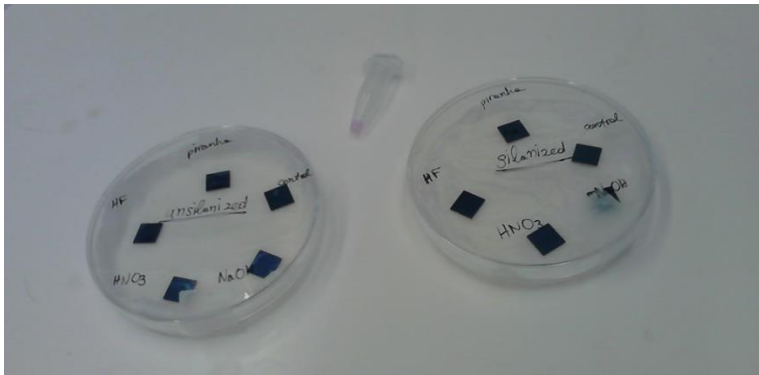
Χ. Παράρτημα 5. – Φωτογραφικό υλικό



Εικόνα 1. Συσκευή AFM Veeco di Innova



Εικόνα 2. Επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου μη κατεργασμένες



Εικόνα 3. Επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου μετά από χημική κατεργασία



Εικόνα 4. Επιφάνειες νιτριδίου του πυριτίου κατεργασμένες με NaOH μετά από προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων PAMAM

Βιογραφικό σημείωμα

BANIKIΩΤΗ ΒΑΛΕΝΤΙΝΑ-ΜΑΡΙΑ

Ημερομηνία γέννησης: 19 Ιουλίου 1991

E-mail: valentinavanikioti@gmail.com

Linkedin: Valentina Maria Vanikioti

Ακαδημαϊκές σπουδές

Σεπτέμβριος 2015 – Ιούνιος 2017

Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο «Επιστήμη και τεχνολογία υλικών» - Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Εκπόνηση μεταπτυχιακής εργασίας με τίτλο «Χημική τροποποίηση και μελέτη υποστρωμάτων με στόχο την αύξηση δέσμευσης βιομορίων που μπορούν να δράσουν ως ανιχνευτές για εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων», σε συνεργασία με το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Αύγουστος 2012 – Ιανουάριος 2013

- Προπτυχιακές σπουδές στο Royal Institute of Technology (KTH) στη Στοκχόλμη, Σουηδία για ένα εξάμηνο στα πλαίσια του προγράμματος ανταλλαγής φοιτητών Erasmus (διδασκαλία, εξέταση και παράδοση εργασιών στην αγγλική)

Σεπτέμβριος 2009 – Σεπτέμβριος 2015

- Δίπλωμα Χημικής Μηχανικής (σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.)
Βαθμός: 7,64, εμβάθυνση: «Υλικά»

Διπλωματική εργασία με θέμα: «Μελέτη εκπλυσιμότητας βαρέων μετάλλων από σκυρόδεμα με 5% υποκατάσταση τσιμέντου από σκόνη τσιμενοκλιβάνων (Cement Kiln Dust)» (βαθμός 10)

Ιούνιος 2009

- Ολοκλήρωση λυκειακών σπουδών με βαθμό άριστα 19,4

Εργασιακή εμπειρία

- Οκτώβριος – Νοέμβριος 2013

Α.Ε. Τσιμέντων TITAN

Εκπόνηση πρακτικής άσκησης

Θέση: Διεύθυνση Έρευνας και Ποιότητας

Ενασχόληση με πολλά από τα επιμέρους στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, σύγκριση και αξιολόγηση πρώτων υλών, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων στο χημικό εργαστήριο, στο εργαστήριο σκυροδέματος και στο εργαστήριο κονιαμάτων.

Συστατική επιστολή διαθέσιμη

- 05/07/2010 – 23/07/2010 και 22/09/2010 – 30/09/2010

Ελληνική Αεροπορική Βιομηχανία Α.Ε. – Hellenic Aerospace Industry
L.T.D.

Άμισθη πρακτική εργασία

Θέση: Εργαστήρια Φυσικών Επιστημών

Εξοικείωση με το χημικό εργαστήριο, τον εξοπλισμό και τις τεχνικές κλασικής αναλυτικής χημείας, διενέργεια χημικών αναλύσεων λουτρών επιμετάλλωσης, διαλυμάτων αλατονέφωσης (salt spray) και καθαρισμού αεροπορικού υλικού, διενέργεια ελέγχων επιμόλυνσης καυσίμων και υδραυλικών υγρών. Επίσης, εξοικείωση με το ποιοτικό σύστημα και την οργάνωση ενός παραγωγικού εργαστηρίου (παραλαβή και ταυτοποίηση δειγμάτων, ταξινόμηση εργασιών, χρήση προδιαγραφών, χρήση διακριβωμένων οργάνων, καταγραφή αποτελεσμάτων σε εργαστηριακές αναφορές και σε βιβλία καταγραφής και πρωτόκολλου εργαστηρίων, παραγγελίες υλικών κ.λπ.)

Συστατική επιστολή διαθέσιμη

Γλώσσες

- Ελληνική (μητρική γλώσσα)
- Αγγλική (επίπεδο άριστης γνώσης Γ2) – πανεπιστήμιο Cambridge/ πανεπιστήμιο Michigan, επάρκεια γνώσης αναγνωρισμένη από το Υπουργείο Παιδείας
- Γαλλική (επίπεδο B1) – DELF

Δεξιότητες

- Άριστη χρήση εργαλείων MS Office – Πιστοποίηση πανεπιστημίου του Cambridge
Μάιος 2011
- Επιτυχής παρακολούθηση του μαθήματος «Βιομηχανική ασφάλεια» στην εταιρεία EAB και εκ νέου σεμιναριακή παρακολούθηση παρουσίασης κατά την εκπόνηση της πρακτικής άσκησης στην εταιρεία Α.Ε. Τσιμέντων TITAN

Ιούλιος 2010, Οκτώβριος 2013